

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajarville

Vacinas experimentais para febre amarela como modelo de estudo de novos adjuvantes

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros

RIO DE JANEIRO

2019

dos Reis Albuquerque Cajaraville, Ana Carolina .

Vacinas experimentais para febre amarela como modelo de estudo de novos adjuvantes / Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville. - Rio de Janeiro, 2019.

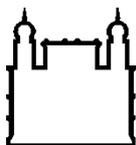
xxi, 150 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientador: Marco Alberto Medeiros.

Bibliografia: f. 129-145

1. Adjuvantes. 2. Vacina de febre amarela. 3. Ensaio pré-clínico. 4. Vírus inativado. 5. Proteínas recombinantes. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville

Vacinas experimentais para febre amarela como modelo de estudo de novos adjuvantes

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros

Aprovada em: 08 / 02 / 2019.

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Paula Mello De Luca (IOC, FIOCRUZ)

Prof. Dra. Myrna Bonaldo (IOC, FIOCRUZ)

Prof. Dr. Paulo Lee Ho (Butantan)

Prof. Dra. Patrícia Cristina da Costa Neves (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ)

Prof. Dr. Marcos da Silva Freire (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ)

A minha filha Isabella, presente que que Deus me deu no último ano de doutorado para manter meu foco e determinação na conclusão de mais essa etapa da minha vida.

Agradecimentos

- Ao Dr. Marco Medeiros, pela credibilidade ao me receber como aluna, por todo o aprendizado proporcionado ao longo deste processo e pela parceria nessa reta final para conclusão e correção da tese;

- À minha chefe Sheila Maria de Lima pela credibilidade, apoio e carinho não só ao longo do doutorado, mas desde minha entrada no LATEV;

- À minha revisora, Dra. Paula Mello De Luca, pelas imprescindíveis contribuições para o meu trabalho de conclusão e disponibilidade para discussão de resultados e sugestões ao longo desse projeto;

- Aos meus companheiros de PRNT, em especial Emily Hime, Marisol Simões, Vanessa de Oliveira Santos, José Henrique Linhares e Stephanie Almeida por todo o apoio, cumplicidade e compreensão com minhas ausências, além de suas imprescindíveis contribuições para os meus resultados experimentais;

- Às Dra. Elena Caride e Dra. Luciane Gaspar pela oportunidade de utilizar os antígenos candidatos para febre amarela em desenvolvimento no Programa de Vacinas Virais de Bio-Manguinhos e pelas ricas discussões dos desenhos experimentais e amparo ao longo deste processo;

- À toda a equipe do LAEAN, em especial Dr. Rodrigo Mueller pelo auxílio com os protocolos CEUA, ao veterinário Bruno Jorge Duque da Silva e técnicos Creuza Souza Ricardo e Luiz Eduardo Furtado, pela condução dos experimentos com camundongos com ética e técnica exemplares, sempre prestativos e abertos a novas ideias;

- À toda a equipe do LATEV, minha segunda família, pela amizade e apoio a cada dia. Trabalhar com pessoas tão queridas torna a rotina muito mais leve e agradável;

- À minha amiga Renata Carvalho Pereira, companheira de trabalho que cedeu uma parte do seu tempo para finalizar meus experimentos de bancada quando descobri a gestação. Sua contribuição foi imprescindível para a conclusão deste trabalho;

- À toda a equipe do LATER que me acolheu e orientou para a realização dos ensaios de clonagem e expressão em *E. coli* e Baculovírus/ Células de inseto, em especial Gabriela Esteves, Haroldo Cid, Carolina Lessa Aquino, Mariana Miguez, Cristiane Pestana, Anna Erika Vieira e Ana Paula Argondizzo.

- À toda a equipe do LATIM pela ajuda na condução dos ensaios de ELISA, ELISpot e citometria de fluxo, em especial a Tamires Azamor, Jane da Silva e Luciana Tubarão;

- À Dra. Patrícia Neves, pelas ricas discussões sobre experimentos e auxílio com alguns insumos.

- À equipe do LATEB, em especial a Ana Paula dos Santos pela orientação acerca das padronizações dos ensaios de ELISA realizados e gentil cessão de alguns insumos para os meus experimentos;

- Aos amigos de toda a vida, em especial Carla e Ana Lucia, pela compreensão com a ausência nestes quatro anos de intensa dedicação;

- À minha família que se solidarizou com todo o meu esforço ao longo desses quatro anos, sempre me apoiando e incentivando. Um agradecimento especial aos meus pais Sérgio e Mirian e meu irmão Flavio, por todo o carinho e apoio em todos os desafios assumidos ao longo da minha vida. Obrigada por todo o amor, pelos valores e exemplos de determinação dados. Vocês são os pilares da minha vida;

- Ao meu marido Glauber por toda a cumplicidade, paciência, compreensão com minhas ausências e estímulo nos momentos de desânimo. Por me fazer muito feliz todos os dias, me dando força e motivação para superar os mais diversos obstáculos. Obrigada pela força, principalmente grávida nessa fase exaustiva de conclusão;

- À Deus, que me permitiu ter força, saúde e foco ao longo de todo esse tempo para atingir esse objetivo tão importante.

- A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram com uma palavra amiga ao longo deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

Abreviaturas e Siglas

Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
BSA	“Bovine serum albumin” _ soroalbumina bovina
CMC	Meio semissólido a base de carboximetilcelulose
DAMP	do inglês “danger associated molecular pattern”_padrão molecular associado a perigo
DAPI	4,3-Diamidino-2-Fenilindol
DDA	“dimethyl dioctadecyl ammonium bromide”
DO	Densidade Ótica
DO ₂	oxigênio dissolvido
dpi	Dias pós inoculação
FA	Febre Amarela
GLA	Do inglês “glucopyranosyl lipid adjuvant”
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IDRI	“Infectious Disease Research Institute”
IMAC	“Immobilized Metal Affinity Chromatography”_ cromatografia de afinidade a íons metálicos
IPTG	isopropylthio-β-galactoside
ISCOMs	Do inglês “Immunostimulatory complexes”_ complexos imunoestimuladores
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica
LATIM	Laboratório de Tecnologia Imunológica
LB	Meio Luria Bertani
LPS	lipossacarídeo
MHC	Do inglês, “Major histocompatibility complex”_ complexo principal de histocompatibilidadae
MOI	multiplicidade de infecção
MPL	Do inglês, “monofosforil lipid A”
NOD	Do inglês, “nucleotide binding oligomerization domain- (NOD-) like receptors”
OMS	Organização Mundial da Saúde

PAMP	Do inglês “Pathogen associated molecular pattern”_ padrão molecular associado a patógeno
PLA	Do inglês “Poly lactic acid”
PLGA	Do inglês “poly lactic-coglycolic acid”
PMSF	“Phenylmethanesulfonyl fluoride”, inibidor de protease
PNH	Primata não humano
PRR	Do inglês “Pathogen recognition receptor”_ receptor de reconhecimento de patógeno
RIG-I	Do inglês, “retinoic acid-inducible gene-I- (RIG-I-) like receptors (RLRs)”
rpm	Rotações por minuto
SAP	“Shrimp alkaline phosphatase”_ Fosfatase alcalina de camarão
SF9	
SFB	soro fetal bovino
SOC	Meio “Super Optimal Broth with Catabolite repression”, meio de crescimento super ótimo com repressão de catabólitos.
TB	Meio Terrific broth
TDB	glicolípídeos trehalose 6,6'-dibehenate
TLR	do inglês, “Toll-like receptors” _ receptor semelhante a Toll
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TMG	Título Médio Geométrico
UTR	do inglês “untranslated region”
VLP	Do inglês, “Virus-Like Particle”, VLPs
YEL-AND	do inglês, “Vaccine-Associated neurotropic disease”
YEL-AVD	do inglês, “Vaccine-Associated viscerotropic disease”

Lista de Figuras

Figura 1.1	Ciclos de transmissão do vírus da febre amarela na África e na América Latina, representando os ciclos selvagem, da savana (intermediário) e urbano.	2
Figura 1.2	Espalhamento do vírus da Febre Amarela: rápido deslocamento interno e entre biomas brasileiros.	4
Figura 1.3	Surtos de febre amarela de 2016 a 2018, com casos confirmados e mortes por país.	7
Figura 1.4	Organização genômica dos flavivírus com sua única fase aberta de leitura e suas extremidades não-codificantes.	8
Figura 1.5	Ciclo de replicação dos flavivírus.	9
Figura 1.6	Estrutura dos Flavivírus.	11
Figura 1.7	Respostas imunológicas para febre amarela.	16
Figura 1.8	Esquema de obtenção de baculovírus recombinante utilizando o sistema Bac-to-Bac®.	23
Figura 1.9	Diferenças no padrão de glicosilação entre células de inseto e de mamífero.	24
Figura 1.10	Possíveis aplicações do Sistema de Expressão em Baculovírus.	25
Figura 1.11	Linha do tempo de desenvolvimento de adjuvantes ilustrando o histórico de vacinas com adjuvantes naturais até os quimicamente definidos desenvolvidos atualmente.	30
Figura 1.12	Benefícios potenciais do uso de adjuvantes.	31
Figura 1.13	Mecanismos gerais de ação de adjuvantes.	33
Figura 1.14	Especulações acerca dos mecanismos de ação propostos para adjuvantes a base de alumínio.	35
Figura 3.1	Esquemas de imunização usados nos ensaios com animais.	61
Figura 4.1	Cromatogramas e SDS-PAGE e das frações obtidas na Purificações por IMAC e eluição em gradiente linear das proteínas E YF (A) e NS1 YF (B) produzidas em <i>E. coli</i> BL21.	73
Figura 4.2	Titulação dos soros policlonais anti E YF e anti NS1 YF	74

	produzidos “in house” por “Western Blotting”.	
Figura 4.3	Detecção das proteínas EYF recombinantes expressas em duas cepas de E. coli (BL21 e “Shuffle”) por “Western Blotting” com anticorpos específicos para Febre Amarela.	75
Figura 4.4	Cinética de Expressão das proteínas recombinantes em células Sf9 cultivadas em suspensão.	76
Figura 4.5	Detecção da expressão das proteínas recombinantes Eecto YF e NS1 YF em células Sf9 infectadas pelos respectivos baculovírus (setas brancas) 72 h pós infecção.	77
Figura 4.6	Marcação de Glicosilação com o “kit Pro Q Emerald”.	77
Figura 4.7	Purificação por IMAC em “steps” da proteína E ecto YF no Akta Purifier.	79
Figura 4.8	Percentual de sobrevivência ao desafio IC dos camundongos do Ensaio I.	80
Figura 4.9	Ensaio I: Títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT ₅₀ nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).	81
Figura 4.10	Ensaio I: Títulos de IgG total por ELISA nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).	82
Figura 4.11	Percentual de sobrevivência ao desafio IC dos camundongos do Ensaio II.	84
Figura 4.12	Ensaio II: Títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT ₅₀ nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).	85
Figura 4.13	Ensaio II: Títulos de IgG total por ELISA nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).	86
Figura 4.14	Percentual de sobrevivência ao desafio IC dos camundongos do Ensaio III.	88
Figura 4.15	Ensaio III: Títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT ₅₀ nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).	89
Figura 4.16	Ensaio III: Títulos de IgG total por ELISA nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).	90
Figura 4.17	Percentual de sobrevivência ao desafio IC dos camundongos do Ensaio IV.	93
Figura 4.18	Ensaio IV: Morbidade dos animais imunizados com as formulações experimentais durante o acompanhamento	94

	clínico pós-desafio.	
Figura 4.19	Ensaio IV: Títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT ₅₀ nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).	94
Figura 4.20	Ensaio IV: Títulos de IgG total por ELISA nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).	95
Figura 4.21	Ensaio IV: Análise da resposta sistêmica de plasmócitos ativados e células B de memória na medula óssea por ELISpot de IgG nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).	98
Figura 4.22	Ensaio IV: Dosagem de IFN γ , IL-2 e IL-4 por ELISpot nos tempos pré (linfonodos drenantes) e pós-desafio (cérebro).	99
Figura 4.23	Ensaio IV: Balanço de citocinas na resposta local (linfonodos drenantes e cérebro) nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).	100
Figura 4.24	Ensaio IV: Análise da resposta local (linfonodos drenantes e cérebro) por dosagem de plasmócitos ativados e células B de memória por ELISpot de IgG nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).	101
Figura 4.25	Ensaio IV: Análise da resposta sistêmica de plasmócitos ativados e células B de memória no baço por ELISpot de IgG nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).	102
Figura 4.26	Ensaio IV: Análise da resposta sistêmica de plasmócitos ativados e células B de memória na medula óssea por ELISpot de IgG nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).	103
Figura 4.27	Ensaio IV: Cinética dos anticorpos neutralizantes (A) e IgG total (B) nos tempos 40 dpi, 83 dpi e 132 dpi.	104

Lista de Quadros

Quadro 1.1	Adjuvantes licenciados para uso humano e em testes clínicos.	41
Quadro 3.1	Reagentes para reação de PCR para amplificação do gene de interesse nos respectivos vetores.	44
Quadro 3.2	Condições de ciclos da reação de RT-PCR	45
Quadro 3.3	Reagentes para reação de PCR para detecção do gene de interesse	46
Quadro 3.4	Condições de termociclagem da reação de PCR.	46
Quadro 3.5	Condições de amplificação da reação de PCR.	52
Quadro 3.6	Desenho experimental do Ensaio I (escolha do antígeno modelo e determinação de sua dose).	62
Quadro 3.7	Desenho experimental do Ensaio II (imunogenicidade e proteção induzida por formulações de vírus inativado com diferentes adjuvantes)	63
Quadro 3.8	Desenho experimental do Ensaio III (imunogenicidade e proteção induzida por formulações de antígenos de subunidade com diferentes adjuvantes)	64
Quadro 3.9	Desenho experimental do Ensaio IV (imunogenicidade e proteção induzida pelas melhores formulações avaliadas e duração da imunidade)	65
Quadro 3.10	Marcadores utilizados para avaliar os fenótipos das subpopulações celulares induzidas pela imunização e associadas a proteção ao desafio intracerebral.	69
Quadro 4.1	Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio I.	83
Quadro 4.2	Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio II.	87
Quadro 4.3	Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio III.	91

Quadro 4.4	Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio III.	92
Quadro 4.5	Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio VI.	96
Quadro 4.6	Resumo geral dos resultados de duração da imunidade do Ensaio VI.	105

Índice

1	Introdução	1
1.1	Febre Amarela: Aspectos gerais	1
1.1.1	O “status” da epidemia de Febre Amarela no Brasil	3
1.1.2	O vírus da febre amarela e seus principais antígenos	7
1.1.3	A vacina atenuada para febre amarela FA17DD	12
1.1.4	A resposta imunológica	15
1.1.5	Modelos animais disponíveis	18
1.2	Antígenos não vivos como alternativas	20
1.2.1	Vacinas de subunidade	20
1.2.1.1	Sistema de expressão procarioto	20
1.2.1.2	Sistema de expressão eucarioto	22
1.2.1.2.1	Baculovírus/ Células de inseto	22
1.2.1.2.2	Plataforma vegetal	25
1.2.2	Vacina inativada	27
1.3	Adjuvantes	29
1.3.1	Adjuvantes que atuam como sistemas carreadores particulados (“Delivery”)	34
1.3.1.1	Sais de alumínio	34
1.3.1.2	Emulsões óleo-em-água: MF59 e AS03	35
1.3.1.3	Micro/ Nanopartículas: VLPs, virossomas e ISCOMs	37
1.3.2	Adjuvantes que atuam como imunoestimuladores	38
2	Objetivos	43
2.1	Objetivo geral	43
2.2	Objetivos específicos	43
3	Material e Métodos	44
3.1	Obtenção das proteínas E e NS1 do vírus de febre amarela no sistema <i>E. coli</i> cepa BL21 (E YF BL21)	44
3.1.1	Clonagem das construções recombinantes	44
3.1.2	Expressão e purificação das proteínas E YF (BL21) e NS1 YF (BL21)	46
3.2	Obtenção da proteína E do vírus de febre amarela no sistema <i>E. coli</i> cepa “Shuffle” (E YF “Shuffle”)	48

3.3	Produção de soro policlonal anti E YF e anti NS1 YF para etapas de caracterização	49
3.4	Obtenção das proteínas E e NS1 do vírus de febre amarela no sistema baculovírus/ células de inseto (Sf9)	49
3.4.1	Construção dos plasmídeos doadores pFast Bac Dual/ EctoYF e pFast Bac Dual/ NS1YF	50
3.4.2	Obtenção dos bacmídeos recombinantes	51
3.4.3	Produção dos estoques de baculovírus recombinantes	52
3.4.4	Titulação dos baculovírus recombinantes	53
3.4.5	Caracterização da expressão das proteínas Ecto YF e NS1 YF em baculovírus/ células de inseto	53
3.4.5.1	Detecção por “SDS-PAGE” e “Western Blotting”	53
3.4.5.2	Cinética de expressão e distribuição intracelular por imunofluorescência	54
3.4.5.3	Avaliação de diferentes MOIs para aumentar a expressão	55
3.4.5.4	Avaliação da presença de glicosilação	55
3.4.6	Construção de proteína Ecto YF contendo sequência sinal para excreção celular	55
3.4.7	Cultivo de células Sf9 em suspensão em frascos tipo “spinner” e infecção com baculovírus recombinantes para expressão das proteínas de interesse	56
3.4.8	Purificação da proteína recombinante E ecto YF (Sf9)	56
3.5	Obtenção do vírus de febre amarela 17DD inativado (FA 17DD inativado) em células Vero	57
3.5.1	Titulação viral por contagem de placas de lise	58
3.5.2	Quantificação viral por ensaio imunoenzimático (ELISA)	58
3.6	Obtenção da proteína recombinante E-1T expressa em <i>Nicotiana benthamiana</i>	59
3.7	Ensaio em modelo animal	60
3.7.1	Preparo das formulações	61
3.7.2	Ensaio I: Escolha do antígeno modelo e determinação de sua dose	62
3.7.3	Ensaio II: imunogenicidade e proteção induzida por formulações de vírus inativado com diferentes adjuvantes	63

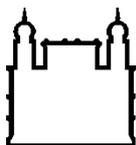
3.7.4	Ensaio III: imunogenicidade e proteção induzida por formulações de antígenos de subunidade com diferentes adjuvantes	64
3.7.5	Ensaio IV: imunogenicidade e proteção induzida pelas melhores formulações avaliadas e duração da imunidade	65
3.8	Caracterização da resposta imune humoral induzida pelas formulações em camundongos	66
3.8.1	Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT ₅₀)	66
3.8.2	Dosagem de IgG total por ELISA	67
3.8.3	Dosagem dos subtipos de IgG	68
3.9	Caracterização da resposta imune celular induzida pelas formulações em camundongos	69
3.9.1	Dosagem de citocinas por ELISpot	69
3.9.2	Dosagem de Células B secretoras de anticorpos por ELISpot	70
3.10	Análise estatística dos resultados	71
4	Resultados	72
4.1	Obtenção das proteínas E e NS1 de febre amarela no sistema <i>E. coli</i> cepa BL21 (E YF BL21)	72
4.1.1	Expressão e purificação das proteínas E YF e NS1 YF	72
4.1.2	Produção de soro policlonal anti E YF e anti NS1 YF para etapas de caracterização	73
4.2	Obtenção da proteína E de febre amarela no sistema <i>E. coli</i> cepa “Shuffle” (E YF “Shuffle”)	75
4.3	Obtenção da proteína E de febre amarela no sistema baculovírus/ células de inseto (E YF Sf9)	76
4.3.1	Expressão e distribuição intracelular por imunofluorescência	76
4.3.2	Avaliação da presença de glicosilação	77
4.3.3	Construção de proteína E ecto YF contendo sequência sinal para excreção celular	77
4.3.4	Otimização das condições de infecção em Sf9 para expressão das proteínas recombinantes	78
4.3.5	Purificação da proteína recombinante E ecto YF (Sf9)	78
4.4	Ensaaios em modelo animal	80

4.4.1	Ensaio I: escolha do antígeno modelo e determinação de sua dose	80
4.4.1.1	Determinação da sobrevivência ao desafio IC	80
4.4.1.2	Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT ₅₀)	81
4.4.1.3	Dosagem de IgG total por ELISA	82
4.4.2	Ensaio II: imunogenicidade e proteção induzida por formulações de vírus inativado com diferentes adjuvantes	83
4.4.2.1	Determinação da sobrevivência ao desafio IC	83
4.4.2.2	Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT ₅₀)	85
4.4.2.3	Dosagem de IgG total por ELISA	86
4.4.3	Ensaio III: imunogenicidade e proteção induzida por formulações de antígenos de subunidade com diferentes adjuvantes	87
4.4.3.1	Determinação da sobrevivência ao desafio IC	87
4.4.3.2	Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT ₅₀)	89
4.4.3.3	Dosagem de IgG total por ELISA	90
4.4.4	Ensaio IV: imunogenicidade e proteção induzida pelas melhores formulações avaliadas e duração da imunidade	91
4.4.4.1	Determinação da sobrevivência ao desafio IC	92
4.4.4.2	Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT ₅₀)	94
4.4.4.3	Dosagem de IgG total por ELISA	95
4.4.4.4	Dosagem dos subtipos de IgG	96
4.4.4.5	Dosagem de citocinas por ELISpot	99
4.4.4.6	Dosagem de Células B secretoras de anticorpos por ELISpot	100
4.4.5	Duração da imunidade	104
5	Discussão	106
5.1	Expressão das proteínas recombinantes E e NS1 em sistema procaríoto	106
5.2	Expressão das proteínas recombinantes E e NS1 no sistema baculovírus/ células de inseto	108

5.3	Avaliação da proteína E-1T em plataforma vegetal (<i>N. benthamiana</i>) como antígeno candidato para estudo de novos adjuvantes	111
5.4	Avaliação do vírus inativado FA17DD como candidato para estudo de novos adjuvantes	112
5.5	Comparação das melhores formulações testadas	119
5.6	Influência do antígeno no desempenho da formulação	122
5.7	Considerações gerais	123
6	Conclusões	126
7	Bibliografia	129
	Anexos	146

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ****VACINAS EXPERIMENTAIS PARA FEBRE AMARELA COMO MODELO DE
AVALIAÇÃO DE NOVOS ADJUVANTES****RESUMO**

A vacina de febre amarela atenuada é uma das mais bem-sucedidas já desenvolvidas. Entretanto, restrições de administração para pacientes imunodeprimidos e raros eventos adversos associados são desvantagens que motivam o desenvolvimento de vacinas mais seguras. À medida que aumenta a segurança, a imunogenicidade diminui na ausência de replicação viral. Nesse contexto, adjuvantes são elementos chave na ativação da imunidade inata para modulação das respostas adaptativas e proteção. Adjuvantes de diferentes naturezas e mecanismos de ação têm sido estudados: imunoestimuladores como agonistas de TLR, carreadores de antígenos e agentes de efeito depósito. Nesse estudo pretendemos identificar adjuvantes promissores para o desenvolvimento de novos candidatos vacinais para febre amarela. Para isso, camundongos C57BL/6 foram imunizados com diferentes formulações de antígenos modelo (vírus inativado e proteínas de envelope recombinantes produzidas em diferentes sistemas de expressão) com os adjuvantes: Al(OH)₃; Addavax (emulsão baseada em esqualeno); combinações de Al(OH)₃ e Flagelina FliC (agonista de TLR5); e CAF01 (nanopartícula) em esquema de 2 doses (D0 e D28) ou 3 doses (D0, D14 e D28). Após a imunização, os camundongos foram desafiados com inóculo letal do vírus de febre amarela por via intracerebral para determinar as taxas de sobrevivência. Os soros foram analisados por ELISA e PRNT₅₀ para detecção dos títulos de IgG total e anticorpos neutralizantes. O vírus FA17DD inativado apresentou o melhor desempenho como antígeno modelo, sendo capaz de induzir 100% de proteção ao desafio após imunização com 2 doses na formulação com o adjuvante Addavax e 70% de proteção na formulação com hidróxido de alumínio. Os demais adjuvantes avaliados (Al(OH)₃/ Flagelina FliC e CAF01) não foram capazes de gerar incremento de proteção com os antígenos avaliados. As formulações experimentais com melhor desempenho (FA17DD inativado/Addavax e FA17DD inativado/Al(OH)₃) foram avaliadas em um segundo ensaio para melhor caracterização das respostas imunológicas envolvidas na proteção. Ambas foram capazes de induzir apenas níveis basais de anticorpos neutralizantes; porém altos títulos de IgG para o vírus da febre amarela com predomínio do subtipo IgG1. A caracterização das respostas celulares locais (ELISpot citocinas e células B) no sítio de inoculação nos tempos pré e pós-desafio revelou níveis superiores de IFN γ nos animais sobreviventes. Após o desafio, todos os animais sobreviventes apresentaram altos títulos de anticorpos neutralizante e IgG total, com incremento do subtipo IgG2a. O uso de Addavax como adjuvante para vacinas não vivas para febre amarela surge como uma alternativa promissora de induzir proteção com menor número de doses. A aplicação do modelo de desafio murino para febre amarela na avaliação de novos adjuvantes se mostrou uma abordagem promissora para a avaliação de novos adjuvantes para uso neste modelo, bem como na geração de conhecimentos extrapoláveis para outros candidatos vacinais em desenvolvimento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EXPERIMENTAL VACCINES FOR YELLOW FEVER AS EVALUATION MODEL FOR NEW ADJUVANTS

ABSTRACT

Attenuated Yellow Fever vaccine is one of the most successful vaccines ever developed. Nonetheless, restrictions of administration to immunosuppressed and rare adverse events are drawbacks that stimulate the development of safer non-live approaches. As safety increases, however, immunogenicity decreases due to the lack of viral replication. In this context, adjuvants are key elements to activate innate immunity and shape the desired adaptive responses and protection. Adjuvants of different natures and mechanisms of action have been studied: immune potentiators like TLR agonists, antigen carriers and depot effect agents. In this study, we intend to identify promising adjuvants for development of vaccine candidates for yellow fever virus (YFV). C57BL/6 mice were immunized with different model antigens (inactivated virus and recombinant envelope proteins produced in different expression systems) formulated with different adjuvants: Al(OH)₃; Addavax (squalene-based emulsion), a combination of Al(OH)₃ and Flagellin FliC (TLR5 agonist); CAF01 (nanoparticle) in 2-dose (D0 and D28) or 3-dose (D0, D14 and D28) schedules. After immunization, mice were challenged by lethal intracranial inoculation of YFV to determine survival rates. Sera were analysed by ELISA and PRNT₅₀ for detection of total IgG and neutralizing antibodies against YFV. The inactivated FA17DD virus presented the best performance as a model antigen, being able to induce 100% of protection after immunization in 2-dose schedule in the formulation with Addavax; and 70% protection in the formulation with aluminum hydroxide. The other adjuvants evaluated (Al (OH) 3 / Flagellin FliC and CAF01) were not able to induce protection with the evaluated antigens. The best performance experimental formulations (FA17DD inactivated / Addavax and FA17DD inactivated / Al (OH)₃) were evaluated in a second experiment to better characterize the immunological responses involved in protection. Both of which were able to induce only basal levels of neutralizing antibodies, but high titers of IgG against yellow fever virus, with predominance of IgG1 subtype. The characterization of the local cellular responses (ELISpot cytokines and B cells) at the inoculation site in the pre- and post-challenge times revealed higher levels of IFN γ in the surviving animals. After challenge, all survivors developed high titers of neutralizing antibody and total IgG, with predominance of IgG2a subtype. The use of Addavax as adjuvant for non-live yellow fever vaccines appears as a promising alternative to induce protection and dose spare. The application of the murine challenge model to yellow fever in the evaluation of new adjuvants has proved to be a promising approach for the evaluation of new adjuvants for use in this model, as well as the generation of knowledge applicable for other vaccine candidates in development.

1. Introdução

1.1 Febre Amarela: Aspectos gerais

A febre amarela (FA) possui como agente etiológico o vírus-protótipo do gênero *Flavivirus* (do latim *flavus*, que significa amarelo), família *Flaviviridae*. Esse gênero contém cerca de 70 vírus RNA fita simples, transmitidos em sua maioria, por mosquitos e carrapatos. A doença causada pelo vírus da febre amarela é uma febre hemorrágica viral clássica. Trata-se de uma doença sistêmica caracterizada por viremia com altos títulos de vírus circulantes, lesões hepáticas, renais e no miocárdio, hemorragia e alta letalidade.

O vírus da febre amarela possui uma gama de hospedeiros disponíveis para infecção produtiva. Sua manutenção na natureza é mediada principalmente pela transmissão entre primatas não humanos (PNH) e mosquitos dos gêneros *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes* (*Stegomyia*) na América do Sul e África, respectivamente, caracterizando o ciclo silvestre da doença. Ambos os gêneros de mosquito realizam transmissão transovariana, contribuindo para maior dispersão do vírus na natureza (Monath, Cetron & Teuwen, 2012). Humanos são infectados esporadicamente quando mordidos por mosquitos do ciclo silvestre que tenham feito repasto sanguíneo em um macaco virêmico previamente. Em um pior cenário, o homem também pode servir de hospedeiro para transmissão entre humanos, mediada principalmente pelo vetor *Aedes aegypti*, dando origem ao ciclo urbano da febre amarela. Esta espécie de mosquito cresce em frascos com restos de água em habitações e no peridomicílio, sendo o principal vetor do ciclo urbano. A epidemiologia da FA na África, além de contar com a participação dos vetores dos ciclos silvestre e urbano na transmissão entre humanos, possui ainda um terceiro ciclo, conhecido com ciclo da savana ou intermediário (Figura 1.1). Sendo assim, a força de infecção na África é 20 a 30 vezes maior que na América do Sul e, conseqüentemente, ocorrem grandes epidemias. Nos últimos anos, esforços têm sido feitos para aumentar a cobertura vacinal em populações de países do oeste da África sob alto risco de febre amarela, a fim de reduzir grandes epidemias (Monath & Vasconcelos, 2015).

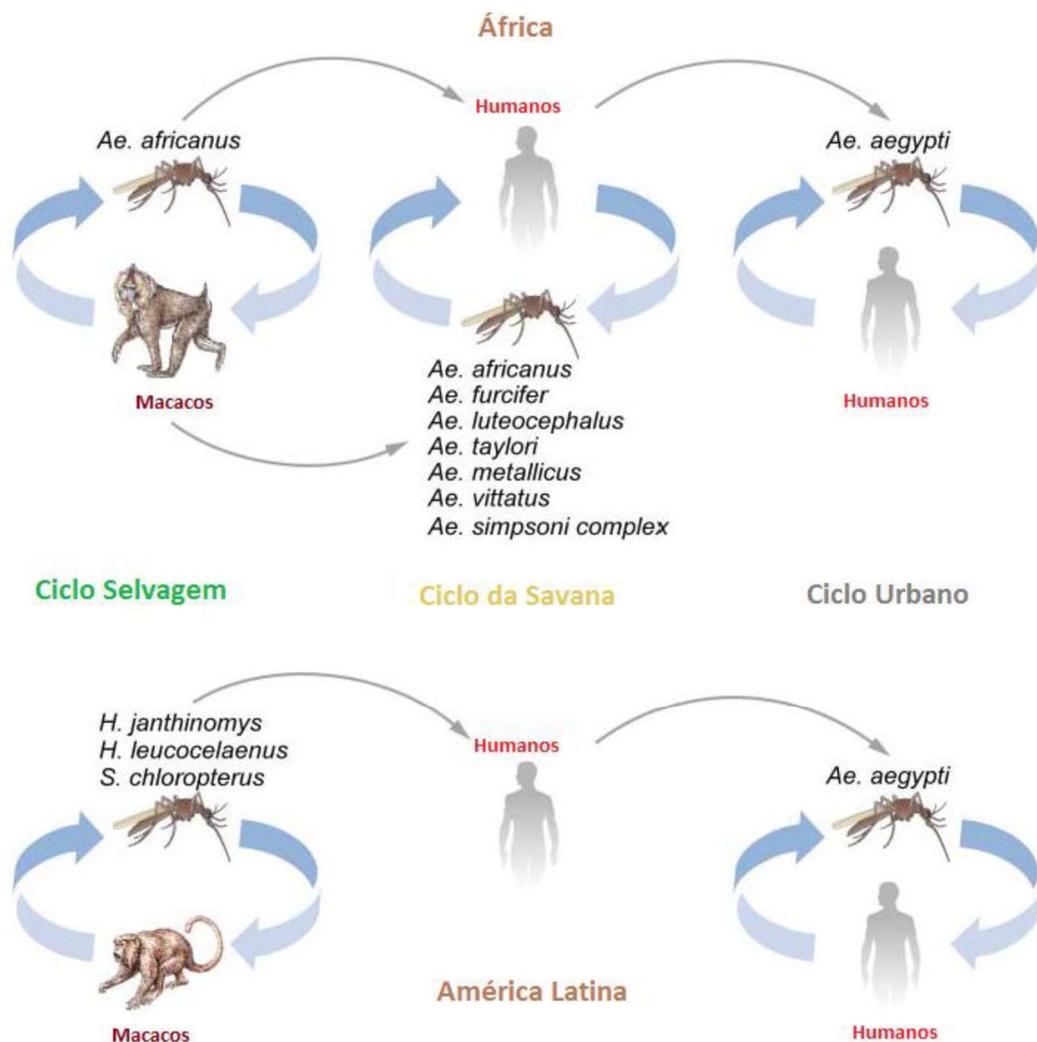


Figura 1.1: Ciclos de transmissão do vírus da febre amarela na África e na América Latina, representando os ciclos selvagem, da savana (intermediário) e urbano. Extraído e adaptado de Barrett & Higgs, 2007.

A febre amarela foi uma grande ameaça à saúde humana do século 18 ao início do século 20, com repetitivas epidemias. A identificação do *Ae. aegypti* como transmissor em 1900 e os subsequentes esforços de controle do vetor contribuíram para a redução dessa virose fora de zonas tropicais endêmicas. O desenvolvimento da vacina atenuada em 1930 também foi fundamental para o controle da doença. O último caso relatado de FA urbana havia sido no Acre, em 1942. Uma intensa campanha de erradicação foi conduzida para eliminação do *Ae. aegypti* na década de 1950, mas o vetor foi reintroduzido nos anos 70 e atualmente encontra-se amplamente distribuído em todo o território nacional. Sendo assim, episódios de ressurgimento da febre amarela ocorrem em zonas endêmicas sem vacinação de rotina e constituem uma ameaça constante de reintrodução da doença, principalmente num mundo globalizado (Monath & Vasconcelos, 2015).

1.1.1 O “status” da epidemia de Febre Amarela no Brasil

O Brasil experimentou recentemente a sua maior epidemia de FA silvestre em décadas, com 2043 casos confirmados e 676 mortes a partir de dezembro de 2016 (Faria *et al*, 2018).

Até a segunda metade do século XX, o vírus de FA era endêmico no Norte (Bacia Amazônica) e Centro-oeste do Brasil. A partir de 1999, o vírus começou a se espalhar nas direções sul e sudeste do país, de onde esteve ausente por décadas (Vasconcelos, 2010; Almeida *et al*, 2014). O espalhamento viral tem ocorrido nas áreas onde a vacina para FA não era recomendada, sendo facilitado pela baixa cobertura vacinal. A rápida disseminação espacial do vírus para as regiões sudeste e sul do país, agora circulando em fragmentos da Floresta Atlântica próximas a áreas periurbanas populosas de megalópoles como São Paulo e Rio de Janeiro (Figura 1.2), levou a um aumento exponencial do número de casos de febre amarela durante a epidemia vigente, com risco considerável de reurbanização da doença (Possas *et al*, 2018). Entre dezembro de 2016 e junho de 2017, foram confirmados 777 casos humanos de FA por PCR ao longo de 10 estados brasileiros. O maior número de casos relatados ocorreu em Minas Gerais (60%), seguido do Espírito Santo (32%), Rio de Janeiro e São Paulo (ambos com 3%) (Faria *et al*, 2018). As consequências de uma reintrodução do ciclo urbano seriam catastróficas, já que se estima que 35 milhões de pessoas não vacinadas vivem em áreas com risco de transmissão no Brasil (Shearer *et al*, 2017).

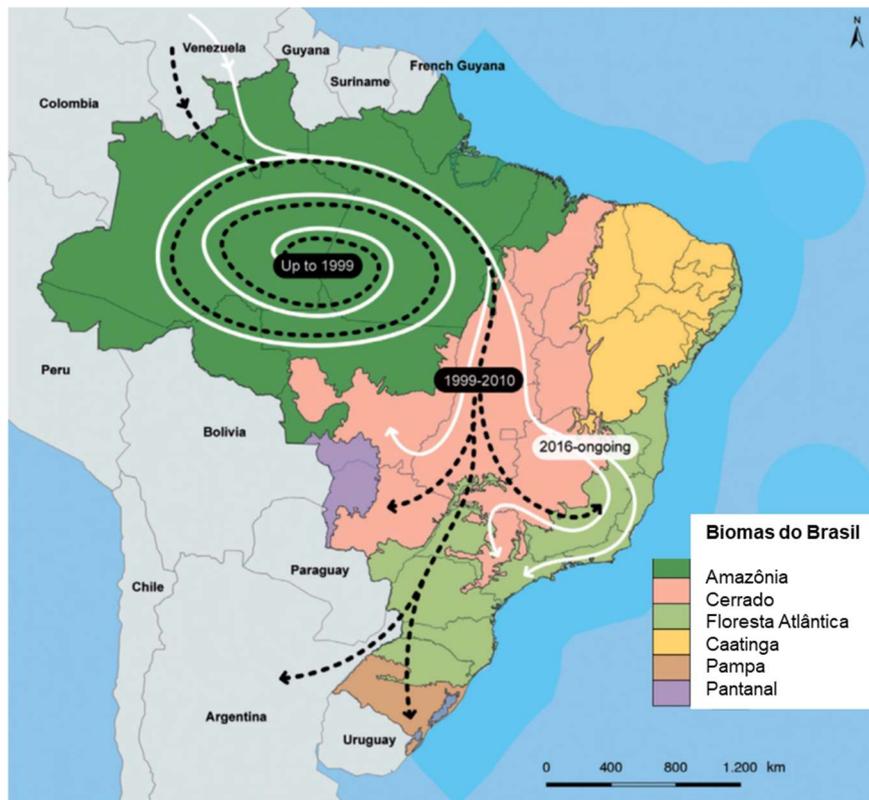


Figura 1.2: Espalhamento do vírus da Febre Amarela: rápido deslocamento interno e entre biomas brasileiros. Linha preta tracejada: espalhamento viral de 1980 a 2010; linha branca: espalhamento viral da primeira metade da década de 2010 em diante, incluindo a epidemia em andamento no Sudeste. Adaptado de Possas *et al*, 2018.

Por se tratar de um vírus de RNA de natureza “quasispecies”, especulações acerca da associação da expansão de atividade do vírus da FA com a emergência de novas linhagens têm sido realizadas. Essas grandes epidemias atípicas têm sido associadas com variantes virais da sub-linhagem moderna 1E do genótipo I sul-americano (Mir *et al*, 2017). A maioria das cepas epidêmicas apresentou algumas substituições de aminoácidos em localizações de proteínas não estruturais envolvidas nas atividades de protease viral (NS3) e polimerase (NS5) (Gómez, 2018). O impacto dessas alterações na performance, patogenicidade e transmissibilidade do vírus ainda é desconhecido. Entretanto, tanto a evidência de seleção positiva, como a coincidência de emergência de mutações com aumento da disseminação viral corroboram um potencial efeito positivo sobre a dispersão do vírus. Estudos filogenéticos e epidemiológicos sugerem que a dinâmica de transmissão da atual epidemia seja primariamente silvestre, com múltiplos ciclos de transmissão em PNH resultando no aumento da exposição humana ao vírus, indicando um papel predominante do ciclo PNH-mosquito-humano na transmissão (Klitting *et al*, 2018a).

Mudanças climáticas, particularmente com aumento de chuvas e altas temperaturas também têm sido associadas com epidemias de FA na África e América do Sul. De acordo com Possas *et al* (2018), a rápida expansão da febre amarela no território está relacionada ao comportamento humano e mudanças ecológicas que contribuíram para um aumento de densidade de mosquitos e PNH e o contato dos mesmos com o homem.

Durante uma epidemia de febre amarela, a realização de inquérito virológico é de importância fundamental para: traçar as origens epidêmicas e focos de transmissão, caracterizar a diversidade genética dos isolados a fim de auxiliar no diagnóstico molecular, detectar mutações associadas a severidade da doença e excluir a possibilidade de casos humanos oriundos de reversão de virulência da vacina (Faria *et al*, 2018). Essas informações são essenciais para fomentar os planos de atuação do governo a fim de controlar a doença.

A disponibilidade restrita de vacinas para FA é uma questão central para expandir a cobertura vacinal na população mundial. Estima-se que entre 303,7 e 472,9 milhões de pessoas que vivem em áreas sob risco de transmissão de FA ainda precisam de vacinação para atingir a cobertura vacinal de 80% requerida para controle da doença segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Shearer *et al*, 2017). Frente a escassez dos estoques vacinais e a existência dos focos emergentes de febre amarela na África no passado, o Ministério da Saúde Brasileiro convocou o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ) para a realização de um estudo dose-resposta com a vacina FA17DD a fim de verificar a imunogenicidade e segurança em formulações com menores doses da vacina (dose fracionada) (Martins *et al*, 2013). Os resultados provaram não só a não inferioridade da resposta induzida a curto e médio prazo, como manutenção da soropositividade nos vacinados por pelo menos 8 anos (período de duração do teste clínico) (Martins *et al*, 2018). Esforços de vacinação emergencial usando a dose fracionada foram montados visando conter o surto em agosto de 2016, em Kinshasa (República Democrática do Congo, África), onde mais de 7 milhões de pessoas, incluindo crianças de 2 anos foram imunizadas com 1/5 da dose da vacina FA17DD no contexto de escassez de vacina. A fim de controlar a expansão da FA para áreas metropolitanas populosas como Belo Horizonte, Rio de Janeiro e São Paulo, onde a vacinação não era originalmente recomendada, foi adotada a iniciativa sem precedentes de imunização de cerca de 26 milhões de pessoas, graças a adoção

dessa mesma estratégia. A partir da adoção dessa abordagem em 2017-2018 no Brasil, mais de 7 milhões de pessoas foram vacinadas com 1/5 da dose padrão até maio de 2018 (Klitting *et al*, 2018b). Cabe ressaltar que a OMS recomenda atualmente a utilização da dose fracionada contendo no mínimo 1000 unidades internacionais (UI) como resposta imediata a surtos durante períodos de escassez da vacina com a dose completa, e que apenas a cepa FA17DD pode ser utilizada para esse fim, uma vez que os dados de imunogenicidade e segurança foram obtidos especificamente para esta cepa vacinal (Chen & Hamer, 2018).

Apesar dos esforços do governo para solucionar a restrição de estoque de vacina disponível e aumentar a cobertura vacinal, a não adesão da população às campanhas tem surgido como uma preocupação iminente. Essa falha de adesão tem sido associada a descrença na eficácia da dose fracionada, bem como em distorções quanto ao risco de surgimento de eventos adversos vacinais disseminados em redes sociais (Possas *et al*, 2018).

A exaustão dos estoques de vacina disponíveis e os picos de ressurgimento de FA nos últimos 3 anos têm sido uma grande preocupação mundial. Viajantes internacionais causaram múltiplos casos importados em países fora de áreas de transmissão. A epidemia no Brasil resultou em casos exportados para 7 diferentes países durante o ano de 2018 (Barrett, 2018) (Figura 1.3).

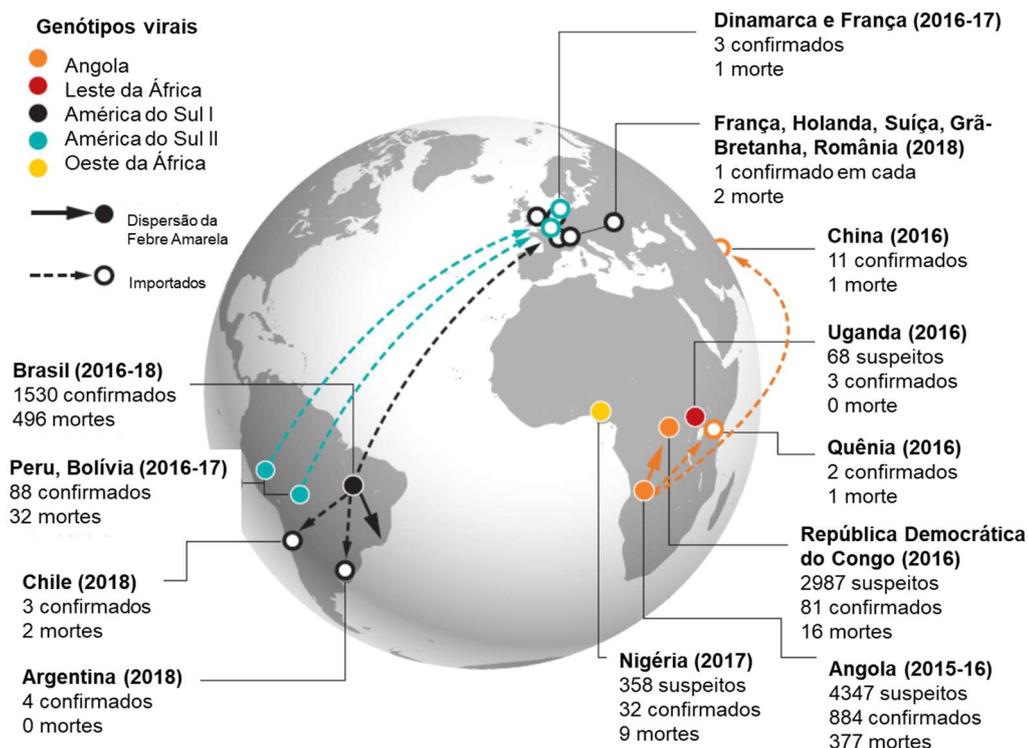


Figura 1.3: Surtos de febre amarela de 2016 a 2018, com casos confirmados e mortes por país. A expansão do vírus identificada pelas linhas com setas. Casos importados para outros países e suas origens estão identificados pelas linhas pontilhadas e setas. Adaptado de Barrett, 2018.

Finalmente, outra iniciativa em andamento para controlar a doença consiste na imunização de PNH em áreas monitoradas como parques e reservas florestais próximas a áreas urbanas, centros de pesquisa e zoológicos. Essa medida não só previne a participação desses animais como reservatórios do vírus e fonte de infecção para mosquitos, como também contribui para a preservação de espécies ameaçadas muito mais susceptíveis a essa infecção. Um estudo piloto tem sido conduzido em micos leões da cara dourada (*Leontopithecus chrysomelas*) e bugios (*Allouatta* sp.) por Bio-Manguinhos, em parceria com o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (Possas *et al*, 2018).

1.1.2 O vírus da febre amarela e seus principais antígenos

O vírus de FA é o vírus protótipo do gênero *Flavivirus*. Estes são partículas pequenas (com cerca de 40 a 60 nm) e possuem como material genético uma fita simples de RNA com polaridade positiva. O genoma do vírus da febre amarela 17D contém 10.862 nucleotídeos, contendo uma única fase de leitura aberta de 10.233

nucleotídeos, cercada por duas regiões não codificantes: 5'UTR (do inglês, "untranslated region") com uma estrutura Cap e 3'UTR desprovida de cauda poliadenilada. As regiões 5' e 3' UTR apresentam estruturas secundárias conformacionais e sequências interativas complementares importantes para a circularização do genoma viral durante o encapsidamento e replicação, atuando como promotores para fitas de RNA negativas e positivas durante a replicação. Portanto, mutações ou deleções nas regiões UTRs afetam a replicação e virulência (Monath *et al*, 2012). O genoma codifica três proteínas estruturais (a proteína C do capsídeo, pré-M da membrana e E do envelope), e outras sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), conforme ilustrado na Figura 1.4 a seguir.

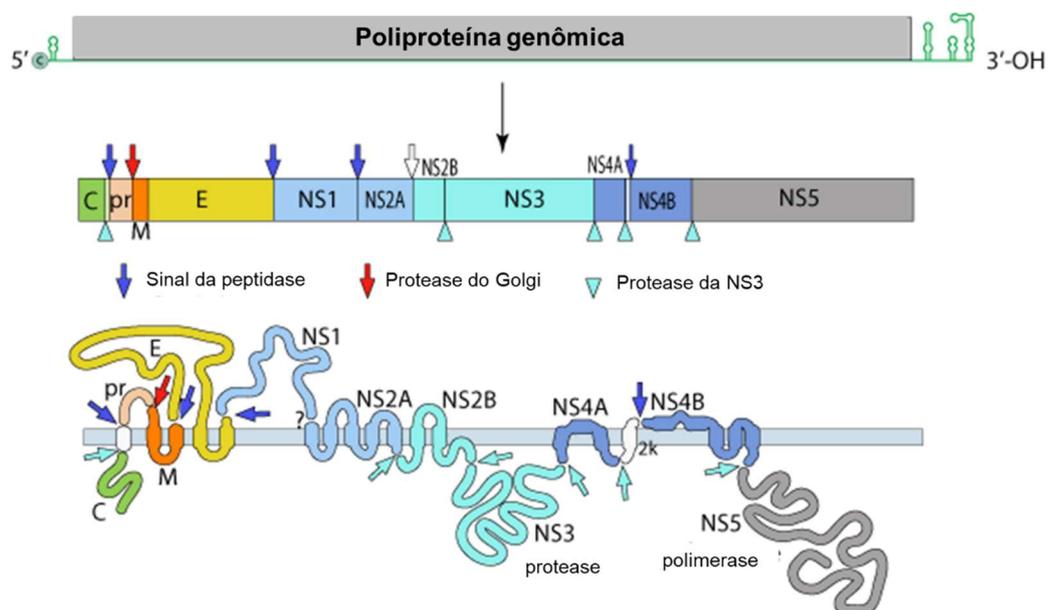


Figura 1.4: Organização genômica dos flavivírus com sua única fase aberta de leitura e suas extremidades não-codificantes. O genoma codifica três proteínas estruturais e sete não estruturais envolvidas na replicação e processamento das proteínas virais. As enzimas envolvidas nas clivagens pós-traducionais são oriundas do hospedeiro ou do processamento da poliproteína viral. Adaptado de https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species. Acesso em 02/12/2018.

As proteínas estruturais participam da estrutura da partícula viral e sua montagem, ao passo que as não estruturais atuam na replicação do RNA, processamento dos polipeptídeos e montagem de partículas (Sampath & Padmanabhan, 2009).

Trata-se de um vírus envelopado, cujo envelope é composto por uma bicamada lipídica oriunda da célula hospedeira, contendo dímeros de proteína E em sua superfície. Por sua natureza lipídica, o vírus é passível de inativação por solventes orgânicos e detergentes. A proteína E, principal antígeno de superfície, pode ser N-

glicosilada e possui determinantes antigênicos distintos, com funções biológicas variando desde hemaglutinação e neutralização, até adesão a receptores celulares e internalização através de fusão de membranas.

O ciclo de replicação viral se inicia com a entrada na célula através de receptores ainda não definidos. As partículas virais são englobadas em vesículas recobertas por clatrin. O nucleocapsídeo é liberado no citoplasma por mudança conformacional do domínio II da proteína E mediada por pH ácido e fusão com a membrana do endossomo. O RNA de polaridade positiva é infeccioso, sendo imediatamente traduzido para a produção das proteínas necessárias para a síntese da fita complementar negativa, conhecida como intermediário replicativo, que servirá de molde para síntese de novas fitas positivas. A fita positiva codifica a replicase, a helicase e outras atividades enzimáticas necessárias para a replicação; bem como enzimas envolvidas no processamento pós-traducional e proteínas estruturais para montagem de novas partículas. Estas são montadas em íntima associação com o retículo endoplasmático (RE). Uma vez montadas, as partículas virais são transportadas em vesículas intracelulares até a membrana celular, onde serão liberadas por exocitose (Sampath & Padmanabhan *et al.*, 2009) (Figura 1.5).

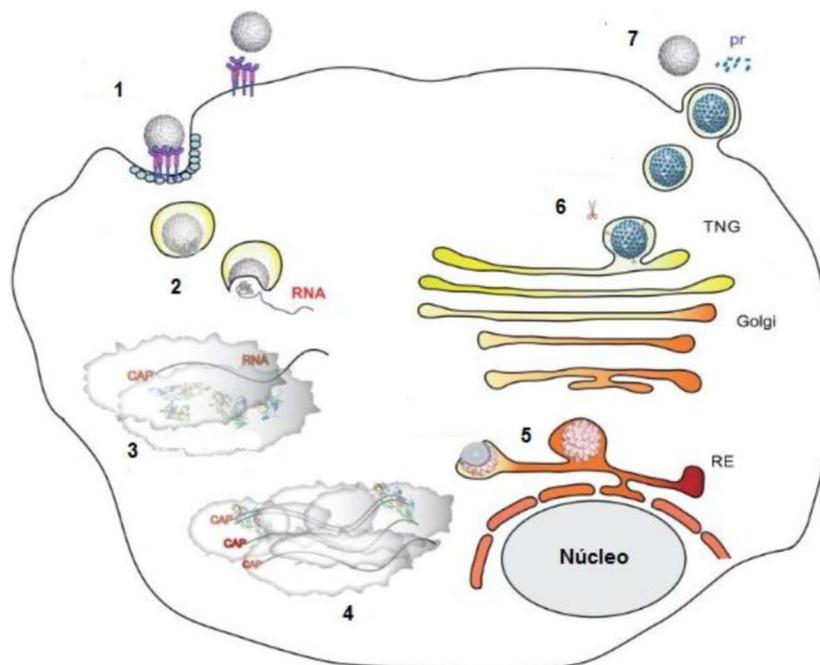


Figura 1.5: Ciclo de replicação dos flavivírus. 1) Adsorção viral (ligação ao receptor celular mediada por endocitose); 2) Fusão à membrana celular dependente de baixo pH, permitindo a liberação do RNA no citoplasma; 3) Tradução do RNA viral em poliproteína; 4) Replicação do RNA viral; 5) Montagem do *virion* no retículo endoplasmático (RE); 6) Maturação do *virion* no complexo de Golgi e clivagem da prM pela furina na rede trans-golgi (TNG); 7) Fusão da vesícula à membrana plasmática e liberação de novos *virions*. Extraído e adaptado de Sampath & Padmanabhan, 2009.

Dentre os possíveis candidatos para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade está a proteína E, descrita como principal alvo de anticorpos neutralizantes (Dowd & Pierson, 2011). A proteína NS1 também é reconhecida como alvo de anticorpos em infecções por flavivírus, que induzem a lise mediada por complemento (Ishikawa *et al*, 2011). Formulações baseadas em E e NS1 têm sido relatadas como favoráveis ao desenvolvimento de respostas mais efetivas (Ishikawa *et al*, 2011; Martínez, Giulietti & Talou, 2012).

A proteína E representa o antígeno dominante do envelope do vírus e possui cerca de 53-54 KDa, sendo composta por um ectodomínio ancorado à membrana através de uma porção c-terminal hidrofóbica denominada haste-âncora (Heinz & Stiasny, 2012). Esta proteína é responsável pela fase inicial de infecção nas células hospedeiras, promovendo a ligação do vírus a receptores presentes na superfície celular, assim como a sua internalização via fusão de membranas. A proteína E é o maior indutor de respostas imunológicas por anticorpos neutralizantes (Vratskikh *et al*, 2013). Sua estrutura geral é altamente conservada entre os flavivírus. O ectodomínio é composto por três domínios: DI, DII e DIII (Figura 1.6). O DIII é um domínio semelhante a imunoglobulina que participa da adesão viral. O DII possui estrutura semelhante a um dedo e contém o peptídeo de fusão, essencial para a entrada viral nas células alvo. O DI conecta os domínios DII e DIII e sofre mudanças conformacionais durante a infecção viral, a fim de expor o peptídeo de fusão. Embora todos esses domínios sejam capazes de induzir anticorpos neutralizantes, o DIII é considerado o mais importante por induzir anticorpos amplamente neutralizantes em infecções por dengue e Vírus do Oeste do Nilo (Beasley & Barrett 2002; Sukupolvi-Petty *et al*, 2007). Entretanto, um estudo mais recente demonstrou que anticorpos de longa duração para febre amarela em humanos são direcionados para os domínios DI e DII após a vacinação com FA17D (Vratskikh *et al*, 2013).

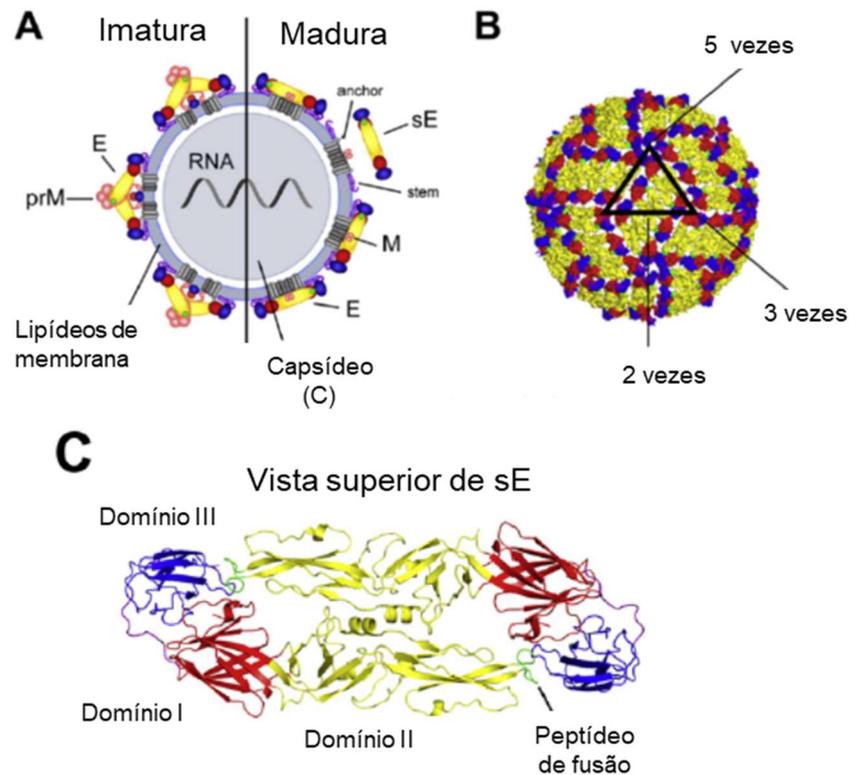


Figura 1.6: Estrutura dos Flavivírus. (A) Representação esquemática da partícula com capsídeo esférico contendo RNA (fs)*. À esquerda: partícula viral imatura e à direita, madura. sE: forma solúvel da proteína E, sem região haste-âncora. M: produto de clivagem da proteína prM associado a membrana. Os domínios de E estão ilustrados em diferentes tons de cinza (DIII: escuro, DI: intermediário e DII: claro, respectivamente). (B) arranjos dos dímeros de E na superfície do virion elucidados por crio eletromicroscopia. (C) Diagramas em fita da estrutura cristalográfica do dímero de E solúvel obtido do vírus da encefalite transmitida por carrapatos vistos de cima. Domínios da proteína E coloridos em azul (DIII), vermelho (DI) e amarelo (DII). Peptídeo de fusão ilustrado em verde. Adaptado de Heinz & Stiasny, 2012).

Já a proteína NS1 é uma glicoproteína de aproximadamente 46 kDa, descrita como essencial para o processo de replicação viral. Além de atuar na replicação da fita negativa de RNA, apresenta como funções a evasão do sistema imune mediada por inibição da ativação da cascata do sistema complemento e a ativação de TLR2 e TLR6 com indução de forte resposta imune humoral protetora (revisão em Rastogi, Sharma & Singh, 2016). Além de sua forma monomérica encontrada no meio intracelular; a NS1 é encontrada associada à membrana de células infectadas na forma dimérica, ou ainda na forma hexamérica solúvel, após ser secretada para o meio extracelular. Estas características permitem sua utilização como alvo em testes diagnóstico para flavivírus (Chaterji *et al.*, 2011), bem como imunógeno em composições vacinais (Ishikawa *et al.*, 2011).

1.1.3 A vacina atenuada para febre amarela FA17DD

O vírus de febre amarela foi isolado em 1927 por Stokes e colaboradores, a partir de um paciente ganês com sintomas leves da doença, dando origem a cepa selvagem Asibi, assim denominada em virtude do nome do paciente (Pulendran, 2009). A partir da atenuação desta cepa, a vacina FA17D foi desenvolvida originalmente por Theiler e Smith (1937) de maneira empírica, através de 176 passagens seriadas em substratos para crescimento restrito (tecido de embrião de galinha e murino) (Theiler & Smith, 1937b, revisão em Monath *et al.*, 2012). A perda de viscerotropismo e redução na neurovirulência foram obtidas ao longo das passagens subsequentes. Macacos inoculados por vias periféricas não desenvolviam mais encefalite e, aqueles inoculados por via intracerebral desenvolviam alterações histopatológicas, porém com encefalite restrita a apenas 5 a 10% dos animais (Theiler e Smith, 1937a). Os animais vacinados desenvolveram anticorpos e resistiram ao desafio com o vírus Asibi. Após os resultados promissores obtidos nos estudos pré-clínicos, ensaios clínicos em humanos foram conduzidos em 1936, apontando tolerância aceitável e o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (Theiler e Smith, 1937b). Sendo assim, em 1937 a vacina chegou ao Brasil, sendo usada em ensaios de maior tamanho e levando ao estabelecimento da produção local e a realização de campanhas nacionais de vacinação em 1938 (Monath *et al.*, 2012).

Durante a produção inicial da vacina de FA entre 1937 e 1941, diferentes subcepas (linhagens de subcultivo paralelas e independentes) foram utilizadas: subcepa 17D-204 na Fundação Rockefeller em Nova York (correspondente às passagens 235-240 do vírus selvagem Asibi) e FA17DD no Brasil (passagens 287-289). Ambas as subcepas continuam a ser empregadas atualmente na produção da vacina (Barrett e Teuwen, 2009). Com o passar do tempo, o controle da subcepa utilizada, bem como do número de passagens em cultivo celular, demonstrou ter papel essencial no balanço entre o grau de atenuação e a imunogenicidade mínima desejada para garantia de resposta adequada e ausência de efeitos adversos. A partir do reconhecimento da influência das passagens seriadas nas características biológicas da vacina FA 17D, o laboratório do Rio de Janeiro implantou o sistema de lote-semente em 1941. Assim, lotes-semente primário e secundário foram estabelecidos e caracterizados, e a produção de múltiplas bateladas de vacina passou a ser realizada a partir do lote-semente secundário (Post *et al.*, 2001; revisão em Monath *et al.*, 2012). Em 1951, Max Theiler recebeu o prêmio Nobel em Fisiologia ou

Medicina por suas descobertas sobre febre amarela e estratégias de como combatê-la (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1951/theiler/biographical/>).

Atualmente existem seis países produtores de vacina FA17D: França, Estados Unidos, Senegal, Rússia, China e Brasil (Staples *et al*, 2017). Bio-Manguinhos, maior produtor mundial, produz a vacina desde 1937 e é o único que utiliza a subcepa 17DD (Gaspar *et al.*, 2008). Todas as vacinas produzidas são atenuadas e derivadas do vírus FA cepa 17D, produzidas em ovos embrionados e atendem a padrões de segurança e potência estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization_ WHO*, 1998). O desempenho das diferentes vacinas deve atender a um padrão de imunogenicidade, duração da imunidade e segurança; entretanto, variações quanto a subcepa de 17D utilizada, número de passagens e formulação são aceitas, desde que dentro de certos limites. Finalmente, por não serem biologicamente clonadas, as vacinas 17D são constituídas de uma mistura heterogênea de múltiplas subpopulações de vírions apresentando, portanto, variações no tamanho de plaques e sequências nucleotídicas (Barrett, 1997; revisão em Monath *et al.*, 2012).

Conforme relatado acima, a vacina FA produzida no Brasil utiliza a subcepa 17DD, ao contrário dos demais fabricantes que utilizam a 17D-204. Estas subcepas diferem em apenas 10 aminoácidos. Em modelos animais, a subcepa FA 17DD é aparentemente mais neurovirulenta que a 17D-204 (Marchevsky *et al.*, 2003). A produção é padronizada e realizada com controle de qualidade bem estabelecido, abrangendo a avaliação da potência, identidade da sequência, esterilidade e segurança em animais (Monath *et al.*, 2012; Pestana *et al.*, 2018).

O vírus FA da cepa vacinal 17D difere da cepa selvagem Asibi por apenas 68 dos 10.862 nucleotídeos presentes em seu genoma, o que resulta em 32 mudanças de aminoácidos. Dentre as mutações apresentadas, o gene que codifica a proteína E é o mais afetado. Como esta proteína desempenha papel essencial na entrada da célula e escape do capsídeo viral para o citoplasma celular, estas mutações devem contribuir para alterações no tropismo do vírus e, conseqüentemente, devem afetar sua virulência (Monath *et al.*, 2002).

Eventos adversos associados à vacina atenuada FA17D são geralmente leves, atingem de 3-20% dos indivíduos vacinados e incluem reações locais e sistêmicas brandas, que se manifestam 3-7 dias pós imunização. Essas reações sistêmicas são provavelmente consequência da ativação de células T e liberação de citocinas, incluindo interferons do tipo I e TNF- α durante o período de viremia (Monath, 2012).

Reações alérgicas sistêmicas, como anafilaxia e urticária, têm sido reportadas em 1 entre 58.000-131.000 indivíduos após administração da vacina atenuada, sendo mais comuns em pessoas com alergia à proteína do ovo e à gelatina, que são constituintes da vacina (revisão em Barrett, 2007).

Apesar do sucesso da vacina atenuada FA17D, raros casos de eventos adversos graves à todas as vacinas de FA produzidas mundialmente têm sido reportados, como por exemplo a doença neurotrópica (YEL-AND, do inglês, “Vaccine-Associated neurotropic disease”) e a doença viscerotrópica (YEL-AVD, do inglês, “Vaccine-Associated viscerotropic disease”) (Barrett e Teuwen, 2009). A doença neurotrópica acomete tipicamente primo-vacinados e ocorre entre 2-30 dias pós-vacinação. Esta doença pode se desenvolver como: meningoencefalite (invasão direta do sistema nervoso central pelo vírus vacinal), síndrome de Guillain-Barré ou como manifestações autoimunes, nas quais anticorpos ou células T produzidas em resposta à vacina reagem de forma cruzada com epítomos neuronais, levando a danos nos nervos centrais e periféricos. Casos de YEL-AND são normalmente autolimitados, sequelas neurológicas não são comuns e casos de morte são raros (1-2%) (Monath, 2012).

A doença viscerotrópica, por sua vez, apresenta-se como uma falência sistêmica febril de múltiplos órgãos, decorrente da replicação do vírus vacinal em diversos tecidos, mimetizando a FA grave e acometendo primo-vacinados que não tenham imunidade prévia para FA (Barnett, 2007; Hayes, 2007; Monath, 2012). O aparecimento dos sintomas neste caso é mais precoce (3-8 dias), semelhante ao período de incubação do vírus selvagem (Monath, 2012). Esta síndrome também evolui como a doença natural, caracterizada inicialmente por febre alta, mialgia, artralgia e dor de cabeça. Rapidamente progride com elevação das enzimas hepatocelulares, hiperbilirrubinemia, linfocitopenia, trombocitopenia, hipotensão, falência respiratória e renal. Imunohistoquímica dos tecidos revela disseminação viral em vários órgãos como o fígado, pulmões, baço, linfonodos, coração, cérebro e músculo liso (Barrett *et al.*, 2007).

Apesar das diversas especulações acerca de possíveis mutações nas cepas vacinais e reversão de virulência do vírus atenuado, nenhuma dessas hipóteses foi comprovada no estudo de casos clínicos de eventos adversos graves (Galler *et al.*, 2001). O surgimento desses casos tem sido associado a presença de fatores genéticos do hospedeiro (Hayes, 2007). Existem evidências em modelos animais e em humanos, de que alguns genes implicados nos estágios iniciais da resposta

antiviral, como OAS (2,5-oligoadenilato sintetase), devem estar disfuncionais em alguns indivíduos com disponibilidade genética ao vírus (Monath, 2012). Deficiências em mecanismos da resposta imune inata podem ser responsáveis pelas elevadas viremias observadas na YEL-AVD, desencadeando a resposta inflamatória sistêmica característica da doença viscerotrópica (Hayes, 2007).

1.1.4 A resposta imunológica

Recentemente grande interesse tem se voltado para a compreensão das respostas imunológicas desencadeadas por vacinas bem-sucedidas. Neste contexto, vários trabalhos têm abordado as respostas ativadas pela vacina de febre amarela, por se tratar de uma vacina atenuada amplamente utilizada desde 1937, cuja imunidade de longa duração é obtida a partir de uma única dose (Pulendran, 2009; Liang, Lee e Jin, 2015).

Além do estímulo de altos títulos de anticorpos neutralizantes incitados pelo vírus vacinal FA 17D, potentes respostas por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos também têm sido demonstradas (Akondy *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2008) (Figura 1.7A).

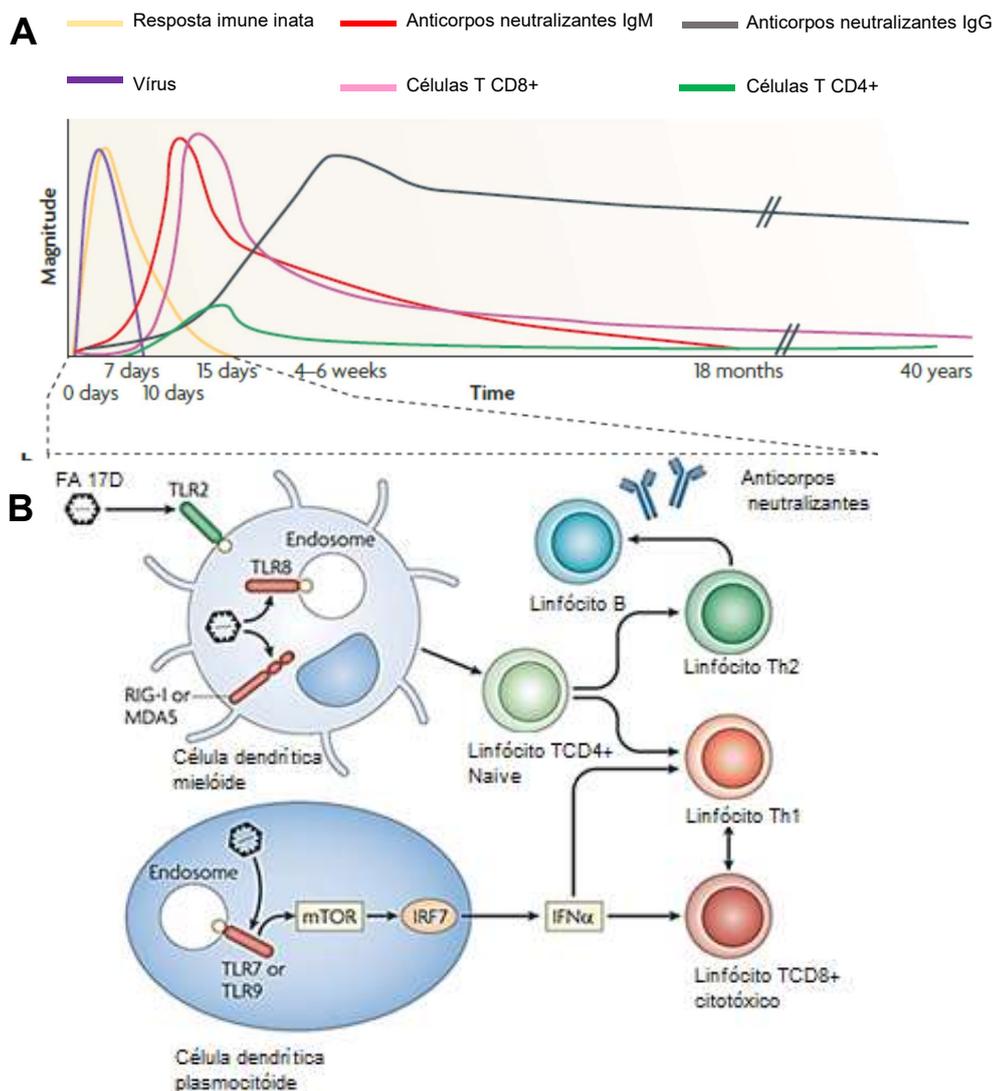


Figura 1.7: Respostas imunológicas para febre amarela. A: Cinética de resposta inata e adaptativa após a imunização com a vacina atenuada FA17D. B: Sinalização do vírus FA via múltiplos TLRs. Adaptada de Pulendran, 2009.

Estudos recentes têm sugerido o sistema imune inato como determinante crítico da força e qualidade da resposta adaptativa. Segundo Querec *et al.* (2006) o vírus FA 17D ativa múltiplas células dendríticas via receptores semelhantes a Toll (“Toll-like receptors”, TLR) 2, 7, 8 e 9, levando a uma resposta imune polivalente e balanceada. O estímulo de TLR 2 promove a via Th2, ao passo que a ativação dos TLRs 7, 8 e 9 favorecem a via Th1 (Gaucher *et al.*, 2008). Uma vez que ocorra o reconhecimento do patógeno via TLR, células dendríticas imaturas amadurecem e migram para as áreas ricas em células T nos linfonodos drenantes da região, onde realizam a apresentação do antígeno para desenvolvimento da resposta adaptativa e memória imunológica. Os diferentes receptores TLRs estimulados promoverão diferentes cascatas de citocinas contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta Th1/ Th2 balanceada (Figura 1.7B).

Vacinas que ativam múltiplos TLRs promovem uma imunidade protetora baseada em diferentes mecanismos. A resposta polivalente promovida pela vacina de FA17D inclui uma potente produção de interferon gama (IFN γ) (Neves *et al.*, 2010), a indução de uma resposta celular citotóxica por linfócitos T CD8⁺ (Akondy *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2013) e eficiente indução de anticorpos neutralizantes, que podem persistir por até 40 anos pós-vacinação (revisão em Pulendran *et al.*, 2009).

Respostas imunológicas celulares são um braço essencial da imunidade adaptativa. Em pacientes imunizados com a vacina atenuada, células dendríticas apresentam antígenos para linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, ativando esses tipos celulares. Após o controle da infecção viral, a maioria dos linfócitos T efetores entra em apoptose e apenas uma pequena proporção se diferencia em células de memória (Liang, Lee & Jin, 2015). Linfócitos T CD8⁺ podem eliminar células infectadas diretamente ou inibir a replicação viral através de citocinas antivirais. Após a vacinação, uma viremia transiente pode ser detectada entre 3 a 14 dias, com pico no 7º dia. Em associação com a viremia transiente, células T CD8⁺ podem ser detectadas do 7º ao 30º dia, atingindo seu pico de produção no 15º dia. Esse período coincide com a produção de IFN γ (Miller *et al.*, 2008). A vacina atenuada é capaz de induzir linfócitos T CD8⁺ polifuncionais, de grande capacidade proliferativa e fenótipo de memória de longa duração, que podem servir como importantes biomarcadores de proteção (Liang, Lee & Jin, 2015). Já os linfócitos T CD4⁺ polifuncionais (IL-2⁺, IFN γ ⁺, TNF α ⁺ ou IL4⁺) são detectados do 2º ao 14º dia pós vacinação, com pico de proliferação no 10º dia; mais precocemente que os linfócitos T CD8⁺ (Gaucher *et al.*, 2008). Uma vez induzidas, células T CD4⁺ de memória podem persistir por até 5 anos. Estas células T CD4⁺ polifuncionais promovem estímulo para células T CD8⁺ e células B, sendo também correlacionadas com a proteção mediada pela vacina atenuada FA17D (Liang, Lee & Jin, 2015).

A indução de anticorpos neutralizantes é considerada o principal correlato de proteção contra o vírus da FA (Monath *et al.*, 2012). Em humanos, quase 100% dos vacinados soroconvertem 21 dias após a vacinação. Após a imunização, anticorpos IgM são detectados a partir do 8º dia e atingem o pico de produção no 14º dia. Já os anticorpos IgG começam a aparecer entre o 10º e 17º dia pós vacinação. A presença de anticorpos neutralizantes tem sido relatada por até 60 anos pós vacinação, sugerindo que uma única dose da vacina seja suficiente para promover imunidade duradoura por toda a vida (Gotuzzo, Yactayo & Cordova, 2013). Apesar desta premissa, estudos de duração da imunidade conduzidos na população brasileira

revelaram que os títulos de anticorpos neutralizantes após 10 anos decaem e, pelo menos mais uma dose de reforço deveria ser aplicada (Campi-Azevedo *et al*, 2016). A necessidade de dose de reforço para manutenção de títulos de anticorpos neutralizantes protetores também já foi corroborada por Muyanja e colaboradores (2014) na população africana. Neste estudo, a eficiência da vacinação com a vacina atenuada foi comparada nas populações africana e europeia (coortes em Entebbe, Uganda versus Lausanne, Suíça), enfatizando a contribuição dos diferentes “backgrounds” genéticos e inflamatórios sobre o desfecho das respostas imunológicas observadas.

Anticorpos também são direcionados a outros antígenos virais, além da proteína E, como a proteína NS1. Apesar desta proteína não estar exposta na superfície do vírus, ela pode ser encontrada associada à membrana de células infectadas. Anticorpos contra este alvo promovem a lise de células infectadas via sistema complemento (Schlesinger, Foltzer & Chapman, 1993).

1.1.5 Modelos animais disponíveis

Estudos da resposta imunológica em humanos têm permitido determinar os fenótipos e reatividade das respostas imunológicas ao vírus da FA17D (Costa-Pereira *et al*, 2018). Entretanto, questões acerca dos mecanismos de proteção e interações vírus-hospedeiro não podem ser esclarecidas em humanos, já que infecções experimentais não são permitidas. Nesse contexto, modelos animais são ferramentas essenciais para estudar respostas primárias ao vírus FA selvagem, respostas protetoras induzidas pelo vírus vacinal, mapear mutações que contribuam para atenuação e imunogenicidade viral e facilitar o desenvolvimento de novos candidatos vacinais.

PNH são os modelos mais relevantes para febre amarela frente a sua proximidade genética com os humanos e sua susceptibilidade natural a infecção pelo vírus da FA. Macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) desenvolvem febre hemorrágica severa com sintomas semelhantes a humanos e, uma vez vacinados com FA17D, desenvolvem títulos de anticorpos protetores correlacionados com proteção ao vírus. Entretanto, apenas poucos estudos abordaram as respostas celulares utilizando este modelo, devido à sua natureza variável (“outbred”) resultando em diferentes haplótipos de complexo principal de histocompatibilidade (do inglês “Major histocompatibility complex”, MHC) (Watson & Klimstra, 2017).

Modelos murinos são ferramentas particularmente interessantes para estudar a resposta imunológica pela disponibilidade de linhagens isogênicas com haplótipos de MHC conhecidos, biologia bem caracterizada e grande disponibilidade de reagentes. Apesar dessas vantagens, camundongos são refratários a infecções pelo vírus da FA devido à restrição por interferon do tipo I ($IFN\alpha/\beta$). Quando imunizados por via periférica (subcutânea, por exemplo), quase nenhuma replicação viral é detectada e, conseqüentemente, repostas celulares ($TCD4^+$ e $TCD8^+$) e humorais (anticorpos neutralizantes) não são desencadeadas (Meier *et al*, 2009).

Alternativas foram desenvolvidas para utilizar camundongos como modelo de estudo para FA, como a infecção por via intracerebral (Theiler, 1930) e camundongos “knockout” depletados de receptores de interferon do tipo I (linhagem AG129) (Meier *et al*, 2009).

Camundongos “knockout” para interferon do tipo I permitem a replicação viral quando imunizados por via subcutânea, servindo de modelo para estudar a doença clínica viscerotrópica, com infiltrados imunológicos e esteatose no fígado após a inoculação com o vírus selvagem. Paralelamente, a imunização com o vírus vacinal FA17D neste modelo permite estudar a replicação viral restrita a compartimentos linfoides, como linfonodos, baço e medula óssea. A imunização com vírus FA17D é capaz de proteger contra o desafio com vírus selvagem neste modelo (Meier *et al*, 2009). Entretanto, tendo em vista a participação do interferon na ativação e proliferação de células T, essa linhagem não é considerada adequada para estudar respostas celulares e análise da imunidade induzida por vacinação (Watson & Klimstra, 2017).

O modelo de infecção intracerebral, apesar de não retratar a via de infecção natural da doença, é capaz de induzir a infecção em camundongos imunologicamente hígidos. Bassi e colaboradores (2015) caracterizaram a contribuição de mecanismos efetores para obtenção de proteção nesse modelo, utilizando camundongos C57BL/6 normais e deficientes: “knockouts” para MHC I e MHC II; deficientes para células B; perforina e/ou $IFN\gamma$; Rag I; CD40L e CXCR5. Além da resposta humoral de anticorpos neutralizantes como mecanismo protetor, células T $CD8^+$ contribuem significativamente para controle da replicação viral no cérebro nesse modelo, através da produção de perforina e $IFN\gamma$ (Bassi *et al*, 2015).

1.2 Antígenos não vivos como alternativas vacinais

Apesar das inúmeras qualidades apresentadas, a vacina FA17DD atenuada tem limitações como: uso contraindicado para pacientes imunocomprometidos (vacina atenuada com replicação viral ativa) e pessoas alérgicas a ovalbumina (produzida em ovos embrionados). Somado a estas limitações, episódios raros de eventos adversos já discutidos acima (item 1.1.3), têm servido de motivação para o desenvolvimento de vacinas mais seguras, como abordagens baseadas em vacinas inativadas e de subunidade.

1.2.1 Vacinas de subunidade

Vacinas de subunidade, que consistem em um ou mais epítomos ou proteínas antigênicas, são grandes promessas para o desenvolvimento de novas vacinas (Rigano e Walmsley, 2005). A ausência de um vírus replicativo elimina a possibilidade de indesejadas reversões e ineficiente atenuação ou inativação, tornando essa vacina mais segura para uso e produção, em comparação às vacinas atenuadas e inativadas (revisão em Martínez, Giulietti & Talou, 2012).

A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* vem sendo classicamente explorada por sua versatilidade e capacidade de produção em grande escala. Entretanto, frente à limitação desse sistema em realizar modificações pós-traducionais, a expressão de proteínas recombinantes no sistema Baculovírus/ células de inseto e em plataforma vegetal têm se tornado alternativas promissoras. Sendo assim, as proteínas recombinantes foram expressas nos diferentes sistemas a fim de avaliar as possíveis interferências conformacionais pelo padrão de glicosilação e possíveis impactos na resposta imune protetora, para seleção de candidatos vacinais promissores.

1.2.1.1 Sistema de expressão procarioto

A expressão em *Escherichia coli* se mantém como a estratégia mais popular de produção de proteínas recombinantes para aplicações acadêmicas e industriais. A velocidade e facilidade de manipulação genética, somadas a variedade de ferramentas disponíveis e conhecimento publicado disponível, contribuem para a manutenção do interesse nesse sistema de expressão (Ke & Berkmen, 2014).

Processos de cultivo bacteriano em meios de cultura de baixo custo são estabelecidos com crescimento rápido, atingindo altas concentrações da proteína de interesse, porém muitas vezes na forma de agregados denominados corpúsculos de inclusão (Vallejo & Rinas, 2004). Apesar da expressão em corpúsculos de inclusão ser aparentemente uma desvantagem desse sistema, ela pode permitir a obtenção de proteína com alto grau de pureza numa fração agregada e protegida da degradação proteolítica do compartimento solúvel. Estratégias de purificação de corpúsculos de inclusão podem ser realizadas a partir de protocolos de lavagens com lisozima e centrifugações, seguidos de solubilização com altas concentrações de agentes caotrópicos (ureia e guanidina), detergentes (dodecil sulfato de sódio, sarcosil, Triton X-100) e agentes redutores (ditiotreitól, cisteína) (Singh & Panda, 2005). Uma vez solubilizados, as proteínas reenoveladas e solúveis podem ser obtidas a partir da retirada dos agentes desnaturantes por diálise (Vallejo & Rinas, 2004). Proteínas recombinantes NS1 de vírus Dengue foram obtidas com sucesso por estratégias similares (Das, Mongkolaungkoon & Suresh, 2009; Amorim *et al*, 2010).

O sistema de expressão bacteriano oferece grande versatilidade, permitindo a otimização da expressão de proteínas recombinantes em diferentes aspectos. Para otimização da expressão, por exemplo, podem ser utilizadas abordagens de otimização de códons, bem como escolha de plasmídeos de alto número de cópias e construções com proteínas de fusão (tioredoxina - TRX, gluthathiona-S-transferase - GST e proteína ligante de maltose - MBP). Visando a obter incremento de solubilidade e enovelamento adequado da proteína de interesse, pode-se lançar mão de chaperonas químicas (L-arginina e glutamina), condições de compartimentalização física específicas e modificações pós-traducionais (formação de pontes dissulfeto em cepas bacterianas específicas como a SHuffle ou estratégias de “refolding”) (Lobstein *et al*, 2012; Ke & Berkmen, 2014). Os processos de fermentação também podem ser escalonados com parâmetros de cultivo controlados (composição do meio, temperatura, pH e oxigênio dissolvido) de maneira a manter o cultivo em alta densidade celular e evitar efeitos metabólicos indesejados (revisão em Berlec & Strukelj, 2013).

Biologia sintética foi empregada para reduzir o genoma de *E. coli* em até 15%, retirando elementos genéticos desnecessários para permitir incremento da eficiência de eletroporação e estabilidade de plasmídeos. Todas essas características descritas, contribuem para que a expressão de proteínas recombinantes em sistema bacteriano, apesar das limitações, ainda permaneça como responsável por 30% dos biofármacos

produzidos. O recente desenvolvimento de cepas de *E. coli* livres de endotoxina (Sanchez-Garcia *et al*, 2016), bem como de cepas aptas a realizar glicosilação (maquinaria transferida de *Campylobacter jejuni*) (revisão em Berlec & Strukelj, 2013), demonstram a capacidade contínua de desenvolvimento da expressão de proteínas recombinantes em sistema procarioto.

1.2.1.2 Sistema de expressão eucarioto

1.2.1.2.1 Baculovírus/ Células de inseto

Baculovírus compõem um grupo diverso de vírus de genoma DNA fita dupla circular superenovelado, com tamanhos variando de 80 a 180kb (Rohrmann, 2013). Os vírus da família Baculoviridae são divididos em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV), conforme sua capacidade de formar corpos de oclusão ou grânulos durante a infecção celular. Mais de 500 tipos de baculovírus foram descritos, tendo hospedeiros restritos a invertebrados e, principalmente insetos, como traças e borboletas. Por essa característica, alguns baculovírus têm sido usados como pesticidas e controle biológico. Dentre as espécies descritas, a *Autographa californica* multiple NPV (AcMNPV) é a melhor estudada e mais utilizada (Hu, 2005).

Vetores para expressão de baculovírus recombinantes eram inicialmente isolados por um processo altamente ineficiente de recombinação homóloga. Os baculovírus recombinantes eram selecionados em ensaio de plaqueamento através da identificação de fenótipos negativos de corpos de oclusão ao microscópio, processo laborioso e altamente dependente do operador. Esforços para eliminar a necessidade dessa etapa de seleção por plaqueamento levaram ao desenvolvimento de um método de transposição *in vivo* em bactérias, descrito em 1993 e mais tarde comercializado como o sistema “Bac-to-Bac Baculovirus Expression System” (Invitrogen). Este método consiste na transposição sítio-específica do gene heterólogo a partir de um plasmídeo doador para clonagem em um bacmídeo contendo o DNA de baculovírus. Clones recombinantes de *E. coli* adquirem resistência aos antibióticos de seleção e perdem o fenótipo de *lacZ* (colônias recombinantes ficam brancas), sendo facilmente identificados. Os bacmídeos recombinantes são transfectados em células de inseto para recuperação dos baculovírus recombinantes (Kost, Condreay & Jarvis, 2005) (Figura 1.8).

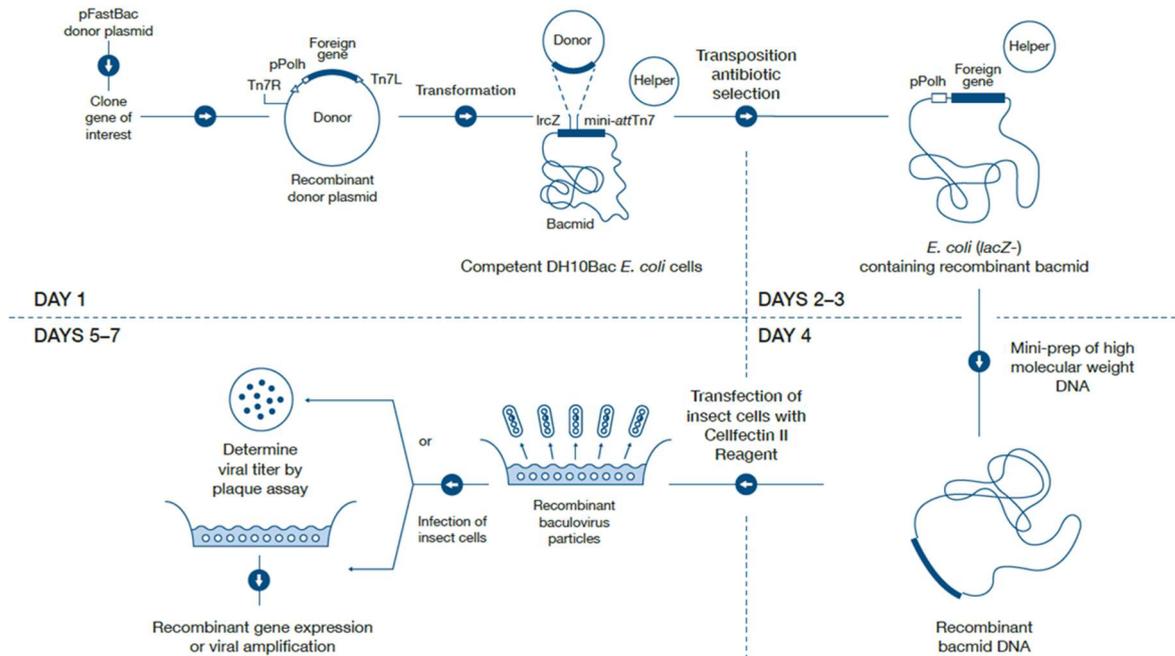


Figura 1.8: Esquema de obtenção de baculovírus recombinante utilizando o sistema Bac-to-Bac. Etapa inicial de clonagem do gene de interesse no plasmídeo doador. A partir da transformação de células *E. coli* cepa DH10Bac. É realizada então a triagem das células contendo o bacmídeo recombinante através do fenótipo *lacZ* negativo e resistência aos antibióticos de seleção. O bacmídeo recombinante é extraído e transfectado em células de inseto Sf9 para a obtenção dos baculovírus recombinantes, que por sua vez serão utilizados para promover a expressão da proteína de interesse. (Adaptado do manual Bac-to-Bac).

Baculovírus têm sido amplamente utilizados como sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto por características como: (i) capacidade de realizar modificações pós-traducionais, (ii) grande capacidade de inserção de genes devido a seu genoma grande e flexível, (iii) biossegurança, já que não infectam humanos naturalmente e, (iv) oferece grande rendimento por dispor de promotores fortes como o da poliedrina e p10 (Hu, 2005). Dentre as células hospedeiras disponíveis, podemos citar a Sf9 derivada do tecido ovariano da lagarta *Spodoptera frugiperda* e a BTI-TN-5B1-4 derivada da *Trichoplusia ni* (mais conhecida como “High-Five”; Invitrogen) (Kollewe & Vilcinskas, 2013).

A expressão em baculovírus/ células de inseto é uma alternativa interessante, com características intermediárias entre os sistemas de expressão em procaríoto e de mamífero. Em células de inseto, peptídeos sinais são clivados, pontes dissulfeto são formadas no retículo endoplasmático e enzimas para processamento proteolítico estão disponíveis, como nas células de mamífero. Em contrapartida, linhagens celulares de inseto estabelecidas para produção de proteínas recombinantes crescem

em altas densidades e em menores volumes de cultivo, quando comparadas às células de mamíferos. Além disso, cultivos de células de inseto são menos exigentes, sendo realizados em frascos em “shakers” ou “spinners” sem requerimento de atmosfera de CO₂ para sua manutenção (Kollewe & Vilcinskas, 2013).

Apesar de todas as vantagens apresentadas, esse sistema também possui algumas limitações. Expressões sob o promotor da poliedrina e p10, apesar de potentes, alcançam níveis máximos próximo da morte da célula infectada devido à natureza muito tardia destes promotores. Sendo assim, a maquinaria de processamento pós-traducional e as vias secretórias já estão comprometidas, podendo impactar no processamento de proteínas destinadas a membrana plasmática ou para secreção (Hu, 2005). Uma segunda desvantagem seria que, apesar da glicosilação ser um processamento pós-traducional presente em todos os eucariotos, os padrões de açúcares inseridos variam conforme a espécie de inseto, podendo influenciar na solubilidade da proteína, meia-vida, atividade e interações com outras moléculas (Kollewe & Vilcinskas, 2013) (Figura 1.9).

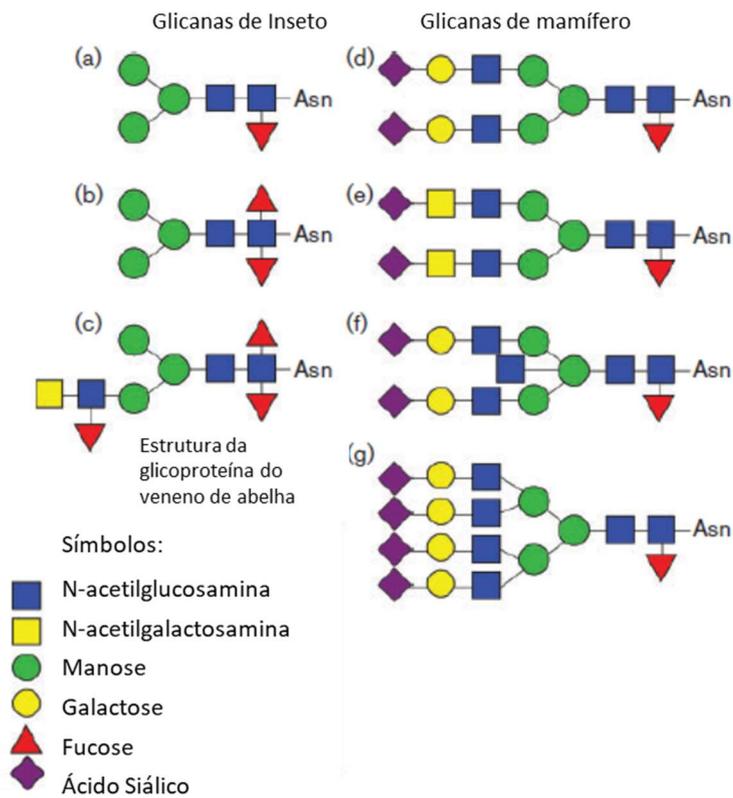


Figura 1.9 Diferenças no padrão de glicosilação entre células de inseto e de mamífero. Exemplos ilustrando a diferença de complexidade das estruturas de N-glicana em insetos (a-c) e em mamíferos (d-g) (Adaptada de Oers, Pijlman & Vlák, 2013).

Atualmente, a versatilidade da expressão em baculovírus tem sido explorada em diferentes abordagens como: expressão de proteínas, apresentação de antígenos e desenvolvimento de vetores para terapia gênica em células de mamíferos (Figura 1.10). Células de inseto transgênicas com vias de glicosilação humanizadas têm sido desenvolvidas, permitindo a produção de glicoproteínas de mamíferos autênticas. Aplicações de baculovírus para terapia gênica surgem como uma abordagem promissora, por sua segurança (vírus não replica em células de mamífero), não toxicidade e simplicidade técnica (Kost, Condreay & Jarvis, 2005; Van Oers, Pijlman & Vlak, 2015).

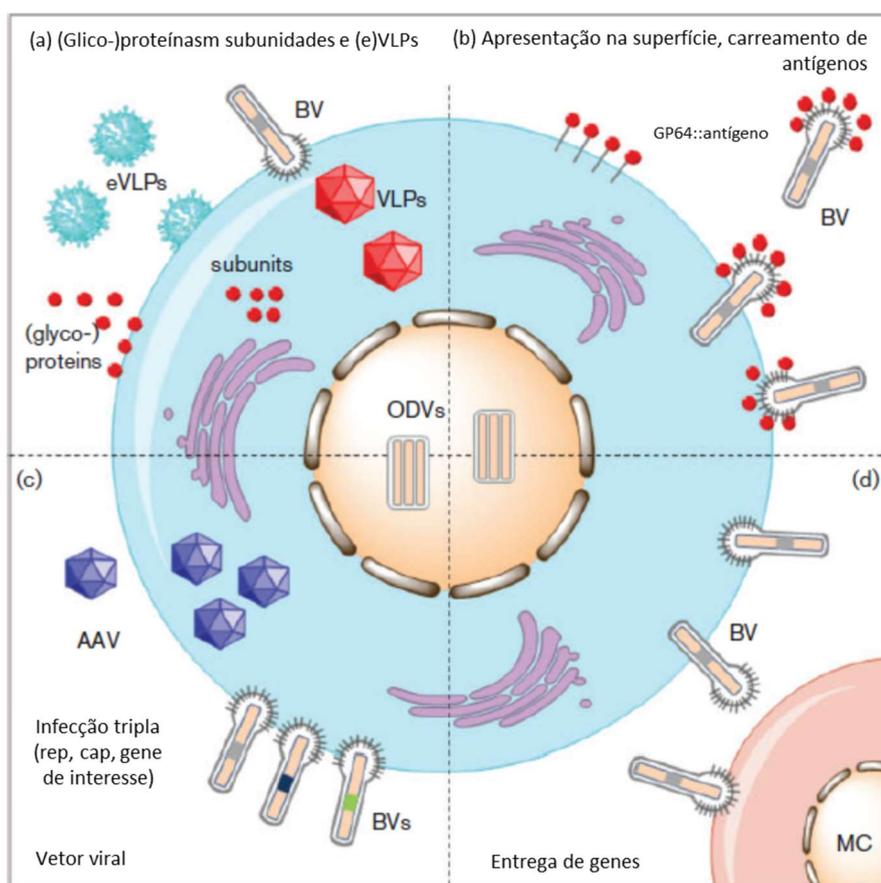


Figura 1.10: Possíveis aplicações do Sistema de Expressão em Baculovírus. (a) Baculovírus (BV) para expressão de proteínas em células de inseto (subunidades e VLPs), (b) Aplicação como carreadores de antígenos na sua superfície, (c) BVs como vetores virais para terapia gênica e (d) BVs para endereçamento de genes em células de mamífero. Adaptado de Van Oers, Pijlman & Vlak, 2015.

1.2.1.2.2 Plataforma vegetal

Durante as últimas décadas, o uso de plantas como um sistema de produção alternativo tem sido estabelecido como uma metodologia adequada para a produção

de proteínas de diferentes origens, incluindo antígenos vacinais e biofármacos como anticorpos terapêuticos, enzimas industriais, componentes sanguíneos, citocinas, fatores de crescimento e hormônios (Chichester e Yusibov, 2007; Mett *et al.*, 2008).

Dentre as vantagens apresentadas frente a outros sistemas recombinantes, pode-se citar: a capacidade de realizar modificações pós-translacionais similares a outros eucariotos superiores; facilidade de escalonamento; menor custo (produção mais econômica da biomassa, necessitando apenas de luz solar, água, dióxido de carbono e minerais); segurança (ausência de risco de contaminação por toxinas bacterianas, patógenos animais e solventes); relativa facilidade de manipulação genética e produção de grande quantidade de antígenos vacinais em curto período de tempo, o que é importante em casos de surtos (Chichester e Yusibov, 2007). Várias plataformas de plantas têm sido demonstradas para a produção de proteínas recombinantes, incluindo culturas de folhas, sementes de cereais e legumes, oleoginosas, frutas, tecidos de plantas superiores e cultura celular, sistemas hidropônicos e algas (Han *et al.*, 2006).

A expressão em sistema vegetal pode ser realizada usando tanto a planta completa como a cultura de células vegetais *in vitro*. Abordagens baseadas na expressão na planta completa podem produzir proteínas recombinantes em escala agrônômica e, em algumas aplicações, as proteínas produzidas acumulam em determinados tecidos vegetais permitindo a obtenção das chamadas “vacinas comestíveis”. Entretanto, o entusiasmo inicial com esta abordagem tem sido substituído por alternativas baseadas na obtenção de antígenos vacinais derivados de plantas, frente às dificuldades de padronizar os níveis de expressão nos diferentes tecidos a fim de estabelecer doses exatas. A cultura de células vegetais, por sua vez, oferece vantagens como crescimento sob condições controladas e otimizadas em biorreatores, facilidade de purificação e aprovação por agências regulatórias (evita a disseminação no transgene e contaminação da cadeia alimentar), porém apresenta um baixo rendimento (revisão em Martinez, Giulietti & Talou, 2012).

Nesse contexto, a engenharia de “vacinas comestíveis” baseadas na expressão estável de proteínas recombinantes em plantas transgênicas mudou o foco para o desenvolvimento de proteínas purificadas produzidas por expressão transiente do gene de interesse em plantas sem modificação genética, através de vetores virais ou bacterianos da planta hospedeira. Para tal, técnicas de agro infiltração foram desenvolvidas, permitindo que vetores virais (vírus de RNA vegetais cujas sequências não essenciais foram substituídas pela sequência da proteína de interesse) sejam

eficientemente transfectados por um sistema carreador baseado na bactéria do solo *Agrobacterium*. Uma vez incorporados pelas células vegetais, o DNA é transcrito e os módulos são montados com o auxílio de uma recombinase, gerando um replicon que produz altas taxas de expressão da proteína de interesse (Yusibov *et al.*, 2013). A Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology (FhCMB) desenvolveu um Sistema de expressão transiente aplicável a *Nicotiana benthamiana*, vegetal semelhante ao tabaco. Essa abordagem permite a acumulação rápida de grandes quantidades de proteínas recombinantes em plantas e tem sido aplicada na produção de candidatos vacinais para diferentes alvos, dentre os quais podemos citar a proteína E de febre amarela, usada como antígeno modelo em nosso estudo (Tottey *et al.*, 2018).

1.2.2 Vacina inativada

Vacinas inativadas apresentam como principal vantagem a segurança, pois não há multiplicação do agente no organismo do vacinado. Em contrapartida, tendem a induzir uma imunidade menos duradoura, requerendo a aplicação de doses de reforço no esquema de imunização, bem como para duração da imunidade ao longo dos anos (Schatzmayr, 2003). Apesar da menor imunogenicidade em comparação com vacinas atenuadas, candidatos vacinais baseados em antígenos inativados, por apresentarem estrutura tridimensional similar ao arcabouço viral original, permitem a apresentação de epítomos quaternários relatados como principais alvos de anticorpos neutralizantes para flavivírus, por exemplo (Vratskikh *et al.*, 2013).

A inativação viral pode ser realizada através de diversos métodos físicos e químicos. Os métodos físicos incluem inativação através de calor, radiação ultravioleta e pressão hidrostática; enquanto os químicos incluem inativação por etilamina e derivados, psolarenos, β -aminofenilcetona, dietilpirocarbonato, ácido ascórbico, formalina e β -propiolactona.

A vacina inativada usada como antígeno modelo nesse estudo foi obtida por inativação com β -propiolactona (BPL), um agente inativante muito utilizado na produção de vacinas virais humanas e veterinárias (Perez e Paolazzi, 1997; Stauffer *et al.*, 2006). Trata-se de um agente alquilante que se apresenta na forma de líquido incolor estável quando concentrado, mas instável em soluções aquosas e que possui capacidade carcinogênica e propriedades fungistática e bactericida (Dickens, 1964). O mecanismo de inativação é baseado em sua atuação sobre o ácido nucléico do

vírus, preservando as propriedades imunogênicas das proteínas do envelope (Perez e Paolazzi, 1997; Stauffer, El-Bacha & Da Poian, 2006). Somada a esta vantagem, a BPL sofre hidrólise completa em meio aquoso, não formando produtos tóxicos (seu produto de hidrólise, ácido β -hidroxipropiônico, não é carcinogênico) (Hoffman e Warshowsky, 1958; Stauffer, El-Bacha & Da Poian, 2006). As aplicações da inativação com BPL foram amplamente descritas para os vírus da raiva e da influenza, resultando em vacinas comerciais (Perez e Paolazzi, 1997; Stauffer, El-Bacha & Da Poian, 2006).

As preocupações em relação à segurança da vacina atenuada FA17D somadas às suas limitações de uso (contraindicada para bebês menores que 9 meses de idade, pacientes imunossuprimidos, gestantes e idosos) têm estimulado esforços para o desenvolvimento de vacinas inativadas. A fim de atender essa demanda, há um projeto relacionado atualmente em desenvolvimento em Bio-Manguinhos, FIOCRUZ. Alternativamente, essa vacina poderia ser usada para vacinação primária, sendo seguida de reforço com a vacina atenuada FA17D, com o objetivo de reduzir os riscos de eventos adversos graves associados a vacina viva (Hayes, 2010). Duas vacinas inativadas para FA estão em processo de desenvolvimento, uma baseada na cepa 17D-204 (Xcellerex/ GE Healthcare, Estados Unidos) e outra baseada na cepa 17DD (Bio-Manguinhos, Brasil) (Beck & Barret, 2015). Ambas são produzidas em meios de cultivo sem soro a partir de células animais certificadas para uso humano em biorreatores, seguidas de purificação por cromatografia e inativação por β -propiolactona. O cultivo em células traz como vantagem ainda a redução do risco de reações alérgicas associadas a proteínas do ovo e gelatina. O uso de meio sem soro, por sua vez, diminui o risco de contaminantes de origem humana ou animal. A vacina da Xcellerex/ GE provou ser altamente imunogênica e capaz de gerar proteção em camundongos, hamsters, primatas não humanos e humanos em estudos clínicos de fase 1 (Monath *et al.*, 2010, 2011). Entretanto, a partir da compra da Xcellerex pela GE, o desenvolvimento desta vacina foi descontinuado. A vacina em desenvolvimento em Bio-Manguinhos, por sua vez, demonstrou alta imunogenicidade em modelo animal, após sua aplicação em esquema de três doses utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante (Pereira *et al.*, 2015).

Frente às limitações apresentadas pelos diversos antígenos não vivos desenvolvidos como candidatos vacinais para febre amarela (menor imunogenicidade e maior número de doses para atingir proteção), adjuvantes têm surgido como uma alternativa promissora para modular as respostas imunológicas e alcançar a proteção desejada.

1.3 Adjuvantes

Adjuvantes (derivados do verbo do latim *Adjuvare*, ajudar) são definidos como componentes capazes de estimular e/ ou modular respostas imunológicas antígeno-específicas. Avanços na biotecnologia têm permitido o desenvolvimento de vacinas modernas projetadas racionalmente a base de antígenos recombinantes altamente purificados, bem definidos e com excelente padrão de segurança. Em contrapartida, a imunogenicidade desses antígenos é menor em comparação com vacinas atenuadas e inativadas. Estas, por sua vez, contêm adjuvantes naturais dentre seus componentes heterogêneos como formas particuladas de proteínas, lipídeos e oligonucleotídeos (figura 1.11) (Reed, Orr & Fox, 2013; Brito & O'Hagan, 2014).

Ano	Vacina	Adjuvante (mecanismo)	Descobertas científicas
1885	Raiva	ssRNA/ (TLRs 7 e 8)	
1886			Briegen descreve a endotoxina
1889	Febre Tifóide	LPS, DNA (TLRs 1,2,4,5,6 e 9)	
1911		Vacinas lipídicas	Maior duração da resposta para vacina tifóide
1916	BCG para tuberculose	DNA, lipoproteínas (TLRs 1,2,6 e 9)	
1921		Sais de alumínio	Incremento de anticorpos para vacina de difteria
1926		Adjuvante incompleto de Freund (IFA) (emulsão água-em-óleo)	Incremento de resposta celular e humoral para tuberculose
1937	Difteria, pertussis e tétano	LPS, DNA (TLRs 1,2,4,5,6 e 9)	
1942	Influenza (célula completa)	ssRNA (TLRs 7 e 8)	
1949	Polio inativado	ssRNA (TLRs 7 e 8)	
1955			Determinação da estrutura do LPS
1966			Ribi faz a toxina detoxificada MPL
1979	Hepatite A		MPL em testes clínicos
1991			Descoberta dos TLRs
1996	Fluad	MF59 (emulsão óleo-em-água)	
1997	Epaxal (para hepatite A) Inflexal (para influenza)	Virossomos	
1998			Demonstração de LPS como ligante de TLR
2004	Invivac (para influenza-Europa)	Virossomos	
2005	Fendrix (para hepatite B-Europa)	MPL (TLR4)	
2007-2009	Influenza pandêmica (Europa)	MF59, AS03 (emulsões óleo-em-água)	
2009	Cervarix (para HPV16 e HPV18-EUA)	MPL (TLR4)	

Figura 1.11: Linha do tempo de desenvolvimento de adjuvantes ilustrando o histórico de vacinas com adjuvantes naturais até os quimicamente definidos desenvolvidos atualmente. Adaptada de Reed, Orr e Fox, 2013.

A maioria das vacinas atualmente disponíveis (sejam atenuadas, baseadas em proteínas recombinantes, toxóides ou conjugados de polissacarídeos e proteínas) conferem proteção primariamente através de imunidade humoral. As repostas humorais induzidas são em geral de longa duração, requerendo, quando necessário, doses de reforço em baixa frequência para manter a proteção (Plotkin, 2010). A

dificuldade em gerar imunidade baseada em respostas celulares potentes e duradouras, têm sido o ponto crucial para o desenvolvimento de vacinas ainda não disponíveis como malária e citomegalovírus, entre outras doenças. Mesmo no caso de vacinas não disponíveis cuja resposta protetora é mediada por anticorpos como HIV, respostas celulares Th1 e T CD8⁺ também exercem um papel crítico na prevenção e controle da infecção. Da mesma maneira, vacinas terapêuticas para tratamento de câncer e doenças crônicas requerem respostas celulares potentes e multifuncionais, capazes de combater o agente infeccioso e contornar os mecanismos de regulação (revisão em Coffman, Sher & Seder, 2010). Adjuvantes oferecem ainda alternativas promissoras para a solução de outros problemas vigentes na vacinologia como: o desenvolvimento de memória imunológica, a identificação de correlatos de proteção, a superação da imaturidade dos centros germinativos em neonatos e da imunossenescência de células T em idosos e a estimulação de imunidade de mucosa (Plotkin, 2015). Trabalhos recentes têm demonstrado como a ativação da imunidade inata pode modular respostas adquiridas (Kasturi *et al*, 2011), e os adjuvantes são elementos chave neste contexto, atuando na melhor apresentação de antígenos, imunomodulação, aumento da magnitude de respostas humorais e celulares e, até mesmo, redução da dose necessária para imunização (figura 1.12) (Reed, Orr e Fox, 2013).



Figura 1.12: Benefícios potenciais do uso de adjuvantes. Adaptado de Reed, Orr e Fox, 2013.

Apesar de sua reconhecida importância no estímulo e modulação das respostas imunológicas desejadas, cabe ressaltar que adjuvantes não podem comprometer a segurança das formulações, já que vacinas são empregadas profilaticamente em pessoas de faixa etária muito jovem. Sendo assim, sua aprovação na constituição de vacinas precisa ser justificada, com segurança e riscos de eventos adversos bem documentados (Reed, Orr e Fox, 2013; Brito & O'Hagan, 2014). De maneira a solucionar esse problema, Wu e colaboradores (2014) descreveram abordagens de engenharia de pequenas moléculas imunoestimuladoras (SMIPs, do inglês "small molecule immune potentiators") com biodisponibilidade limitada e atuação localizada, a fim de promover inflamação local e temporalmente restrita para máxima eficácia e redução de possíveis efeitos colaterais.

Adjuvantes de natureza diversa estão sendo avaliados em testes pré-clínicos e clínicos: substâncias oleosas com efeito de liberação lenta; nanopartículas para entrega ("delivery") e otimização da apresentação antigênica para células dendríticas; e substâncias imunomoduladoras como agonistas de receptores do tipo Toll (TLR). De uma maneira geral, os adjuvantes podem ser divididos em dois grupos principais: sistemas carreadores particulados e substâncias imunoestimulatórias, conforme descrito a seguir.

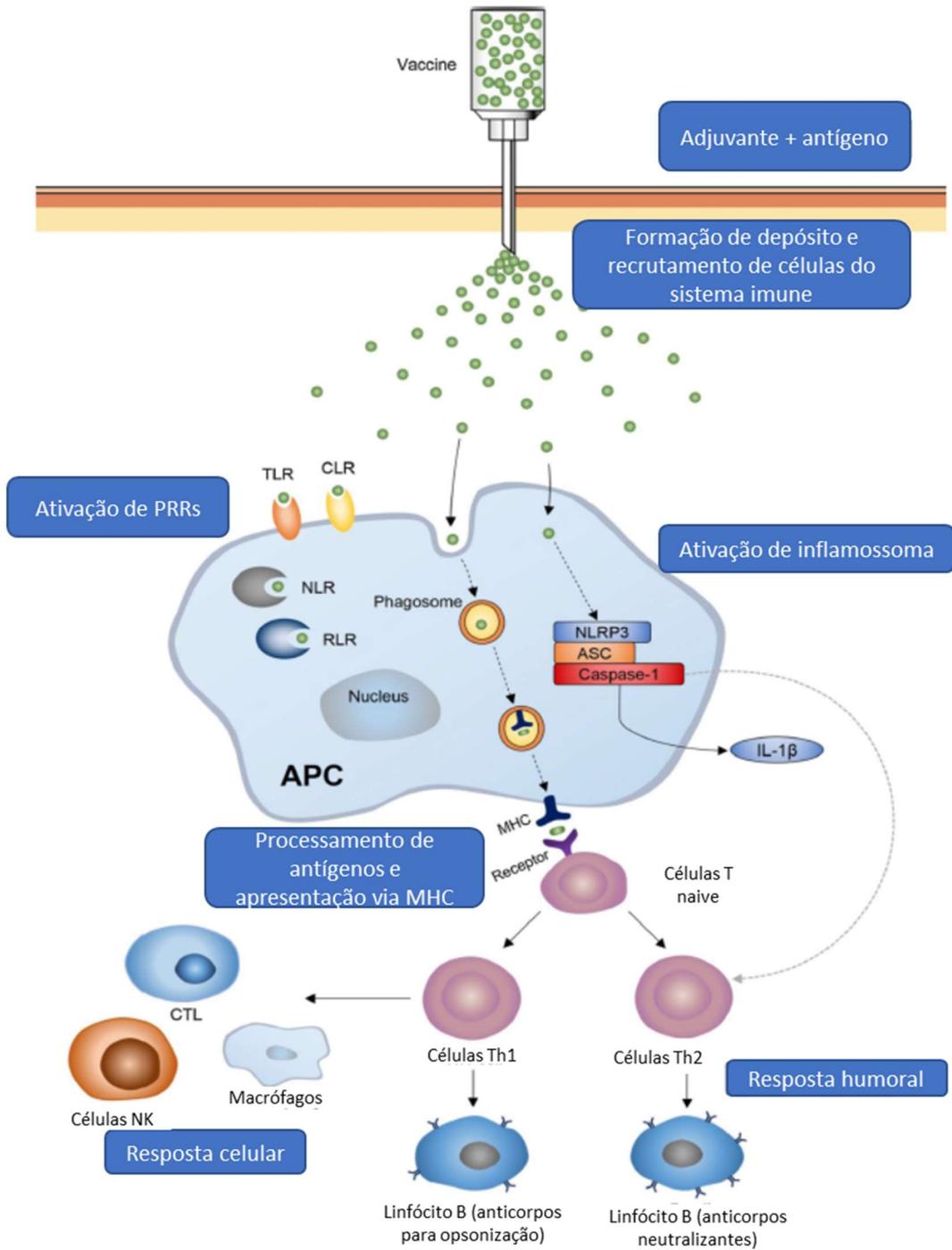


Figura 1.13: Mecanismos gerais de ação de adjuvantes. Adjuvantes podem formar depósito de antígenos, recrutando células do Sistema imune para o sítio de inoculação. Podem ativar receptores de padrões associados a patógenos em células apresentadoras de antígeno antes ou durante a endocitose de antígenos. Os antígenos endocitados são processados e apresentados para células T, gerando respostas celulares e/ ou humorais. (Adaptado de Bastola *et al*, 2017).

1.3.1 Adjuvantes que atuam como Sistemas Carreadores Particulados (“Delivery”)

Adjuvantes particulados que funcionam como carreadores aos quais antígenos podem ser associados podem ser de diferentes materiais como sais de alumínio, emulsões óleo-em-água, partículas formadas por lipídeos ou polímeros sintéticos, entre outros. Apesar de sua ação ser inicialmente vinculada apenas a formação de depósito, esses adjuvantes têm demonstrado capacidade de estimular respostas pró-inflamatórias locais, ativando a resposta imune inata.

1.3.1.1 Sais de alumínio

Primeiro adjuvante a ser utilizado em vacinas humanas, o alúmen foi desenvolvido em 1926 por Glenny & Pope (revisão em Brito & O’Hagan, 2014). Até hoje, estes sais de alumínio são os adjuvantes mais amplamente utilizados e, portanto, optamos por utilizar o hidróxido de alumínio como controle frente as diferentes formulações testadas ao longo do nosso estudo. Adjuvantes baseados em alumínio consistem de precipitados de fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio, aos quais o antígeno é adsorvido. Apesar de tradicionalmente sua função ser associada a capacidade de formar depósitos de antígeno, propiciando longa duração com liberação lenta e exposição prolongada; o potencial adjuvante desses compostos não depende exclusivamente dessa característica (Hutchison *et al*, 2012; revisão em De Gregorio, Caproni & Ulmer, 2013). Estudos recentes têm descrito uma dupla atuação para este adjuvante, na promoção da captura de antígenos por células apresentadoras e no desenvolvimento de um microambiente imunoestimulatório local (De Gregorio, Tritto & Rappuoli, 2008). Atualmente, sabe-se que sua capacidade de estimulação da imunidade inata, ocorre independente de ativação via TLR. Estudos realizados *in vitro* usando células murinas e humanas demonstraram a ativação do complexo do inflamassoma NLRP3, com processamento de algumas citocinas pró-inflamatórias chaves, incluindo IL-1 β (De Gregorio, Tritto & Rappuoli, 2008; Coffman, Sher & Seder, 2010; De Gregorio, Caproni & Ulmer, 2013). Sais de alumínio podem ainda induzir morte celular por necrose, liberando moléculas como o ácido úrico, conhecidas como padrão molecular associado a perigo (“DAMP”, do inglês “danger associated molecular pattern”) (Coffman, Sher & Seder, 2010; De Gregorio, Caproni

& Ulmer, 2013). Os mecanismos de ação associados a adjuvantes a base de alumínio estão ilustrados na figura 1.14 abaixo.

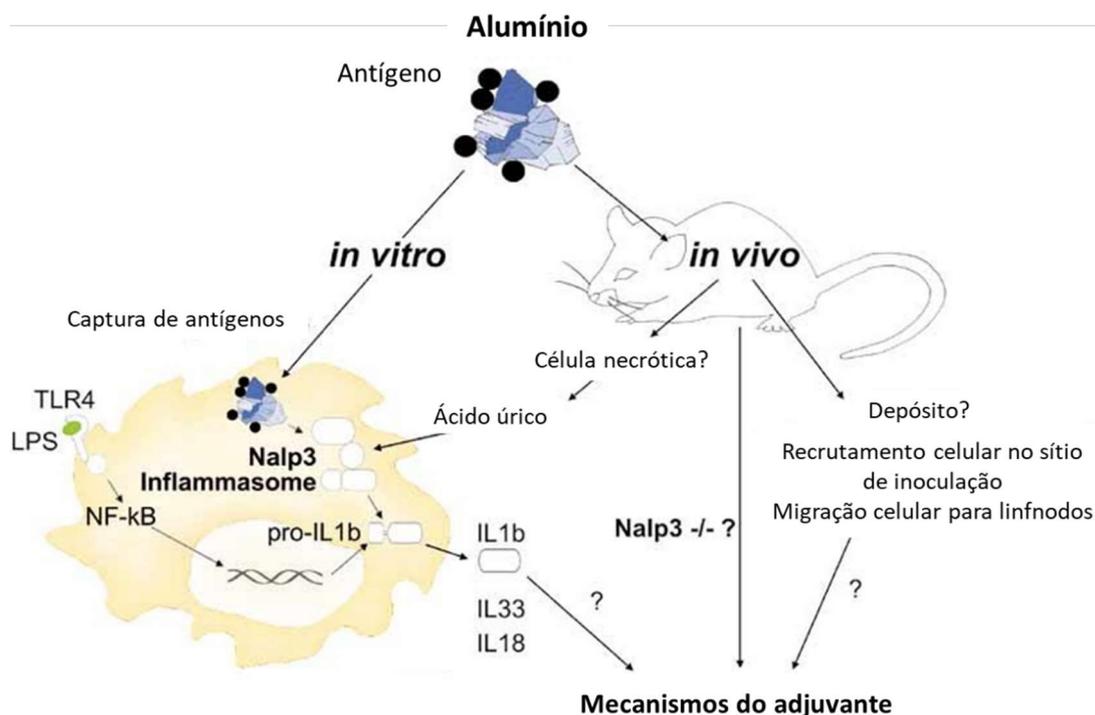


Figura 1.14. Especulações acerca dos mecanismos de ação propostos para adjuvantes a base de alumínio. *In vitro*, o alumínio complexado com antígenos aumenta a captura dos mesmo por células apresentadoras; induz ativação direta do complexo do inflamassoma Nlrp3; e faz sinergia com estimulação de TLR4 por LPS para secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1b, IL-18 e IL-33. *In vivo*, sua atuação inicialmente foi associada a formação de depósitos no sítio de aplicação. Atualmente, sabe-se que o alumínio induz necrose em células alvo não identificadas resultando na produção de ácido úrico, o que pode estimular Nlrp3. Além disso, sais de alumínio podem estimular migração local de células apresentadoras de antígenos, bem como migração para linfonodos. Adaptado de De Gregorio, Tritto & Rappuoli, 2008.

1.3.1.2 Emulsões óleo-em-água: MF59 e AS03

Emulsões adjuvantes vêm sendo empregadas historicamente em formulações vacinais desde os anos 1940, com estudos envolvendo os adjuvantes de Freund. Entretanto, embora esses adjuvantes fossem muito eficientes, eles eram pouco tolerados e não aprovados para ampla utilização, principalmente por possuírem óleos minerais não biodegradáveis. Extenso trabalho foi realizado ao longo do século XX a procura de componentes para emulsões melhor toleradas como adjuvantes (Brito & O'Hagan, 2014).

As emulsões óleo-em-água desenvolvidas são baseadas, em sua maioria, em esqualeno. Este óleo é mais rapidamente metabolizado que a parafina presente no adjuvante de Freund (Coffman, Sher & Seder, 2010). Essas emulsões estimulam forte

resposta humoral, permitindo redução do número de doses e massa antigênica e promovem respostas de memória com perfil misto Th1/ Th2 (Ott *et al.*, 1995). Atualmente, duas emulsões comerciais baseadas em esqualeno estão licenciadas para uso em humanos: MF59 (Novartis/ GlaxoSmithKline (GSK)) e AS03 (GSK).

O adjuvante MF59 consiste em partículas uniformes de 160 nm, geradas por tecnologia de microfluídica, cuja composição é baseada em esqualeno e nos surfactantes não iônicos Tween 80 e Span 85 (De Gregorio, Caproni & Ulmer, 2013). Este adjuvante induz considerável estímulo local com recrutamento de células dendríticas e granulócitos, promove a diferenciação de monócitos em células dendríticas e estimula a fagocitose de antígenos pelas mesmas (Coffman, Sher & Seder, 2010). Assim como para o alumínio, inicialmente postulou-se que sua ação era por efeito de depósito, mas essa hipótese também foi refutada frente a comprovação de sua rápida drenagem em até 6 h pós inoculação, bem como a não influência sobre a distribuição e meia vida do antígeno administrado com este adjuvante (revisão em Brito & O'Hagan, 2014). Dentre os mecanismos de ação imunoestimulatórios descritos para este adjuvante, sabe-se que ele ativa MyD88 (proteína adaptadora presente na maioria das vias de sinalização de TLR), mas não age sobre inflamassoma NLRP3. De maneira geral, apesar de ser descrito como um sistema de entrega, o MF59 induz um “microambiente imunocompetente” no local de inoculação, facilitando a resposta imunológica inata com infiltração celular, ativação e fagocitose de antígenos (revisão em Liang & Loré, 2016). Cabe ainda ressaltar que o MF59 foi licenciado para uso humano formulado em vacina para influenza sazonal em 1997 e desde então vem sendo amplamente administrado, tendo segurança e tolerância comprovadas em diferentes faixas etárias em humanos (O'Hagan *et al.*, 2013). Em nosso estudo, utilizamos o adjuvante AddaVax (InvivoGen) como análogo do MF59 aqui descrito.

A emulsão AS03, licenciada pela GSK em 2009, por sua vez, contém esqualeno e α -tocopherol (vitamina E). Esta vitamina tem propriedades antioxidantes e imunoestimulatórias, sendo associada a indução de resposta humoral. Estudos pré-clínicos sobre os mecanismos de ação do AS03 demonstraram que o α -tocoferol é capaz de induzir ativação inespecífica do sistema imune nos linfonodos drenantes em camundongo, ao contrário do MF59, que induz resposta imune apenas no músculo onde foi injetado (Morel *et al.* 2011). Estudos recentes sugerem a associação da vacina para influenza A/H1N1 formulada com AS03 com o efeito adverso de narcolepsia (Nohynek *et al.*, 2012).

1.3.1.3 Micro/ Nanopartículas: VLPs, virossomas e ISCOMs

Partículas semelhantes a vírus (“Virus-Like Particles”, VLPs) são formadas por proteínas estruturais como capsídeo e envelope, que mimetizam a estrutura do vírus intacto em tamanho, formato e organização molecular, sendo capazes de se montar espontaneamente. Apesar de altamente imunogênicas, VLPs são não infecciosas (infectam células, porém não geram novas partículas uma vez que não contém o genoma viral). Outros componentes como agonistas de TLRs podem ser incorporados a estas estruturas. Dentre seus mecanismos de ação descritos, podemos citar: indução da ativação, proliferação e regulação positiva de genes envolvidos na mudança de classe e hipermutação somática de células B; ativação de células dendríticas, estimulando respostas celulares; e apresentação cruzada para células T CD8⁺. Sendo assim, VLPs são capazes de induzir amplas respostas celulares e humoral (Apostólico *et al*, 2016).

Virossomas são uma variação da plataforma de VLP, compostos por envelopes virais com lipídeos de membrana e glicoproteínas. Essas estruturas são produzidas a partir da dissolução do envelope com detergentes, seguido da completa remoção do material genético do vírus e proteínas que não sejam constituintes da membrana. O sistema mais utilizado é o virossoma de Influenza. Atualmente há cinco vacinas licenciadas baseadas nessa abordagem (tabela 1.1) (Apostólico *et al*, 2016).

Poly (lactic acid) (PLA) e poly (lactic-coglycolic acid) (PLGA) são micro/ nanopartículas de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis que podem ser utilizadas como carreadores, promovendo o encapsulamento de antígeno e/ ou adjuvantes. Estas partículas podem ser internalizadas por pinocitose ou endocitose mediada por clatrina, favorecendo a apresentação antigênica para células apresentadoras, além de contribuir para uma maior estabilidade do antígeno (Apostólico *et al*, 2016).

Ainda como membro dessa classe de adjuvantes carreadores, temos os complexos imunomoduladores (“Immunostimulatory complexes”, ISCOMs). Estas nanopartículas com estrutura semelhante a gaiolas, são compostas de saponinas (purificadas da casca da árvore sulamericana *Quillaja saponaria*), formuladas com colesterol, fosfolipídeos e antígenos. Estas nanopartículas não atuam mediante ativação de nenhum receptor de reconhecimento de patógenos (PRR, do inglês “pathogen recognition receptor”); entretanto, são capazes de estimular a fagocitose e

retenção prolongada por células dendríticas nos linfonodos, gerando potentes respostas celulares (Coffman, Sher & Seeder, 2010). Atualmente, a tecnologia de ISCOM é utilizada em diversas vacinas animais, tais como: Equip (Pfizer), Prequenza (MSD Animal Health), Canvac (Pfizer), Rabix e Rabifel (VetBioChem). Além disso, é importante destacar que o adjuvante Matrix M (Novavax) utilizando a mesma tecnologia também vem sendo avaliado em dois ensaios clínicos de fase II em humanos (influenza sazonal e pandêmica), onde tem se mostrado seguro.

No nosso estudo, utilizamos como membro dessa classe de adjuvantes o CAF01 (Statens Serum Institut), um lipossoma catiônico de DDA (N'-dimethyl-N,N'-dioctadecylammonium) combinado com um análogo sintético imunomodulador de micobactéria TDB (α,α' -trehalose 6,6'-dibehenate) inserido na bicamada lipídica. Os lipossomas de DDA são descritos como sistemas de entrega eficientes, favorecendo a captura e apresentação de antígenos pelas células apresentadoras, enquanto o TDB é capaz de promover a ativação destas células apresentadoras de antígeno e induzir respostas combinadas Th1 e Th17 (Christensen *et al*, 2009). Juntos, esses componentes atuam de maneira sinérgica para gerar potentes respostas celulares e humorais. Esse adjuvante têm sido testado em modelos animais de melanoma, influenza e tuberculose, entre outros, bem como já foi avaliado em ensaios clínicos de fase I de um candidato vacinal para tuberculose ("Clinical trial no. NCT00922363") e coquetel de peptídeos para HIV-1 ("Clinical trial no. NCT01141205"). Acredita-se que seu mecanismo de ação esteja associado a formação de depósito com retenção prolongada no sítio de inoculação, favorecendo a liberação lenta de lipossoma/antígeno no local e potentes respostas do tipo Th1 (Brito & O'Hagan, 2014). A formulação AS01 desenvolvida pela GSK e licenciada junto a vacina para malária (tabela 1.1) representa uma outra variação dessa tecnologia de lipossomas formulado com substâncias imunoestimuladoras (QS21, um derivado da saponina Quil A e MPL, agonista de TLR 4 derivado de LPS).

1.3.2 Adjuvantes que atuam como Imunoestimuladores

O uso de ligantes naturais ou agonistas sintéticos de PRRs como adjuvantes tem sido explorado como alternativa promissora para atingir as repostas adaptativas desejadas, a partir da ativação do sistema imune inato (Coffman, Sher & Seeder, 2010). Muitos desses adjuvantes são conhecidos por terem como alvo elementos de

via de sinalização da imunidade inata, em particular TLR, mas também NLR (Nod-like receptors), receptores de RIG-I e receptores de Lectina do tipo C. Esses receptores atuam de maneira a promover uma primeira linha de defesa imunológica contra patógenos, através da interação com assinaturas moleculares comumente encontradas em microrganismos e ausentes no hospedeiro (padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês “pathogen associated molecular patterns”). Como exemplos podemos citar RNAs virais fita dupla (dsRNA) e fita simples (ssRNA); motivos CpG com a citosina não metilada do DNA bacteriano; lipídeos, lipopeptídeos e glicanas da parede celular de bactérias e flagelina; entre outros (De Gregorio, Caproni & Ulmer, 2013).

Dentre os agonistas de TLR, o MPL (agonista de TLR 4) é o único aprovado para uso em humanos até o momento. Esse agonista está presente nas formulações adjuvantes AS04 (GSK), licenciado nas vacinas para o vírus da Hepatite B (HBV) e do papiloma humano (HPV) e, AS01(GSK), recentemente licenciada na vacina RTS,S para malária (Moorthy & Okwo-Bele, 2015). O TLR 4 é um PRR de superfície que reconhece diferentes PAMPs, dentre eles o lipossacarídeo (LPS) bacteriano. O LPS é muito tóxico e, portanto, inadequado para uso em vacinas humanas. Como alternativa, foi desenvolvido o MPL (monofosforil lipid A), a partir da detoxificação do LPS da bactéria gram negativa *Salmonella minnesota* R595, reduzindo em 1000 vezes a sua toxicidade.

O MPL se liga a TLR 4, ativando preferencialmente a via de sinalização de TRIF para estimular a produção de citocinas, ao contrário da molécula inteira de LPS que além desta via, atua ativando MyD88 levando a produção de grande quantidade de $TNF\alpha$ (Apostólico *et al*, 2106). Este adjuvante é capaz de induzir a produção de IL-12 e $IFN\gamma$, promovendo respostas do tipo Th1. Em combinação com hidróxido de alumínio, o MPL é capaz de induzir tanto resposta humoral, como resposta celular do tipo Th1 (Didierlaurent *et al*, 2009). Ensaios pré-clínicos e clínicos têm demonstrado grande utilidade desse adjuvante vacinal em modelos animais de doenças infecciosas (Bertholet *et al*, 2010) e não infecciosas (alergias e câncer) (Cluff, 2010).

Mais recentemente, uma versão sintéticas de agonista de TLR 4, denominada GLA (“glucopyranosyl lipid adjuvante”) foi desenvolvida pelo IDRI (“Infectious Disease Research Institute”) e também está em testes clínicos para vacinas contra diferentes doenças (Coler *et al*, 2011).

Em nosso estudo, optamos por avaliar a flagelina, um agonista de TLR 5, como representante dessa classe de adjuvantes. A flagelina, principal componente do

flagelo bacteriano de bactérias gram positivas e gram negativas, é sabidamente um potente indutor de respostas T-independentes, estimulando a secreção de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para a ativação da resposta imune (Bargieri *et al*, 2011). Ao contrário de outros agonistas de TLR, a flagelina tende a produzir respostas com perfil Th1/ Th2 balanceado, ao invés de resposta polarizada Th1 (Coffman, Sher & Seeder, 2010). Sua atuação pode ser mediada ainda por ativação dos inflamassomas, através da fosforilação de NLRC4 e NAIP5 (Apostólico *et al*, 2016). Esse agonista tem sido utilizado sozinho, ou em associação com outros adjuvantes como hidróxido de alumínio e, por sua natureza proteica, pode ainda ser usado na geração de proteínas de fusão com o antígeno alvo (Taylor *et al*, 2011). Esta estratégia de proteína de fusão permitiria a apresentação simultânea do antígeno e do adjuvante para a mesma célula apresentadora.

Diante de tantas opções disponíveis, a escolha do adjuvante para compor uma formulação vacinal deve ser baseada em informações como a doença para a qual a vacina está sendo desenvolvida, a via de infecção do patógeno, rota de imunização, a resposta imunológica que espera induzir para alcançar proteção (correlato de proteção) e a população alvo. Portanto, torna-se de suma importância a avaliação cuidadosa da resposta imunológica induzida pelas formulações vacinais contendo diferentes tipos de adjuvantes.

Apesar da existência de adjuvantes claramente mais potentes que o alumínio, a toxicidade tem sido o principal problema para o licenciamento dos mesmos. Além de sais de alumínio, atualmente há formulações de vacinas aprovadas para uso humano nos EUA e/ ou Europa baseadas em emulsões óleo-em-água (MF59), virossomas e combinações como AS03 (emulsão óleo-em-água com alfa-tocoferol) e AS04 (“monophosphoryl lipid A” (MPL) com sais de alumínio) (quadro 1.1) (Reed, Orr & Fox, 2013).

Quadro 1.1: Adjuvantes licenciados para uso humano e em testes clínicos. Ac: anticorpos; ASC: proteína associada a apoptose com domínio de recrutamento de caspase; e particulado; IM: efeito imunomodulador; PF: formulação particulada; C: imunomodulador; ITAM: receptor com motivo de ativação baseado em tirosina; TDB: Trealose dibehenade. Adaptado de Reed, Orr & Fox, 2013.

Adjuvante	Classe	Mecanismo ou receptor	Tipo de resposta imune	Fase clínica ou produto licenciado
Análogo de RNA df (ex.: poli (I:C))	IM	TLR3	Anticorpos, Th1 e células T CD8 ⁺	Fase I
Análogos de lipídeo A (ex.: MPL, GLA, RC529, E6020)	IM	TLR4	Anticorpos, Th1	Cervarix, Supravax, Pollinex Quattro, Melacine
Flagelina	IM	TLR5	Anticorpos, Th1 e Th2	Fase I
Imidazoquinolinas (ex.: Imiquimod, R848)	IM	TLR7 e TLR8	Anticorpos, Th1	Aldara
CpG ODN	IM	TLR9	Anticorpos, Th1, células T CD8 ⁺	Fase III
Saponinas (ex.: QS21)	IM	Desconhecido	Anticorpos, Th1, Th2, células T CD8 ⁺	Fase III
Ligantes de lectina do tipo C (ex.: TDB)	IM	Mincle, Nalp3	Anticorpos, Th1, Th17	Fase I
Ligantes de CD1d (ex.: α -galactosilceramida)	IM	CD1d	Anticorpos, Th1, Th2, células T CD8 ⁺ NK	Fase I
Sais de alumínio (ex.: hidróxido e fosfato de alumínio)	C	Napl3, ITAM, Carreador de antígeno	Anticorpos, Th2	Diversos produtos licenciados
Emulsões (ex.: MF59, AS03, AF03, esqualeno)	C	Recrutamento de células, ASC, captação de antígenos	Anticorpos, Th1, Th2	Fluad, Pandemrix
Virossomos	FP	Carreador de antígenos	Anticorpos, Th1, Th2	Epaxal, Inflexal V
AS01 (MPL, QS21, lipossomas)	C	TLR4	Anticorpos, Th1, células T CD8 ⁺	Mosquirix
AS03 (MPL, QS21, emulsão)	C	TLR4	Anticorpos, Th1	Fase III
AS04 (MPL, Sal de alumínio)	C	TLR4	Anticorpos, Th1	Cervarix
AS15 (MPL, QS21, CpG, lipossomos)	C	TLR4 e TLR9	Anticorpos, Th1 e células T CD8 ⁺	Fase III
GLA, SE (GLAm emulsão)	C	TLR4	Anticorpos, Th1	Fase I
IC31 (CpG, lipídeo catiônico)	C	TLR9	Anticorpos, Th1, Th2, células T CD8 ⁺	Fase I
CAF01 (TDB, lipossoma catiônico)	C	Mincle, carreador de antígeno	Anticorpos, Th1 e células T CD8 ⁺	Fase I
ISCOM (saponina, fosfolipídeo)	C	Desconhecido	Anticorpos, Th1, Th2, células T CD8 ⁺	Fase 2

Dessa forma, o presente projeto teve como objetivo avaliar a capacidade dos novos adjuvantes Addavax (Invivogen), flagelina FliC (Invivogen) e CAF01 (Statens Serum Institute) em potencializar a resposta imune induzida por formulações vacinais contendo proteínas recombinantes, as quais freqüentemente mostram-se pouco imunogênicas. Nossa intenção foi caracterizar uma formulação capaz de conferir proteção contra FA com menor concentração de antígeno e número de doses em modelo murino, como alternativa mais segura à vacina de vírus atenuado atualmente disponível, a fim de agregar conhecimento nesta área de crescente interesse no campo da vacinologia. Frente a indisponibilidade de testes *in vitro* que substituam os

testes de proteção *in vivo*, utilizamos o modelo de desafio intracerebral com o vírus da FA em camundongos, a fim de obter uma avaliação pré-clínica do potencial de imunogenicidade e proteção das diferentes formulações vacinais testadas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar novas formulações de adjuvantes usando como modelo vacinas experimentais para febre amarela baseadas em antígenos solúveis (proteínas recombinantes) e particulados (vírus inativado).

2.2 Objetivos específicos

- Expressar e purificar proteínas recombinantes E e NS1 do vírus da febre amarela nos sistemas de expressão em procarioto (*E. coli*) e eucarioto (Baculovírus/ células de inseto);
- Avaliar a proteção induzida pelas diferentes formulações experimentais para febre amarela em modelo de proteção murino (desafio intracerebral), em comparação com a vacina atenuada FA17DD;
- Caracterizar as respostas imunes humoral e celular induzidas para as diferentes formulações experimentais com diferentes adjuvantes em modelo murino;
- Estudar a duração da resposta imune induzida pelas melhores formulações vacinais selecionadas (maior taxa de sobrevivência).

3. Metodologia

3.1 Obtenção das proteínas E e NS1 do vírus da febre amarela no sistema *E. coli* cepa BL21 (E YF BL21)

3.1.1 Clonagem das construções recombinantes

As construções expressando as proteínas E e NS1 foram realizadas a partir da clonagem dos respectivos genes nos vetores de expressão pET28a (E) e pET100 (NS1) e expressas em *E. coli* BL21 DE3 Star. Os iniciadores para clonagem foram desenhados usando como molde a sequência do GenBank U17066.1 (“Yellow fever virus vaccine strain 17DD, complete genome”) e sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies, Inc.). A descrição dos iniciadores utilizados segue no anexo A.1.

Para realização das clonagens dos respectivos genes, os mesmos foram amplificados a partir de RT-PCR utilizando como molde o vírus vacinal de febre amarela FA17DD (lote 079VFB006Z). A RT-PCR foi realizada com o “kit Superscript III One Step RT-PCR with Platinum Taq” (Thermo). Os reagentes e condições de amplificação seguem descritos nos quadros 3.1 e 3.2, respectivamente. Os iniciadores utilizados estão descritos no anexo A.3.1.

Quadro 3.1: Reagentes para reação de PCR para amplificação do gene de interesse nos respectivos vetores.

Reagente	Concentração	Volume
Tampão de Reação com 0,4 mM de cada dNTP e 3,2 mM de MgSO ₄	2X	25 µL
RT-Taq Polymerase High Fidelity	5 U/µL	2 µL
Iniciador “Forward”	10 µM	1 µL
Iniciador “Reverse”	10 µM	1 µL
RNA molde	100 ng	4 µL
Água livre de DNase/ RNase	-	17 µL
Volume final		50 µL

Quadro 3.2: Condições de ciclos da reação de RT-PCR

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
RT-PCR	1x	55 °C	30'
Desnaturação inicial	1x	94 °C	2'
Desnaturação	40x	94 °C	15"
Anelamento		60 °C	30"
Extensão		68 °C	2'
Extensão final	1x	68 °C	7'

O produto da RT-PCR foi analisado em gel de agarose 1 % e purificado com kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega). A quantificação foi realizada com Qubit. Os produtos de RT-PCR foram digeridos com enzimas de restrição para clonagem nos respectivos vetores e submetidos a reação de ligação (14 °C por 16 h).

Em seguida, células competentes de *E. coli*, cepa TOP 10, foram transformadas por eletroporação com os respectivos plasmídeos conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). Resumidamente, 100 µL de células TOP 10 eletrocompetentes foram transformadas com 10 % do volume de ligação dos respectivos clones em cubeta de 0,2 mm e com o auxílio do aparelho MicroPulser (Bio-Rad). Em seguida, foram adicionados 900 µL de meio SOC (vide anexo A.3.2) à cubeta e o volume total foi transferido para tubo de 15 mL e incubado por 1 h a 37 °C/ 200 rpm (rotações por minuto) em agitador (Incubator Shaker Series Inova, Eppendorf). As células foram então semeadas em placas contendo LB agar e o respectivo antibiótico de seleção (25 µg/mL de Canamicina para a construção pET28a/ E YF; 100 µg/mL de ampicilina para a construção pET100/ NS1 YF). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h em estufa (Heratherm, Thermo Fisher Scientific). As colônias obtidas foram semeadas em 5 mL de meio LB suplementado com o antibiótico de seleção e os inóculos incubados a 37 °C/ 200 rpm por 16 h. Após essa etapa de expansão dos clones, foi realizada a extração plasmidial com o kit “High Pure Plasmid Isolation” (Roche Life Science) e a confirmação da clonagem foi realizada por PCR para amplificação dos genes *E* ou *NS1*.

Alíquotas de estoque de células bacterianas contendo os respectivos plasmídeos recombinantes foram preparados em glicerol 50 % e mantidos a -70 °C.

Os clones foram submetidos a PCR para confirmar o sucesso da clonagem (descrição da mistura de reagentes e ciclos da PCR nos quadros 3.3 e 3.4, respectivamente) e a sequenciamento para checar a identidade dos insertos.

Quadro 3.3: Reagentes para reação de PCR para detecção do gene de interesse.

Reagente	Concentração	Volume
Tampão de PCR sem MgSO ₄	10X	5 µL
dNTPs Mix	10 mM	
MgSO ₄	50 mM	2 µL
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	5 U/µL	0,2 µL
Iniciador "Forward"	10 µM	1 µL
Iniciador "Reverse"	10 µM	1 µL
DNA molde (plasmídeo)	100 ng	1 µL
Água livre de DNase/ RNase	-	38,8 µL
Volume final		50 µL

Quadro 3.4: Condições de termociclagem da reação de PCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1x	94 °C	2'
Desnaturação	35x	94 °C	15"
Anelamento		55 °C	30"
Extensão		68 °C	1'
Extensão final	1x	68 °C	5'

3.1.2 Expressão e purificação das proteínas E YF (BL21) e NS1 YF (BL21)

Estoques bacterianos contendo o clone pET28a/ EYF foram amplificados para cultivo em biorreator de 2 L (Newbruswick) para obtenção de maior massa para purificação. As melhores condições de cultivo (meio de cultura) e indução, como concentração de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) e temperatura de expressão, foram previamente determinadas no micro biorreator Fogale.

Para produção de um lote de 2 L de cultivo em biorretor, inicialmente foi preparado um pré-inóculo no volume de 250 mL de meio TB (“Terrific broth”- composição no anexo A.3.2) suplementado com 25 µg/mL de canamicina e 1 % de glicose e incubado a 37 °C/ 200 rpm por 16 h. Na manhã seguinte foi aferida a DO (desindade óptica) alcançada no espectrofotômetro a 600 nm, e o pré-inóculo foi então diluído de maneira a iniciar o cultivo em biorretor com DO 0,5. O cultivo em vaso de 2 L foi realizado a 37 °C, com a agitação de 300 – 500 rpm e uma taxa de oxigênio dissolvido (DO₂) > 80 % por cerca de 2 h, até alcançar a DO de 0,6-0,8 para indução. Ao atingir a DO desejada, foi realizada a indução com 0,5 mM IPTG. O cultivo foi mantido nas mesmas condições por 4h para a expressão. Após a incubação a cultura foi centrifugada (14000 rpm, por 15 minutos a 4 °C) e os “pellets” congelados a -20 °C para posterior purificação.

Como a proteína foi obtida na forma de corpúsculos de inclusão, foi desenvolvido um protocolo de lavagens e centrifugações subsequentes (7800 g, por 30 minutos a 4 °C) em tampões contendo Lisozima 100 µg/mL e concentrações de detergentes (Triton X-100 0,1 %) nos quais a proteína não é solúvel, visando à clarificação da amostra. Em seguida, os corpúsculos de inclusão foram solubilizados no tampão de lise Tris 50 mM NaCl 300 mM Ureia 8 M Imidazol 5 mM pH 8,0 (10 mL de tampão / 1 g de pellet) com auxílio de sonicador (1 ciclo de 1’ e 3 ciclos de 30” no gelo; com intervalos de tempo de 30” entre cada ciclo). Após a solubilização dos “pellets”, o material foi novamente centrifugado a 7000 g/ 15’ a 4°C e o sobrenadante submetido a filtração a 0,22 µm (Millex, Eppendorf) para clarificação final da amostra.

A proteína recombinante E YF foi clonada com uma cauda de seis histidinas, permitindo o estabelecimento de estratégia de purificação por cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC). A purificação foi realizada com coluna HP HisTrap (GE Healthcare) no Akta Purifier 10 (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, a coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna do tampão de ligação (Tris 50 mM NaCl 300 mM Ureia 8 M Imidazol 5 mM). A fim de favorecer a interação da proteína com a resina, a amostra foi recirculada durante 2 h com fluxo 0,5 mL/ min. A eluição foi realizada em gradiente contínuo com 100 % Tris 50 mM NaCl 100 mM Ureia 4 M Imidazol 1 M Sorbitol 8 % em 30 minutos. Frações foram coletadas ao longo de toda a purificação para monitorar o processo e determinar a presença da proteína de interesse. Uma vez concluída a eluição, a coluna foi reequilibrada com tampão de ligação. As diferentes frações

coletadas foram preparadas com tampão de amostra para avaliação por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5 % (Laemmli UK, 1970).

As frações da purificação contendo a proteína de interesse foram dialisadas lentamente a 4 °C em cassetes (Slide-A-Lyzer 10 k, Thermo) com redução gradual da concentração de ureia até sua completa retirada, para renovelamento da proteína de interesse. A proteína purificada foi mantida no tampão Tris 20 mM Sorbitol 8 % Triton 0,5 % e quantificada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) utilizando o “kit Pierce BCA Protein Assay” (Thermo Scientific). Sua homogeneidade foi avaliada por densitometria usando o equipamento “GS-800 Calibrated Densitometer” e o software “Quantity One”, ambos da Bio-Rad. Posteriormente, alíquotas de proteína foram submetidas a protocolo de congelamento rápido por imersão em gelo seco com ETOH e armazenadas a -70 °C até o preparo das formulações.

Da mesma maneira, a expressão da proteína NS1 YF BL21 também foi realizada em bioreator de 2 L para obtenção de maior massa antigênica para purificação, conforme descrito acima. Esta também foi construída contendo uma cauda de histidina visando sua purificação por cromatografia de afinidade, seguindo estratégia similar à utilizada para a proteína E; porém com menor concentração de Ureia para solubilização da proteína (Ureia 6 M). Como a proteína NS1 também foi obtida apenas na forma de corpúsculo de inclusão, etapas de lavagens e centrifugações subsequentes foram realizadas para clarificação da amostra (porém sem a utilização de detergentes nesse caso). A lise propriamente dita foi realizada com o tampão Tris 20 mM Ureia 6 M NaCl 100 mM Imidazol 1 M pH 8,0. A purificação no Akta Purifier também foi realizada em gradiente linear com 100 % do tampão de eluição (Tris 20 mM NaCl 100 mM Ureia 4 M Sorbitol 8 % Triton 0,5 %) em 30 minutos. A diálise para remoção da ureia e renovelamento, bem como a quantificação, foram realizadas conforme descrito acima.

3.2 Obtenção da proteína E do vírus de febre amarela no sistema *E. coli* cepa “Shuffle” (E YF “Shuffle”)

Como tentativa de melhorar a qualidade do antígeno gerado, optamos por expressar inicialmente a construção recombinante pET28a/ E YF na cepa “Shuffle” a fim de favorecer a formação de pontes dissulfeto. Essa característica poderia melhorar a solubilidade da proteína recombinante, bem como favorecer a obtenção de um

enovelamento mais próximo ao original. Caso fossem obtidos resultados melhores com este antígeno, essa estratégia também seria realizada para a proteína NS1.

Para isso, foram preparadas células “Shuffle” eletrocompetentes para permitir sua transformação por eletroporação e preparação de estoques bacterianos dessa cepa contendo o clone de interesse. As células foram cultivadas e a expressão induzida seguindo condições similares estabelecidas pela construção na cepa BL21 (idem 3.1.2).

A purificação também foi realizada por lise de corpúsculo de inclusão e cromatografia de afinidade conforme já descrito acima. Alíquotas de proteína purificada e quantificada foram mantidas a -70 °C para posterior formulação.

3.3 Produção de soro policlonal anti E YF e anti NS1 YF para etapas de caracterização

Para a produção de soro policlonal a ser utilizado nos ensaios de caracterização das proteínas recombinantes, 2 grupos de 25 camundongos BALB/c foram imunizados com as respectivas proteínas recombinantes E YF e NS1 YF produzidas na célula BL21 DE3 Star, na dose de 20 µg e formuladas com o adjuvante hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) 0,2 % para imunização por via intramuscular. Os animais foram imunizados com 2 doses das respectivas formulações com intervalo de 15 dias. Decorridos 20 dias da última dose, os animais foram eutanasiados por punção cardíaca. Os soros foram avaliados quanto a sua capacidade soroneutralizante por PRNT individualmente, para uma avaliação preliminar da imunogenicidade dos antígenos e posteriormente foram confeccionados “pools” anti E YF e anti NS1 YF, respectivamente, para utilização em ensaios de “western blotting” e imunofluorescência.

3.4 Obtenção das proteínas E e NS1 do vírus de febre amarela no sistema baculovírus/ células de inseto (Sf9)

O sistema “Bac-to-Bac Baculovirus Expression System” (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para realizar a clonagem e expressão das proteínas em células de inseto da linhagem Sf9.

3.4.1 Construção dos plasmídeos doadores pFast Bac Dual/ Eecto YF e pFast Bac Dual/ NS1 YF

Os genes de interesse foram amplificados a partir de RT-PCR usando como o molde o vírus da febre amarela vacinal FA17DD (idem descrito no item 3.1.1). Os iniciadores foram desenhados com base na sequência U17066.1 (“Yellow fever virus vaccine strain 17DD, complete genome”) depositada no GenBank e sintetizados pela empresa IDT. A descrição dos iniciadores utilizados segue no anexo A.1.

Após a purificação dos produtos de RT-PCR com o “kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega) conforme as instruções do fabricante, estes foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição escolhidas. Paralelamente, alíquotas do vetor pFast Bac Dual foram tratadas com as mesmas enzimas de restrição selecionadas para cada construção, de maneira a permitir a clonagem dos genes de interesse. Após as digestões das alíquotas de vetor com o respectivo par de enzimas, estes foram defosforilados com a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP, do inglês “Shrimp Alkaline Phosphatase”, Promega) e purificados com o mesmo kit citado acima. O vetor e os insertos digeridos e purificados foram quantificados por Qubit para realização da reação de ligação na proporção de 1:10 (m/m) (vetor: inserto). A ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Thermo) a 14 °C por 16 h.

Através de eletroporação células *E. coli* TOP 10 foram transformadas com os plasmídeos recombinantes conforme escrito no item 3.1.1. As colônias recuperadas de cada construção transformada (com pFast Bac Dual/ EectoYF ou pFast Bac Dual/ NS1YF) foram semeadas individualmente em tubos contendo 5 mL de meio LB suplementado com os respectivos antibióticos de seleção e foram incubadas a 37 °C/ 200 rpm por 16 h. No dia seguinte foi realizada a extração de DNA plasmideal dos clones crescidos “overnight” com o “kit High Pure Plasmid Isolation” (Roche) para triagem dos clones positivos para o gene de interesse. Esta confirmação foi feita por digestão enzimática e avaliação do perfil eletroforético em gel de agarose 1,2 % (liberação do inserto de tamanho compatível com o esperado). Alíquotas dos clones positivos foram armazenados a -70°C como estoque para realização das etapas subsequentes.

Os clones recombinantes obtidos foram sequenciados pelo método de Sanger (1977) no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER/ Bio-Manguinhos) para análise de identidade das sequências de interesse clonadas.

3.4.2 Obtenção dos bacmídeos recombinantes

Alíquotas de células DH10Bac competentes previamente preparadas foram transformadas por eletroporação com 1ng das construções pFast Bac Dual/ EctoYF ou pFast Bac Dual/ NS1 YF (idem procedimento descrito no item 3.1.1). Após a incubação a 37 °C/ 200 rpm por 1 h para recuperação das membranas, o volume total dos tubos foi fracionado e semeado em placas de petri (uma com 10 % e duas com 45 %). As placas continham meio LB agar suplementado com 50 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina, 40 µg/mL de IPTG e 20 µg/mL X-gal. Após 48 h de incubação, as colônias portadoras do bacmídeo recombinante apresentavam fenótipo branco. Para confirmar o fenótipo e estabilidade dos clones, as colônias brancas foram repicadas mais duas vezes em placas contendo o mesmo meio. Uma vez confirmado o fenótipo, colônias brancas isoladas foram recuperadas e semeadas em tubo com meio LB suplementado com os antibióticos de seleção citados. Os tubos foram incubados a 37 °C/ 200 rpm por 16 h para proliferação dos clones.

Após o crescimento “overnight”, algumas alíquotas de cada cultivo foram armazenadas em glicerol 50 % e congeladas a -70 °C como estoque. Os volumes remanescentes foram centrifugados e os “pellets” submetidos a extração de DNA com o “kit PureLink HiPure Plasmid Maxiprep” (Thermo), conforme as instruções do fabricante.

A confirmação da transposição dos genes de interesse (*Ecto* e *NS1*) foi realizada por PCR usando iniciadores que flanqueiam a região de transposição (pUC/M13 Fw e pUC/M13 R) e combinações destes com os iniciadores específicos para os genes de interesse (vide iniciadores no anexo 3.1). Os reagentes seguem descritos no quadro 3.3, alterando apenas os pares de iniciadores utilizados. As condições de amplificação seguem descritos no quadro 3.5 a seguir:

Quadro 3.5: Condições de amplificação da reação de PCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1x	94 °C	2'
Desnaturação	35x	94 °C	1'
Anelamento		55 °C	1'
Extensão		68 °C	5'
Extensão final	1x	68 °C	7'

A eficiência da transposição foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e análise dos tamanhos obtidos vs. tamanhos esperados. Os bacmídeos foram quantificados por Qubit para transfecção em células de inseto.

3.4.3 Produção dos estoques de baculovírus recombinantes

Garrafas T-25 contendo monocamadas de $2,5 \times 10^6$ células de inseto SF9 preparadas 16 h antes foram transfectadas com os bacmídeos recombinantes Ecto YF e NS1 YF. Como controle negativo, uma terceira garrafa foi transfectada com o bacmídeo vazio. A transfecção foi realizada com Cellfectin (Life Technologies), segundo as instruções do fabricante. Cada garrafa de SF9 foi transfectada com aproximadamente 6 µg de bacmídeo. As garrafas foram incubadas a 28 °C por 6 dias. Decorrida essa incubação, os sobrenadantes contendo os baculovírus recombinantes foram coletados (estoque P1), suplementados com 2 % de soro fetal bovino (SFB, Gibco) como estabilizador e armazenados a 4 °C e abrigo da luz, conforme orientações do manual do sistema Bac-to-Bac (“Bac-to-Bac Baculovirus Expression System”, Life Technologies).

A fim de aumentar o título viral e produzir um lote de trabalho (P2), os estoques P1 de baculovírus recombinantes obtidos (Ac/EctoYF P1 e Ac/NS1 YF P1) foram utilizados para infectar garrafas T-75 semeadas com $1,5 \times 10^7$ células. Estoques P1 e P2 de baculovírus vazio também foram produzidos como controle negativo para os ensaios. A infecção foi realizada conforme as instruções do manual, assumindo que o título do estoque P1 seria 1×10^6 PFU/ mL e que a infecção fosse realizada com multiplicidade de infecção (MOI) 0,1. Após a infecção, os inóculos foram homogeneizados a cada 15 minutos para favorecer a adsorção viral, durante 1 h. As garrafas foram incubadas em estufa a 28 °C por 72 h. Concluída a incubação, os

sobrenadantes foram coletados, clarificados por centrifugação (400 xg / 4 °C por 5 minutos), suplementados com 2 % de SFB e armazenados a 4 °C e abrigo da luz.

3.4.4 Titulação dos baculovírus recombinantes

A titulação dos estoques virais foi realizada em placas de seis poços semeadas com 1×10^6 células Sf9/ poço com 18 h de antecedência. Para titulação, as amostras virais foram submetidas a diluição seriada com fator 4 ($10^{-2,6}$ a $10^{-5,6}$) em meio Sf900-III (Life Technologies), em placas de 24 poços a parte. Um vez realizada a diluição seriada, o meio das placas foi aspirado e substituído por 200 μ L das diluições em duplicata. A adsorção viral foi realizada por 1 h a temperatura ambiente, homogeneizando as placas suavemente a cada 15 minutos. Finalizada a etapa de adsorção, os inóculos remanescentes foram aspirados e as placas adicionadas com 2 mL de meio semissólido (Sf900 1 x Agarose 1% suplementado com solução de antibiótico e antimicótico 1 x (Sigma)). As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias em câmara úmida. Ao fim da incubação, foi possível realizar a contagem dos plaques através da colocação com solução de vermelho neutro 0,1 %. O número de placas de lise de cada diluição foi contado e o título viral foi calculado com a fórmula a seguir:

$$T = \text{Log}_{10} M + \text{Log}_{10} ID + \text{Log}_{10} FC$$

Onde:

T = título expresso em \log_{10} PFU/mL;

M = média do n° de placas de lise contadas em uma determinada diluição;

ID= inverso da diluição onde as placas de lise foram contadas;

FC = fator de correção do inóculo para 1 mL. Como o inóculo corresponde a 200 μ L, que é a quinta parte de 1000 μ L, $FC = 0,7$ ($\log 5 = 0,7$).

3.4.5 Caracterização da expressão das proteínas Ecto YF e NS1 YF em baculovírus/ células de inseto

3.4.5.1 Detecção por “SDS-PAGE” e “Western Blotting”

Placas de 6 poços com monocamadas de células Sf9 (1×10^6 células/ poço) foram preparadas com 18 h de antecedência ao passo a seguir. As infecções com os

estoques virais foram realizadas inicialmente com MOI de 5 para avaliar a expressão. O procedimento de infecção e adsorção foram realizados conforme descrito no item 3.3.4, com exceção da incubação final com meio semissólido. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 h em câmara úmida. Concluída a incubação, os sobrenadantes foram coletados e clarificados por centrifugação (500 x g/ 4 °C por 5 minutos). Paralelamente, as monocamadas remanescentes foram removidas através de lavagens com pequeno volume de meio e os pellets armazenados após centrifugação. Alíquotas de ambas as frações foram preparadas com tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 2 %, Azul de Bromofenol 0,1 %, Glicerol 10 %, Betamercaptoetanol 100 mM) para análise por SDS-PAGE e “Western Blotting”. Foram aplicados 15 µL de amostra para análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5 % utilizando o sistema Miniprotean (Bio-Rad). O gel foi fixado com solução Etanol 50 % Ácido Acético 10 % e corado com “Gel Code Blue Stain Reagent” (Thermo) conforme instruções do fabricante. Paralelamente, uma duplicata do gel submetido a SDS-PAGE teve suas proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad) usando o sistema “Semi-dry” (Bio-Rad), conforme as instruções do fabricante. A membrana com as proteínas imobilizadas foi bloqueada (PBS-T 0,05 % Leite 5 %) e revelada com o auxílio do anticorpo primário específico (anti E policlonal 1:1000 ou anti NS1 policlonal 1:500, ambos produzidos “in house” conforme descrito no item 3.3). Em seguida, foi realizada a marcação com o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado a fosfatase alcalina na diluição 1:30000 (A3688, Sigma). A revelação foi realizada com o substrato cromogênico “Western Blue Stabilized for Alkaline Phosphatase” (Promega).

3.4.5.2 Cinética de expressão e distribuição intracelular por imunofluorescência

Células Sf9 foram cultivadas em lâminas de 8 poços (Lab-Tek Chamber Slides, Nalge Nunc International) com 30.000 células/ poço e infectadas com MOI de 10 dos baculovírus recombinantes (Ac Ecto YF e Ac NS1 YF). Como controle negativo foram mantidos dois poços sem infecção (“mock”) e dois poços foram infectados com baculovírus vazio (Ac vazio). Duas lâminas idênticas foram confeccionadas para acompanhar a cinética de expressão nos tempos 72 h e 96 h pós infecção. As monocamadas celulares foram fixadas com solução de paraformaldeído 4 % em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 por 2 minutos a 37 °C, 72 horas após a infecção. Foi

então realizada a permeabilização com solução de PBS/ Triton X-100 0,5 % por 10 minutos à temperatura ambiente e bloqueio com solução de PBS/ BSA 1 % (Sigma). Para a marcação foram utilizados os anticorpos policlonais anti proteína E YF (1:100) e anti NS1 YF (1:100) produzidos “in house”. Após três lavagens subsequentes com a solução de bloqueio (PBS/ BSA 1 %), o anticorpo “Anti mouse polyvalent Ig” conjugado com FITC (Sigma) (1:400) foi adicionado a todos os poços e incubado por 1h a temperatura ambiente. A lâmina foi montada com o reagente “Slow Fade Gold antifade with 4,3-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI)” (Invitrogen), selada com esmalte e armazenada a -20 °C até a realização de sua leitura em microscópio de fluorescência da Plataforma PDTIS.

3.4.5.3 Avaliação de diferentes MOIs para aumentar a expressão

A fim de aumentar a expressão das proteínas recombinantes expressas no sistema baculovírus/ células Sf9, diferentes MOIs foram testadas (1, 2, 5, 10, 15 e 20). As infecções nas diferentes MOIs foram realizadas para ambos os baculovírus recombinantes em placas de 6 poços com monocamadas de células Sf9 nas mesmas condições descritas no item 3.3.5.1. Para esse teste foi fixado o tempo de incubação de 96h pós infecção e a detecção dos níveis de expressão foi visualizada por “Western Blotting” conforme já descrito acima (item 3.3.5.1).

3.4.5.4 Avaliação da presença de glicosilação

Para avaliar a presença de glicosilação na proteína recombinante Eecto YF, foi realizada a coloração com o “kit Pro Q Emerald 300 Gel Stain” (Thermo) conforme as instruções do fabricante. Nesse ensaio foram aplicados todos os antígenos utilizados nas formulações avaliadas para febre amarela (vírus FA17DD inativado, proteína E (BL21) e proteína Eecto (Sf9) para fins de comparação.

3.4.6 Construção de proteína Eecto YF contendo sequência sinal para excreção celular

Como estratégia para obter a proteína recombinante de interesse secretada no meio extracelular, foi desenhada e clonada uma nova construção contendo a sequência sinal do gene *GP64*. Os primers utilizados nesse caso seguem descritos

no quadro A.3.1. A clonagem seguiu as mesmas etapas descritas nos itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3. A expressão foi analisada por “Western Blotting” conforme descrito em 3.2.5.1.

3.4.7 Cultivo de células Sf9 em suspensão em frascos tipo “spinner” e infecção com baculovírus recombinantes para expressão das proteínas de interesse

A fim de aumentar a expressão de proteínas, o cultivo foi realizado em suspensão em frascos tipo “spinner” de 250 mL. Para isso, foram preparadas garrafas T-75 para obter inóculo celular inicial de 3×10^5 células/ mL em volume de trabalho de 125 mL/ frasco. Os cultivos foram mantidos em estufa a 28 °C a 90 rpm. A curva de crescimento e viabilidade celular foram acompanhadas diariamente. Um dos frascos “spinner” foi mantido como estoque para realizar os subcultivos a cada 3 ou 4 dias, de maneira que a densidade celular nunca ultrapasse 2×10^6 células/ mL para manter as células em fase exponencial.

Os demais frascos “spinner” destinados a infecção e expressão eram infectados com os respectivos baculovírus recombinantes quando a densidade celular chegava a cerca de 2×10^6 células/ mL. As infecções foram realizadas com MOI de 5 e 10, sempre em batelada com 3 frascos concomitantes infectados pelo mesmo vírus (Ac Ecto YF P2 ou Ac NS1 YF P2) nas mesmas condições de infecção (lote e MOI). As coletas foram realizadas com 96 h pós-infecção, quando a viabilidade celular decaía a cerca de 60 %. O volume total dos cultivos foi então distribuído em tubos de 50 mL e centrifugados a $400 \times g$ / 10 minutos a 4 °C. Os “pellets” foram armazenados a -20 °C para posterior purificação.

3.4.8 Purificação da proteína recombinante E ecto YF (Sf9)

A proteína recombinante expressa em baculovírus/ células de inseto também foi construída com uma cauda de histidina para permitir sua purificação por cromatografia por afinidade (IMAC). Nesse caso, os “pellets” contendo a proteína de interesse foram submetidos a uma pré-lavagem com tampão PBS contendo DNase (0,4 U/mL) para eliminar o DNA residual das células de eucarioto e PMSF 1 mM e inibir a degradação por proteases. A solubilidade da proteína recombinante foi

avaliada através de “Western Blotting” das frações solúveis e insolúveis obtidas após a lise com diferentes tampões.

A partir da determinação da solubilidade da proteína, a lise foi realizada com o tampão Tris 50 mM NaCl 500 mM Ureia 8 M Imidazol 5 mM PMSF 1 mM pH 8,0. A purificação foi conduzida no Akta Pure (GE Healthcare) usando uma coluna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare). Após a ligação da amostra, a cromatografia foi realizada em “steps” com concentrações crescentes de imidazol. Essas concentrações foram realizadas usando diferentes proporções dos tampões de ligação (Tris 50 mM NaCl 500 mM Ureia 4 M Imidazol 5 mM PMSF 1 mM pH 8,0) e de eluição (Tris 50 mM NaCl 500 mM Ureia 4 M Imidazol 1 M).

A fração contendo a proteína de interesse foi eluída com homogeneidade adequada, dialisada para retirada da ureia e concentrada em tubos Amicon (Sigma) conforme orientações do fabricante. Após a dosagem por BCA, foram preparadas alíquotas congeladas a -70 °C para posterior formulação.

3.5 Obtenção do vírus de febre amarela 17DD inativado (FA 17DD inativado) em células Vero

O vírus FA 17DD inativado é um candidato vacinal atualmente em desenvolvimento de um projeto de Bio-Manguinhos. O Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) em Bio-Manguinhos produziu o vírus e a gerente do projeto nos cedeu parte desses lotes para nosso estudo. O vírus foi produzido através do cultivo de células Vero (linhagem celular de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) em biorreatores de 3 L modelo BioFlo 110 (New Brunswick Scientific) operado em modo batelada, utilizando meio de cultivo livre de soro VP-SFM (Gibco) e microcarregadores Cytodex (GE Healthcare). O sobrenadante contendo o vírus foi clarificado utilizando uma sequência de membranas de acetato de celulose. A suspensão viral foi purificada em duas etapas: (i) captura por troca iônica utilizando a membrana Sartobind Q75 (Sartorius) e (ii) polimento com multimodal Captocore 700 (GE Healthcare). Após a purificação, a inativação foi realizada com β -propiolactona.

As amostras de vírus foram quantificadas por titulação em placa e congeladas a -70 °C até o preparo das formulações para as os ensaios com animais.

3.5.1 Titulação viral por contagem de placas de lise

A titulação das amostras virais foi realizada a partir da infecção de monocamada de células Vero com densidade de 100.000 células /cm² preparadas com 24 horas de antecedência, em placas de 6 orifícios. Inicialmente foi realizada a diluição seriada de 10^{-2,6} a 10^{-5,6} das alíquotas virais, seguindo-se a inoculação de 200 µL das diferentes diluições em placa de 6 poços. Após o inóculo, as placas foram incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ para a adsorção viral, homogeneizando a cada 15 minutos. Decorrida uma hora de incubação, o excesso de vírus de cada poço foi aspirado, sendo substituído por 3 mL de carboximetilcelulose 2 % (CMC, Sigma) com meio Earle 199 acrescido de 5 % NaHCO₃, 5 % de SFB e 1 % de gamicina. Foi realizada então a incubação em estufa a 37 °C/ 5 % CO₂ por 7 dias. Uma vez concluída a incubação, as placas foram fixadas pela adição de uma solução de formaldeído (Merck) a 5 %, lavadas em água e coradas com solução de cristal violeta a 0,04 % (m/v) por 30 minutos.

O número de placas de lise de cada diluição foi contado e o título do vírus foi determinado conforme descrito no item 3.2.4.

Esse protocolo de ensaio foi utilizado para: monitorar a produção viral e todo o processo de purificação do vírus antes de sua inativação; quantificar o vírus atenuado comercial para preparo de doses vacinais e controle de inóculo (“back titration”) e quantificar o vírus usado no desafio intracranial nos ensaios em camundongos.

3.5.2 Quantificação viral por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A partir da inativação viral, os lotes de vírus FA17DD inativado passaram a ser quantificados por ensaio de ELISA para febre amarela no Laboratório de Tecnologia Imunológica (LATIM). Para realização deste ensaio, placas de 96 poços (MaxiSorp, Nunc) foram previamente sensibilizadas com 1µg/mL do anticorpo de captura anti-flavivírus (4G2, monoclonal produzido “in house” no Laboratório de Tecnologia de Monoclonais_ LATAM, Bio-Manguinhos) diluído em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 (100µL/ poço). As placas foram sensibilizadas por 16 h a 4 °C.

Uma vez sensibilizadas, as placas foram submetidas a 5 ciclos de lavagem com tampão PBS pH 7,4/ Tween 0,05 % (PBS-T) com o auxílio da lavadora (WellWash, Thermo), e adicionadas com 100 µL da solução de bloqueio (PBS-T Leite desnatado

5 %, SFB 3 %, BSA 0,05 %) por poço. O bloqueio foi realizado por 1 hora a 37 °C e em seguida foi realizada mais uma etapa de lavagem. Após esta etapa, as amostras a serem dosadas foram submetidas a diluição seriada em tampão de bloqueio. Paralelamente, como curva padrão, uma amostra de vírus FA17DD produzido em biorreator e de concentração conhecida também foi submetida diluição seriada com fator 2 (faixa de diluição 1: 20 a 1: 0,31). Após nova etapa de incubação (1 hora/ 37 °C), as placas lavadas e adicionadas com o anticorpo secundário 4G2 conjugado a peroxidase. As placas foram novamente incubadas a 37 °C/ 1 hora e após lavagens subsequentes, foi realizada a adição do substrato TMB Plus 2 (Ken Em Tech) seguido de incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação colorimétrica foi interrompida pela adição de 100 µl de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2 N). A leitura foi realizada a 450 nm na leitora de placas VERSAmax microplate reader (Molecular Devices). E os resultados foram obtidos com o programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

Além da quantificação dos vírus inativados para preparo das doses, esse ensaio também foi utilizado para avaliar a eficiência de adsorção do vírus inativado ao adjuvante Al (OH)₃. Nesse caso foram quantificados uma amostra do vírus diluído para a concentração desejada para a dose e o sobrenadante obtido após centrifugação da amostra formulada com Al (OH)₃. Durante a formulação, o antígeno deve adsorver aos sais de alumínio e, conseqüentemente, após a centrifugação não deve sobrar vírus no sobrenadante.

3.6 Obtenção da proteína recombinante E-1T do vírus de febre amarela expressa em *Nicotiana benthamiana*

Em 2011 Bio-Manguinhos assinou um contrato de co-desenvolvimento de uma vacina de FA de subunidade com as empresas Norte Americanas Fraunhofer e iBio que desenvolveram um sistema de expressão em plantas utilizando um vetor de agrobactéria (Musiychuk, *et al.*, 2007; Mett, *et al.*, 2008; Chichester & Yusibov, 2008). O vetor é inserido na planta *Nicotiana benthamiana* não OGM através de agroinfiltração, onde é forçado a entrar nos espaços intercelulares de todos os tecidos da planta. A partir desta técnica foi obtida a construção E-1T baseada na proteína E do vírus de FA17DD. Uma vez expressa, essa proteína é purificada por cromatografia e encaminhada para a realização de ensaios pré-clínicos em Bio-Manguinhos.

Amostras dessas proteínas foram cedidas gentilmente pela gerente do projeto para avaliação em nosso estudo.

3.7 Ensaios em modelo animal

A imunogenicidade e proteção induzidas pelas diferentes formulações foram avaliadas após a imunização de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 4 a 6 semanas de idade. Todos os ensaios com animais foram conduzidos de acordo com a licença CEUA LW 25/16 no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN/Bio-Manguinhos).

Todos os ensaios foram realizados usando como grupos controle: (i) negativo (camundongos imunizados apenas com veículo_ diluente ou adjuvante sem antígeno) e (ii) positivo (grupo imunizado com vacina atenuada FA17DD contendo cerca de 10^5 PFU de vírus). Ao longo do estudo foram preparadas formulações de adjuvantes com os antígenos de diferentes naturezas produzidos: proteínas E YF e NS1 YF expressas em *E. coli*; proteína E ecto YF expressa em baculovírus/Sf9 e vírus inativado FA 17DD. Os seguintes adjuvantes foram avaliados: Al (OH)₃ (Brenntag), Addavax (Invivogen), combinação de Al (OH)₃ com flagelina FliC (Invivogen) e CAF01 (Statens Serum Institute). As diferentes formulações testadas foram administradas por via intramuscular na face medial do quadríceps no volume de 100 µL, intercalando o lado da administração a cada dose. A vacina atenuada FA17DD foi administrada em dose única por via intradérmica no coxim plantar (50 µL em cada membro).

As vacinas experimentais foram administradas com esquema de duas ou três doses com intervalo de 28 ou 14 dias, respectivamente. Para monitorar a cinética da resposta imunológica, amostras de sangue foram obtidas por coleta retrorbital no tempo pré (-2) e entre as diferentes doses, 12 e 26 dias pós inoculação (dpi). Decorridos 14 dias da última dose (42 dpi), foi feita a sangria por punção cardíaca dos animais para obtenção do soro pós protocolo de imunização completo, bem como a retirada do baço de parte dos animais de cada grupo para obtenção dos esplenócitos para avaliação da resposta celular. Seguem os esquemas de imunização na figura 3.1 a seguir.

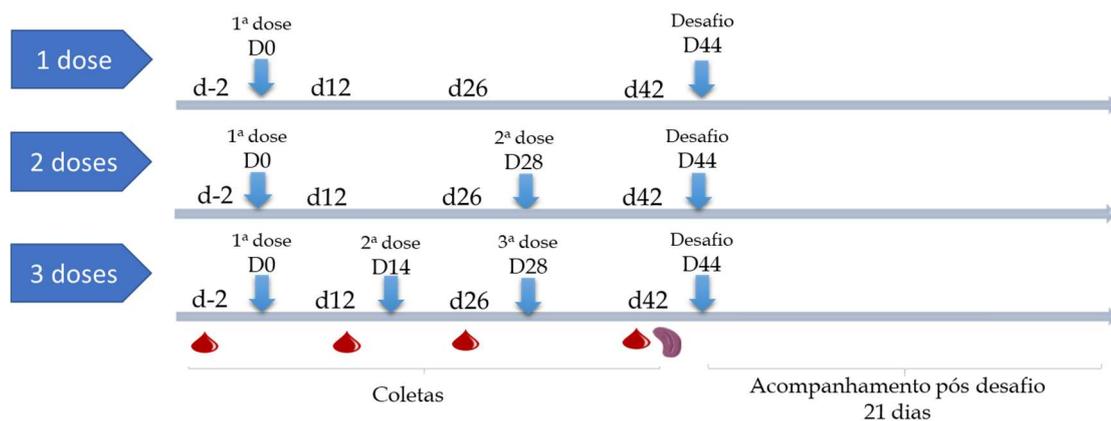


Figura 3.1: Esquemas de imunização usados nos ensaios com animais.

As amostras de soro coletadas foram destinadas a caracterização da resposta humoral desencadeada pelas formulações através da dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela (PRNT) e de anticorpos IgG totais (ELISA). As amostras de baço e outros tecidos coletados foram destinadas a caracterização da resposta celular, com dosagem de citocinas e células secretoras de anticorpos por ELISpot e análise fenotípica das subpopulações celulares por FACS.

A proteção foi avaliada através de desafio por via intracerebral com vírus atenuado FA17DD, modelo de desafio padronizado e rotineiramente utilizado por nosso grupo para avaliar a capacidade de proteção de candidatos vacinais para febre amarela (Pereira *et al*, 2015). O desafio foi realizado através do inóculo de 30 μ L do vírus contendo 100 DL50 por via intracerebral. Os animais foram monitorados diariamente por 21 dias para avaliar e determinar a curva de sobrevivência. Os animais que apresentaram perda de peso, prostração ou paralisia foram submetidos à eutanásia.

3.7.1 Preparo das formulações

As formulações de proteínas recombinantes ou vírus inativado com 0,3 % de hidróxido de alumínio foram preparadas na véspera das imunizações e foram realizadas sob agitação constante (agitador orbital “Labquake Tube Shaker”, Thermo) a 4 °C na câmara fria por 16- 18 horas. Após este período, foram separados cerca de 500 μ L de cada formulação para controle da eficiência da adsorção através da análise dos sobrenadantes por ELISA (vírus inativado) ou “Western Blot” (proteínas recombinantes).

As formulações com Addavax e CAF01 foram preparadas da mesma maneira citada, uma vez que os estoques de antígenos descongelados eram destinados a confecção de todas as doses. Porém, estas formulações deveriam ser preparadas e imediatamente utilizadas segundo os fabricantes.

A vacina atenuada foi preparada conforme a recomendação do fabricante. Um frasco de 5 doses contendo o vírus liofilizado foi ressuspensão em 2,5 mL de diluente (água de vacina) em 15 minutos sob repouso em banho de gelo. A suspensão viral foi então transferida para tubo apropriado para encher as seringas para imunização. O volume remanescente após a confecção das doses foi titulado para controle de qualidade (“backtiter” do inóculo).

3.7.2 Ensaio I: Escolha do antígeno modelo e determinação de sua dose

Visando a avaliação de antígenos de febre amarela de diferentes naturezas como modelo para avaliar novos adjuvantes bem como a identificação de sua dose protetora, 120 camundongos C57BL/6 foram divididos em 10 grupos de 12 animais, conforme descrito no quadro 3.6 a seguir. Todos os antígenos candidatos foram formulados com 0,3 % de Al (OH)₃.

Quadro 3.6: Desenho experimental do Ensaio I (escolha do antígeno modelo e determinação de sua dose).

Grupo	Formulações	Nº Animais	Via	Dose de Ag (µg)	Nº de doses (dias)
1	Tampão PBS 1X	12	IM	-	3d (0, 14, 28)
2	Al(OH) ₃	12	IM	-	3d (0, 14, 28)
3	E YF (BL21) + Al(OH) ₃	12	IM	2 µg	3d (0, 14, 28)
4	E YF (BL21) + Al(OH) ₃	12	IM	20 µg	3d (0, 14, 28)
5	NS1 YF (BL21) + Al(OH) ₃	12	IM	2 µg	3d (0, 14, 28)
6	NS1 YF (BL21) + Al(OH) ₃	12	IM	20 µg	3d (0, 14, 28)
7	E YF + NS1 YF (BL21) + Al(OH) ₃	12	IM	10 + 10 µg	3d (0, 14, 28)
8	Vírus FA17DD inativado + Al(OH) ₃	12	IM	5 µg	3d (0, 14, 28)
9	Vírus FA17DD inativado + Al(OH) ₃	12	IM	10 µg	3d (0, 14, 28)
10	Vacina FA17DD atenuada	12	ID	10 ⁵ pfu	1d (0)

O desenho experimental com os intervalos de tempo utilizados entre as imunizações e entre as quatro coletas de sangue dos animais encontra-se descrito na Figura 3.1.

3.7.3 Ensaio II: imunogenicidade e proteção induzida por formulações de vírus inativado com diferentes adjuvantes

Uma vez determinada a dose e capacidade protetora do antígeno viral FA17DD inativado, um segundo experimento de imunogenicidade e desafio foi realizado avaliando formulações baseadas em diferentes adjuvantes. Para este ensaio também foram utilizados 120 camundongos C57BL/6, divididos em 10 grupos, conforme descrito no quadro 3.7 abaixo.

Quadro 3.7: Desenho experimental do Ensaio II (imunogenicidade e proteção induzida por formulações de vírus inativado com diferentes adjuvantes)

Grupos	Formulações	Nº animais	Via	Dose Ag (µg)	Nº doses (Dias)
1	Mock	12	IM	-	3d (0, 14, 28)
2	Al(OH) ₃	12	IM	-	3d (0, 14, 28)
3	Addavax	12	IM	-	2d (0, 28)
4	Al(OH) ₃ + Flagelina	12	IM	-	2d (0, 28)
5	FA17DD inativada + Al(OH) ₃	12	IM	20 µg	3d (0, 14, 28)
6	FA17DD inativada + Al(OH) ₃	12	IM	10 µg	3d (0, 14, 28)
7	FA17DD inativada + Al(OH) ₃	12	IM	10 µg	2d (0, 28)
8	FA17DD inativada + Addavax	12	IM	10 µg	2d (0, 28)
9	FA17DD inativada + Al(OH) ₃ + flagelina	12	IM	10 µg	2d (0, 28)
10	Vacina FA17DD atenuada	12	ID	10 ⁵ pfu	1d (0)

Nesse ensaio foram testadas formulações com diferentes adjuvantes nas seguintes concentrações: Al (OH)₃ 0,3 %, Addavax 50 % e flagelina 1 µg/ dose. As doses de adjuvante foram confeccionadas conforme a recomendação dos fabricantes. A flagelina foi utilizada na concentração mínima de uso devido a limitação da quantidade disponível para preparo das doses. As formulações foram preparadas conforme descrito no item 3.7.1.

O desenho experimental com os intervalos de tempo utilizados entre as imunizações e entre as quatro coletas de sangue dos animais encontra-se descrito na figura 3.1.

3.7.4 Ensaio III: imunogenicidade e proteção induzida por formulações de antígenos de subunidade com diferentes adjuvantes

Optamos por conduzir um experimento avaliando candidatos vacinais para febre amarela baseados em antígenos de subunidade expressos em diferentes sistemas (*E. coli* BL21, baculovírus/ células de inseto e plataforma vegetal) formulados com diferentes adjuvantes. A partir da imunização de 115 camundongos C57BL/6 distribuídos em 10 grupos, foi avaliada a imunogenicidade das diferentes formulações e capacidade protetora frente ao desafio intracerebral. Devido a quantidade limitante da proteína expressa em baculovírus (Ecto YF), esta não foi avaliada em formulações com diferentes adjuvantes. Com a massa disponível para confecção das doses, a proteína Ecto YF foi formulada apenas com Al(OH)₃ e avaliada em regime de 2 doses. Também não foram separados animais imunizados para avaliação da resposta celular nesse caso. O desenho experimental segue descrito no quadro 3.8 a seguir.

Quadro 3.8: Desenho experimental do Ensaio III (imunogenicidade e proteção induzida por formulações de antígenos de subunidade com diferentes adjuvantes)

Grupos	Formulações	Nº Animais	Via	Dose Ag (µg)	Nº de Doses (Dias)
1	Al(OH) ₃	12	IM	-	2d (0, 28)
2	Addavax	12	IM	-	2d (0, 28)
3	CAF01	11 ^a	IM	-	2d (0, 28)
4	E 1T YF + Al(OH) ₃	12	IM	1 µg	2d (0, 28)
5	E 1T YF + Addavax	12	IM	1 µg	2d (0, 28)
6	E 1T YF + CAF01	12	IM	1 µg	2d (0, 28)
7	E (BL21) + Al(OH) ₃	12	IM	20 µg	2d (0, 28)
8	E (BL21) + Addavax	12	IM	20 µg	2d (0, 28)
9	Ecto YF (baculo/Sf9) + Al(OH) ₃	8 ^b	IM	2 µg	2d (0, 28)
10	Vacina FA17DD atenuada	12	ID	10 ⁵ pfu	1d (0)

^a Apenas 11 animais no grupo devido a morte de um dos camundongos durante a quarentena.

^b Grupo de apenas 8 animais imunizados devido a quantidade limitante de antígeno disponível.

Nesse ensaio, além das formulações baseadas em hidróxido de alumínio e Addavax, foi possível avaliar a formulação de um dos antígenos testados com o adjuvante CAF01. Como também havia uma quantidade limitante deste adjuvante, optamos por priorizar a formulação deste com a proteína E 1T YF, por se tratar de um antígeno expresso em sistema eucarioto e que, portanto, potencialmente teria a

estrutura antigênica mais próxima a da proteína E originalmente expressa pelo vírus. Este adjuvante foi utilizado na concentração de 50 % conforme recomendação do fabricante.

O desenho experimental com os intervalos de tempo utilizados entre as imunizações e entre as quatro coletas de sangue dos animais encontra-se descrito na figura 3.1.

3.7.5 Ensaio IV: imunogenicidade e proteção induzida pelas melhores formulações avaliadas e duração da imunidade

Finalmente, foi realizado um último ensaio de imunização em animais com as melhores formulações selecionadas nos ensaios anteriores. Paralelamente, além de avaliar a reprodutibilidade dos resultados de proteção obtidos, optamos por avaliar a duração da imunidade induzida pelas diferentes formulações. Nesse ensaio foram utilizados 62 camundongos C57BL/6. Segue o desenho experimental no quadro 3.9 a seguir.

Quadro 3.9: Desenho experimental do Ensaio IV (imunogenicidade e proteção induzida pelas melhores formulações avaliadas e duração da imunidade)

Grupo	Formulações	N	Via	Nº de Doses (Dias)	Desafio	Duração da imunidade		
						40 dpi	83 dpi	132 dpi
1	Mock	11	IM	3d (0, 14, 28)	8	3	X	X
2	FA17DD inativ+ Al(OH) ₃	17	IM	3d (0, 14, 28)	8	3	3	3
3	FA17DD inativ+Addavax	17	IM	2d (0, 28)	8	3	3	3
4	Vacina atenuada	17	ID	1d (0)	8	3	3	3

O esquema de imunização foi realizado conforme descrito na Figura 1. Parte dos animais imunizados de cada grupo foi submetida ao desafio intracerebral para validar os resultados anteriores. Os demais animais imunizados não desafiados foram eutanasiados nos intervalos descritos no quadro 3.9 (40, 83 e 132 dpi) para acompanhar a duração da imunidade induzida pelas diferentes imunizações. Nestes intervalos de coleta, células do baço, medula óssea e linfonodos drenantes (inguinal e poplíteo) foram separadas para avaliação por ELISpot e FACS.

3.8 Caracterização da resposta imune humoral induzida pelas formulações em camundongos

3.8.1 Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT₅₀)

A detecção de anticorpos neutralizantes por PRNT foi realizada para análise da resposta humoral de todas as formulações testadas nos ensaios de imunogenicidade e proteção. As amostras de soro a serem analisadas foram previamente inativadas a 56 °C por 30 minutos. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, usando uma suspensão celular de células Vero, conforme estabelecido pelo Laboratório de Tecnologia Viroológica (Simões *et al*, 2012). Em linhas gerais, a capacidade neutralizante dos anticorpos presentes no soro é avaliada frente a uma suspensão viral de concentração conhecida e a quantificação indireta das partículas virais remanescentes, não neutralizadas, é realizada através da detecção de placas de lise virais em monocamada de células Vero.

Para realização do ensaio, as amostras foram submetidas a diluição seriada com fator 2 (faixa de diluição de 1: 10 a 1: 1280) em meio diluente (meio Earle's 10 %, Hepes 2,5 %, NaHCO₃ 0,5 %, Soro Fetal Bovino 5 %, Garamicina 1 %), em placas de 96 poços. As colunas 1 e 12 foram destinadas a controle de células. Foram utilizados soros controles positivo e negativo para controle de qualidade dos ensaios. A coluna 11 de cada placa foi destinada ao controle de vírus (vírus FA em meio diluente). Concluída a diluição seriada, a suspensão viral diluída de forma a obter 30 placas de lise por poço foi distribuída em todos os poços (com exceção das colunas destinadas a controle de células) para etapa de neutralização a 37 °C/ 5 % CO₂ por 1 h. Para a etapa de adsorção (adesão celular e entrada dos vírus não neutralizados na célula), uma suspensão de células Vero na concentração de 1,6 x 10⁶ células/ mL foi adicionada às misturas antígeno-anticorpo descritas acima e as placas foram incubadas nas mesmas condições (37 °C/ 5 % CO₂) por 3 h. Após esse período, os sobrenadantes foram retirados e foram distribuídos 3 mL de meio semissólido a 2 % (CMC) por poço para incubação nas mesmas condições descritas. Completados 6 dias de incubação, as monocamadas foram fixadas com solução de formaldeído 5 %, lavadas com água corrente para a retirada completa do CMC e coradas com cristal violeta 0,04 % para posterior contagem das placas de lise.

As réplicas do controle de vírus foram contadas para determinar a média aritmética do número de placas de lise e estabelecer valor do “endpoint” de 50 % do teste (média dividida por 2). O título de anticorpos neutralizantes é determinado como a maior diluição do soro que reduz em 50 % o número de placas de lise obtidas no controle viral. Os títulos foram calculados por regressão linear utilizando o programa Excel do pacote Microsoft Office 365 por interpolação das diluições correspondentes aos números de placas imediatamente acima e abaixo do valor de “endpoint” 50 % do teste. Para a melhor comparação, os títulos foram analisados em \log_{10} da recíproca da diluição ($\log_{10} 1/x$). O “cut off” foi determinado como a média aritmética dos títulos dos controles negativos de todos os ensaios (grupos mock e adjuvantes na ausência de antígeno) somada a 3 desvios padrão.

3.8.2 Dosagem de IgG total por ELISA

Para a realização deste teste, placas MaxSorp (Nunc) foram sensibilizadas com 125 ng por poço de vírus FA17DD purificado (1ª etapa de purificação vide item 3.5). Para isso, o vírus foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) na concentração final de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e foram distribuídos 50 μL por poço. As placas foram incubadas durante 16 horas a 4°C.

Após esse período, as placas foram submetidas a 4 ciclos de lavagem com a tampão de lavagem PBS-T (idem item 3.3.2) com o auxílio da lavadora (WellWash, Thermo), e adicionadas com 100 μL / poço da solução de bloqueio (PBS-T Leite desnatado 5 %, SFB 3 %, BSA 1 %).

Para a determinação dos títulos de IgG induzidos pelas diferentes formulações, foram dosados inicialmente os “pools” das coletas S4 (pré-desafio) e S5 (pós-desafio) dos grupos testados nos diferentes ensaios com animais realizados. Apenas os soros dos “pools” responsivos foram avaliados individualmente. Para isso, após a etapa de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente e subsequentes ciclos de lavagem com PBS-T, as amostras de soro foram diluídas a parte conforme faixa de diluição pré-determinada pela dosagem dos “pools” por grupo e aplicadas nas placas sensibilizadas para diluição seriada com fator 2 (4 diluições por amostra, em duplicata). Na quantificação das amostras, foi utilizado como curva padrão o anticorpo monoclonal anti febre amarela 2D12 (também produzido “in house” no LATAM, Bio-Manguinhos). As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C.

Após a incubação e ciclos de lavagem subsequentes, foi adicionado o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado a peroxidase (GE) diluído 1:1000 (100 µL/ poço). As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Após a etapa de incubação do conjugado e ciclos de lavagem, foi realizada a adição do substrato TMB Plus 2 (Ken Em Tech), seguida de incubação por 15 minutos a temperatura ambiente e abrigo da luz. A reação foi interrompida com adição de ácido sulfúrico 2 N e, as placas, lidas a 492 nm na leitora VERSAmax microplate reader (Molecular Devices). E os resultados foram obtidos com o programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

O ponto de corte para o ensaio foi calculado como a média das dosagens dos “pools” de soro dos grupos controle negativos (animais imunizados com diluente-grupo mock, e diferentes adjuvantes na ausência de antígeno, portanto não reagentes para o vírus) \pm 3 vezes o desvio padrão. Os títulos de anticorpos específicos foram determinados por interpolação usando a fórmula de 4-parâmetros da curva padrão no programa SoftMax Pro (Molecular Devices). Para garantir a acurácia da quantificação, a curva padrão foi usada na faixa de DO de 1,0 a 0,2. Os resultados foram expressos em \log_{10} µg/mL e analisados no programa Graph Pad Prism 5.02.

3.8.3 Dosagem dos subtipos de IgG

Para a análise das subclasses de IgG, um protocolo similar a dosagem de IgG total (item 3.5.4) foi seguido, com alteração do anticorpo secundário. Nesse caso, para detecção de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, os “pools” dos grupos foram adicionados em duplicata a cada metade da placa sensibilizada com vírus e, conforme o mapa de aplicação das amostras, cada uma dessas partes das placas recebeu os respectivos anticorpos secundários (anti IgG1, anti IgG2a, anti IgG2b ou anti IgG3) de camundongo conjugados com peroxidase na diluição 1:1000. Sendo assim, as amostras foram dosadas para cada uma das subclasses ao mesmo tempo. Foi determinado um “cut off” para cada um dos subtipos considerando a média aritmética das réplicas do grupo mock \pm 3 vezes o desvio padrão. Os “pools” dos diferentes grupos foram submetidos a diluição seriada com fator 2 e os respectivos títulos foram determinados como a recíproca da maior diluição acima do “cut off” estabelecido para cada subtipo. A razão dos títulos IgG2a/ IgG1, foi considerada na análise do balanço T_{H1}/ T_{H2} para cada formulação.

3.9 Caracterização da resposta imune celular induzida pelas formulações em camundongos

Para a avaliação de resposta imune celular, células T e B foram obtidas de diferentes tecidos para marcação das populações linfocitárias envolvidas na resposta imunológica desencadeada frente às formulações (baço, linfonodos e medula óssea) e ao desafio intracerebral (cérebro dos sobreviventes). As respostas celulares desencadeadas foram avaliadas pela detecção de células produtoras de citocinas (IFN- γ , IL-2 e IL-4) e células produtoras de IgG de curta e longa duração (plasmócitos ativados e células B de memória, respectivamente).

3.9.1 Quantificação da produção de citocinas por ELISpot

Para a avaliação de resposta imune celular, camundongos foram anestesiados e eutanasiados 42 dias após a primeira dose e os baços coletados assepticamente como descrito no protocolo CEUA nº 26/15-4 (Licença CEUA LW 25/16). Após a coleta, os órgãos foram macerados em filtros de nylon CellStrainer de 70 μ m (BD Pharmingen) e as hemácias foram lisadas com solução de lise comercial (BD Pharmingen). As amostras de células foram quantificadas e a viabilidade celular avaliada com a utilização do corante Azul de Trypan 0,2 % (Gibco), no contador automatizado Countess II Automated Cell Counter (Invitrogen). Após a contagem, os esplenócitos foram ressuspensos em meio RPMI (Invitrogen) completo (contendo 1 % HEPES 1 M, 2 mM L-Glutamina, 5 μ M β -mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio, 1 % de solução de aminoácidos não essenciais, 1 % (v/v) de vitamina e 10 % SFB, Invitrogen).

Foram utilizados kits comerciais para detecção de IFN- γ , IL-2 e IL-4, com placas pré-sensibilizadas (Mabtech), de acordo com a recomendação do fabricante. Antes da coleta dos órgãos, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS e, então, foram bloqueadas com 200 μ L/poço de RPMI + 10 % SFB a 37 °C por, no mínimo, 30 minutos. Os esplenócitos de cada camundongo foram recuperados como descrito acima e submetidos à cultura individualmente. Foram semeadas 2 X 10⁵ células/ poço em placas previamente preparadas na presença de: (i) 4 μ g/mL Peptídeo sintético EYF₃₄₅₋₃₅₉ (NKGILVTVNPIASTN-OH, sintetizado pela Aminotech), (ii) 10 μ g/mL de Concanavalina A e (iii) na ausência de qualquer estímulo, por 48 h a 37 °C em estufa com atmosfera de 5 % CO₂. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com

PBS e incubadas com os respectivos anticorpos biotinizados anti- IFN- γ , IL-2 e IL-4 por 2 horas a temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem, as placas foram incubadas com Estreptavidina conjugada a peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. A incubação foi seguida de lavagem e, a revelação foi realizada utilizando-se o substrato NBT/BCIP fornecido no kit. Após lavagem em água corrente, as placas foram fotodocumentadas e os clones produtores de IFN- γ , IL-2 e IL-4, contabilizados com o auxílio do equipamento Immunospot (AMBRIEX, Cellular Technology). Tanto os ensaios quanto a análise dos resultados foram realizadas com a colaboração do LATIM, Bio-Manguinhos.

Quanto à obtenção das células dos outros tecidos coletados no Ensaio IV, as amostras de linfonodo também foram processadas conforme o protocolo descrito acima. As células da medula óssea foram obtidas por perfusão dos ossos fêmur com meio RPMI. O tecido cerebral dos animais sobreviventes, por sua vez, foi lavado e macerado nas mesmas condições descritas anteriormente e as células recuperadas em gradiente de Percoll (Percoll Plus, GE) conforme descrito por Pino & Cardona (2011). Por não se tratar de um órgão linfóide neste caso e, portanto, apresentar menor concentração de linfócitos recuperados, as amostras do tecido cerebral foram tratadas em “pool” por grupo. Uma vez fracionadas as células, as placas de ELISpot foram preparadas e reveladas nas mesmas condições já descritas acima.

As células fracionadas dos diferentes tecidos foram processadas imediatamente após sua obtenção (à fresco) ou criopreservadas em solução congelante comercial contendo SFB e DMSO (CryoStor, Sigma) a -196 °C. As células armazenadas nestas condições e submetidas a protocolo de descongelamento rápido (diluição em meio completo a 37 °C), apresentaram viabilidade $\geq 70\%$, permitindo seu cultivo e proliferação frente a estímulo *in vitro* (Kreher *et al*, 2003).

3.9.2 Dosagem de Células B secretoras de anticorpos por ELISpot

Ensaios de ELISpot usando o “kit Mouse IgG ELISpot (Mabtech)” foram realizados para detectar células B produtoras de anticorpos de curta (resposta local melhor representada pelos linfonodos e baço) e de longa duração (medula óssea). Nessa técnica, os anticorpos secretados se ligam ao antígeno (imobilizado na placa) na vizinhança imediata de células produtoras do anticorpo específico. Os “spots” de anticorpos ligados são detectados através da utilização de anticorpo anti IgG de camundongo biotinizado seguido de marcação com Estreptavidina - fosfatase alcalina

e desenvolvimento de cor por adição de substrato cromogênico (BCIP/NBT). Para realização deste ensaio, as placas foram sensibilizadas com vírus FA17DD purificado (idem usado nos ensaios de ELISA). As etapas de revelação seguem as mesmas descritas no item 3.8.2.

Conforme as orientações do fabricante, a detecção de células produtoras de anticorpos de curta duração (plasmócitos ativados) pode ser realizada diretamente a partir da obtenção das células. Já a detecção de células produtoras de anticorpos de longa duração (memória) requer uma estimulação policlonal para obter secreção de níveis detectáveis de anticorpos. Neste caso, foi realizada uma etapa de pré-estímulo *in vitro* por 48 h a 37 °C/ 5 % CO₂ com 10 ng/mL de IL-2 recombinante e 1 µg/mL de R848 (ambos já inclusos no kit).

3.10 Análise estatística dos resultados

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism v. 5.03. A avaliação da normalidade foi feita previamente em todos os grupos usando o teste de D'Agostino & Pearson. Os grupos com distribuição normal foram comparados pelo teste One-Way Anova e Tukey. Os grupos não-normais foram analisados por Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significantes quando valores de p foram menores ou iguais a 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. Resultados

4.1 Obtenção das proteínas E e NS1 de febre amarela no sistema *E. coli* cepa BL21 (E YF BL21)

4.1.1 Expressão e purificação das proteínas E YF e NS1 YF

Os genes que codificam para as proteínas E e NS1 foram clonados nos vetores pET28a e pET100, respectivamente; e as proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* BL21 DE3 Star. A expressão da proteína E foi detectada por SDS-PAGE com uma banda única com tamanho aproximado de 50 kDa. A proteína NS1, por sua vez, apresentou duas bandas com tamanhos aproximados de 50 e 25 kDa respectivamente. Esta segunda banda de menor tamanho também é detectada por “Western Blotting” revelado com o anticorpo anti His.

Ambas as proteínas foram obtidas na forma de corpúsculos de inclusão e solubilizadas na presença de ureia.

Uma vez estabelecidas as melhores condições de cultivo (meio de cultura TB), indução (0,5 M de IPTG) e temperatura de expressão (28 °C), os parâmetros determinados no microbiorreator (70 mL) foram transferidos para etapa de escalonamento em biorreator de 2,5 L para produção de lotes das respectivas proteínas para obtenção de uma maior massa dos antígenos para purificação por IMAC. Ao final das 4 h de indução, foi obtida uma biomassa em torno de 45 g e esta foi armazenada a -20 °C até sua purificação.

As biomassas de 4 g de células foram submetidas a protocolo de lise e solubilização do corpúsculo de inclusão na presença de ureia. Uma vez solúveis, as proteínas recombinantes foram purificadas por IMAC e eluídas em gradiente linear de imidazol. Para a proteína E YF BL21, foi obtido um rendimento de 4 mg/g de biomassa e nível de pureza ≥ 90 %. Para a proteína NS1, obteve-se rendimento máximo de 0,6 mg/g de biomassa, contudo devido ao problema de degradação não conseguimos determinar o grau de pureza da mesma. A Figura 4.1 a seguir apresenta os cromatogramas das purificações e SDS-PAGE das frações eluídas das proteínas E e NS1 purificadas segundo a metodologia estabelecida.

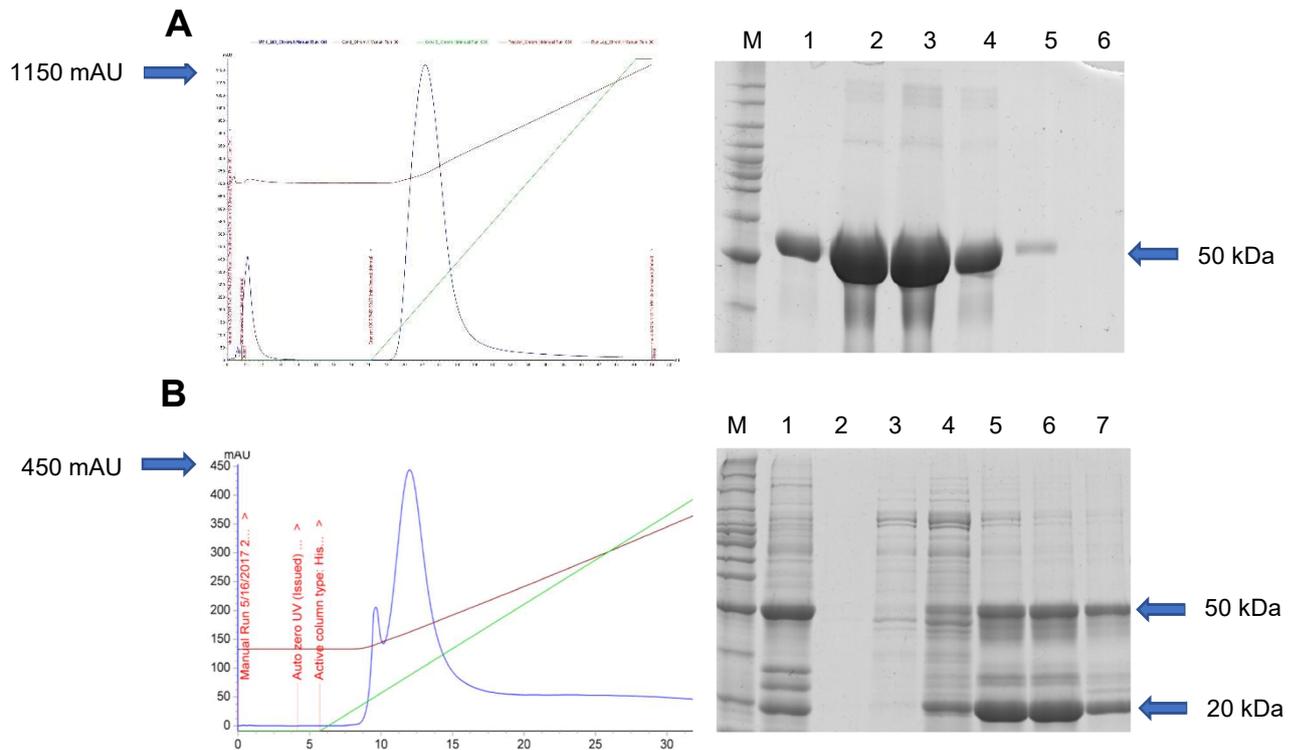


Figura 4.1: Cromatogramas e SDS-PAGE das frações obtidas na Purificações por IMAC e eluição em gradiente linear das proteínas E YF (A) e NS1 YF (B) produzidas em *E. coli* BL21. M: Marcador de peso molecular Benchmark. Em (A), quadrante superior direito: SDS-Page das frações coletadas durante o pico de eluição da proteína E YF (colunas 1-5). Em (B), quadrante inferior esquerdo: SDS-Page das frações de eluição da proteína NS1 YF. Lane 1: Amostra aplicada após purificação por lise de corpúsculo de inclusão. Colunas 2 e 3: Lavagem com tampão de ligação. Lane 4: Fração de eluição do 1º pico (menor). Colunas 5 a 7: Frações de eluição do 2º pico (maior).

As frações eluídas na cromatografia contendo a proteína de interesse foram submetidas a etapa de “refolding” por diálise até completa retirada do agente caotrópico e reenovelamento das mesmas. A troca completa do tampão foi acompanhada pela dosagem da condutividade das amostras em condutivímetro e ao final as proteínas foram quantificadas por BCA. As concentrações de proteína E YF BL21 e NS1 YF foram de 0,5 mg/ mL e 0,3 mg/ mL, respectivamente.

4.1.2 Produção de soro policlonal anti E YF e anti NS1 YF para etapas de caracterização

Os soros policlonais contra as proteínas E e NS1 YF foram produzidos a partir da imunização de camundongos BALB/c com as respectivas proteínas recombinantes. Após a conclusão do protocolo de imunização, os soros obtidos foram utilizados para confeccionar pools anti E e anti NS1. Estes pools foram titulados por “Western Blotting”

contra as respectivas proteínas na concentração de 20 µg/mL com o objetivo determinar as diluições de uso para os ensaios de caracterização. Foram obtidos os títulos de 1:8000 para proteína E e 1: 1000 para NS1 (Figura 4.2).

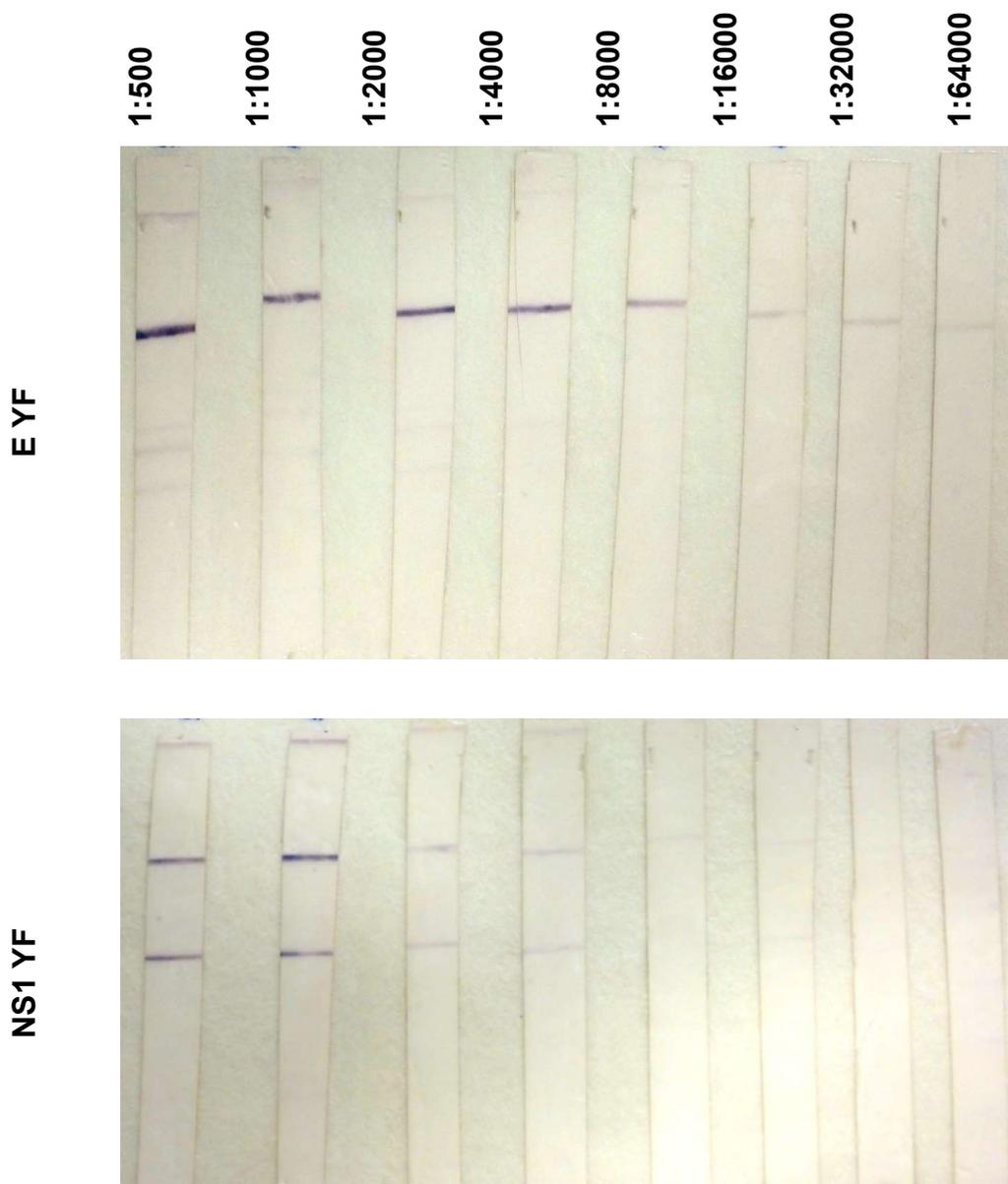


Figura 4.2: Titulação dos soros policlonais anti E YF e anti NS1 YF produzidos “in house” por “Western Blotting”.

4.2 Obtenção da proteína E de febre amarela no sistema *E. coli* cepa “Shuffle” (E YF “Shuffle”)

Como tentativa de melhoria da qualidade do antígeno expresso em *E. coli*, a construção pET28a/ EYF foi expressa na cepa “Shuffle”, descrita como alternativa para expressão de proteínas heterólogas com pontes dissulfeto (Lobstein *et al*, 2012). Um novo lote de proteína E YF foi produzido nesta célula de expressão, seguindo os protocolos de purificação e “refolding” já previamente estabelecidos. A expressão foi realizada com sucesso, contudo, na análise do perfil de migração em gel de SDS-PAGE, ambas as proteínas apresentavam tamanhos similares no gel de poliacrilamida nas amostras reduzidas (com adição de betamercaptoetanol) e não reduzidas. Também não foi possível observar diferenças de reatividade entre as proteínas E expressas nas duas cepas (BL21 e “Shuffle”) nas análises de antigenicidade por “Western Blotting” com os anticorpos monoclonal 2D12 (anti febre amarela) e policlonal contra o vírus (soro de macaco imunizado com vírus vacinal FA17DD) (Figura 4.3).

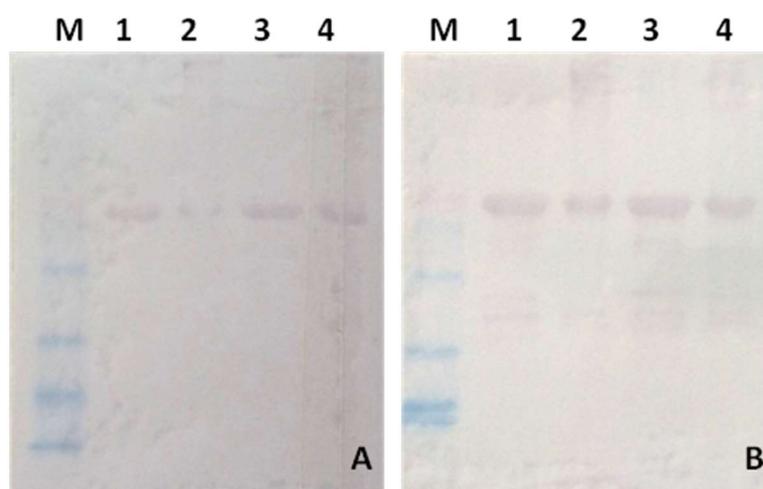


Figura 4.3: Detecção das proteínas EYF recombinantes expressas em duas cepas de *E. coli* (BL21 e “Shuffle”) por “Western Blotting” com anticorpos específicos para febre amarela. (A) Revelação com monoclonal anti febre amarela 2D12. (B) Revelação com soro policlonal de macaco imunizado com FA 17DD. M: Marcador de peso molecular “Dual Color”; 1 e 2: E YF (BL21) reduzido e não reduzido, respectivamente; 3 e 4: E YF (“Shuffle”) reduzido e não reduzida, respectivamente.

4.3 Obtenção da proteína E de febre amarela no sistema baculovírus/ células de inseto (E YF Sf9)

As construções em baculovírus para expressão das proteínas recombinantes E (ectodomínio) e NS1 em células de inseto Sf9 foram realizadas usando o sistema Bac-to-Bac. Os respectivos baculovírus recombinantes obtidos foram expandidos e usados para infectar monocamadas de células da linhagem Sf9 para expressar as respectivas proteínas recombinantes. A cinética da expressão das proteínas recombinantes no extrato celular das culturas infectadas foi realizada por “western blotting” com os respectivos soros policlonais anti E e anti NS1 produzidos “in house” (Figura 4.4).

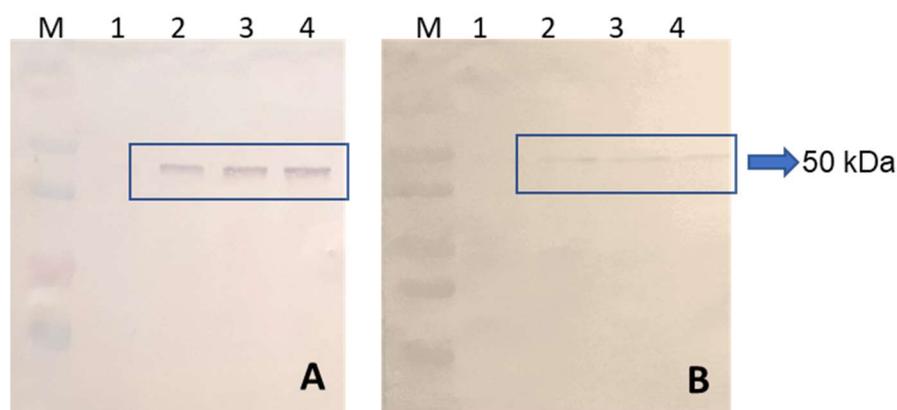


Figura 4.4: Cinética de Expressão das proteínas recombinantes em células Sf9 cultivadas em suspensão. (A): E ecto YF, (B): NS1 YF. M: Marcador Dual Color; 1, 2, 3 e 4: Extratos celulares 24 h, 48 h, 72 h e 96 h pós infecção, respectivamente.

4.3.1 Expressão e distribuição intracelular por imunofluorescência

Para estudar a localização intracelular das proteínas recombinantes E ecto e NS1, foram realizadas infecções com os respectivos baculovírus recombinantes em lâminas Lab-Tek (Nunc) contendo monocamadas de células da linhagem Sf9 para análise por imunofluorescência. Ambas as proteínas recombinantes foram expressas no sistema de baculovírus. Não foi observada a expressão das proteínas no sobrenadante após a infecção celular. A expressão foi detectada em grânulos intracelulares ou junto a membrana plasmática (Figura 4.5).

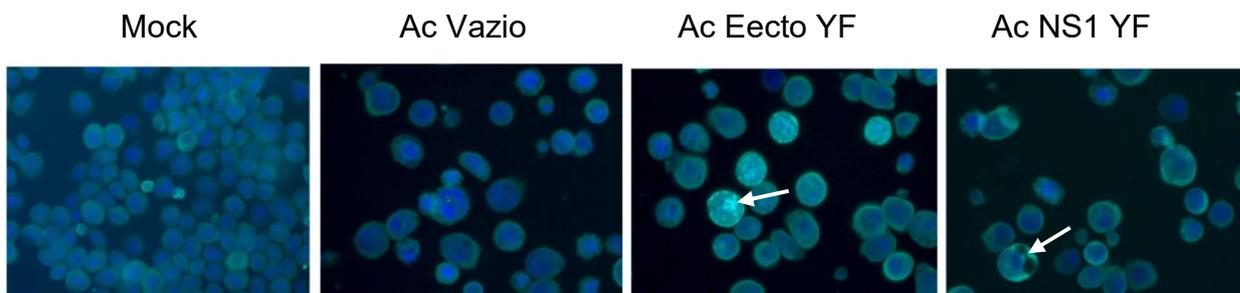


Figura 4.5: Detecção da expressão das proteínas recombinantes E ecto YF e NS1 YF em células Sf9 infectadas pelos respectivos baculovírus (setas brancas) 72 h pós infecção. Mock: Controle de células Sf9 não infectadas. Ac Vazio: Controle negativo infectado com o baculovírus não recombinante.

4.3.2 Avaliação da presença de glicosilação

A presença de glicosilação na proteína Ecto YF foi avaliada preliminarmente por marcação com o kit Pro Q Emerald. Apenas o vírus FA17DD foi detectado pela marcação de glicosilação por fluorescência. Todas as demais proteínas E recombinantes avaliadas (E YF expressa em *E. coli* BL21, Ecto YF expressa em Sf9 e E-1T expressa em *N. benthamiana*) não foram marcadas (Figura 4.6). Entretanto, como as massas dos diferentes antígenos não estão adequadamente balanceadas, um novo ensaio seria necessário para conclusões.

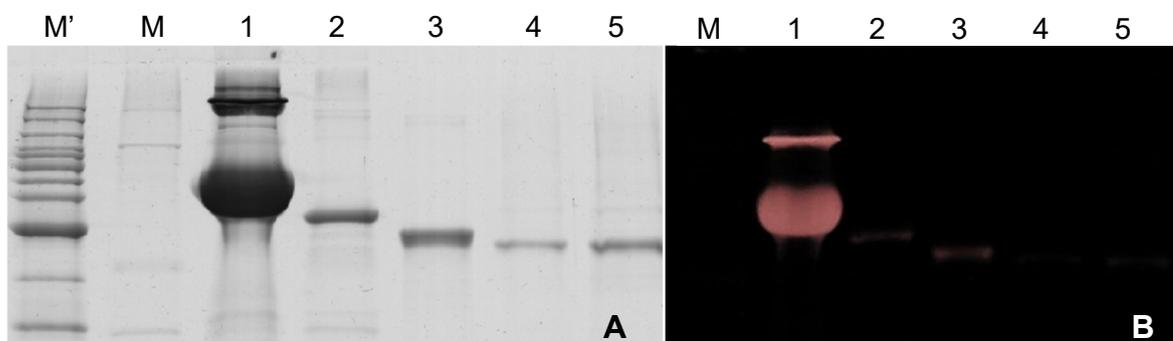


Figura 4.6: Marcação de Glicosilação com o “kit Pro Q Emerald”. (A): SDS-Page corado por “Coomassie Blue”. (B) SDS-PAGE corado com o “kit Pro Q Emerald”. M'- Marcador de peso molecular Benchmark, M- Marcador de peso molecular fluorescente “Candy Cane”, 1- Vírus FA 17DD, 2- Proteína E YF BL21, 3- E YF 1T, 4- E ecto YF Sf9, 5- E ecto YF SF9 [2x].

4.3.3 Construção de proteína Ecto YF contendo sequência sinal para excreção celular

Com objetivo de obter a secreção da proteína E com as devidas modificações pós-traducionais, uma nova construção da proteína E ecto contendo a sequência sinal da proteína GP64 de baculovírus (proteína E ecto YF SS) foi desenhada. A partir da

clonagem e obtenção do respectivo baculovírus recombinante contendo a nova sequência, monocamadas de células Sf9 foram infectadas nas mesmas condições. Foi confirmada a expressão da proteína E ecto YF SS por “Western Blotting” somente no extrato celular da cultura infectada.

4.3.4 Otimização das condições de infecção em Sf9 para expressão das proteínas recombinantes

Os estoques de baculovírus recombinantes foram titulados em ensaio de titulação em placa, apresentando em média de títulos em torno de 10^8 PFU/mL. A partir dos títulos determinados, novos ensaios de infecção em placa foram realizados com diferentes MOI (multiplicidades de infecção) visando otimizar os níveis de expressão das respectivas proteínas recombinantes.

As células foram cultivadas em suspensão em frascos do tipo “spinner” e infectadas com o MOI determinado acima, visando otimizar os níveis de expressão das proteínas E ecto YF e NS1 YF. Para avaliação da cinética de infecção com os baculovírus recombinantes, amostras foram coletadas diariamente, para determinar o pico de produção das respectivas proteínas, e avaliadas por “Western Blotting” usando os soros policlonais anti EYF e anti NS1.

Para produção da proteína E ecto YF, a melhor condição de infecção foi obtida com MOI de 5 e coleta no tempo de 96h pós infecção. Enquanto a proteína NS1 YF, por sua vez, obteve melhor pico de produção após infecção com MOI 5 e coleta no tempo 72 h pós infecção. Tendo em vista os baixos níveis de expressão apresentados pela proteína NS1 (Figura 4.4 B) e seu papel secundário nas respostas protetoras para o vírus da febre amarela, foi priorizada a padronização de protocolo de purificação para a proteína E ecto YF.

4.3.5 Purificação da proteína recombinante E ecto YF (Sf9)

Como não foi observada a secreção da proteína no sobrenadante mesmo com a sequência sinal de GP64, optamos por dar continuidade a estratégia de purificação com a construção E ecto YF sem sequência sinal, por já dispor de estoques virais titulados e cinética de infecção estabelecida. A proteína E ecto YF foi expressa predominantemente na forma insolúvel sendo, portanto, necessária sua solubilização a partir do extrato celular. Diferentes detergentes, sais e aditivos foram avaliados com

o objetivo de solubilizar esta proteína. Contudo, a mesma somente foi solubilizada na presença de ureia.

Uma vez solúvel, a proteína recombinante foi purificada por IMAC no Akta Purifier (Figura 4.7) e submetida a uma etapa de “refolding” por diálise por diluição, até completa retirada do agente caotrópico e reenovelamento.

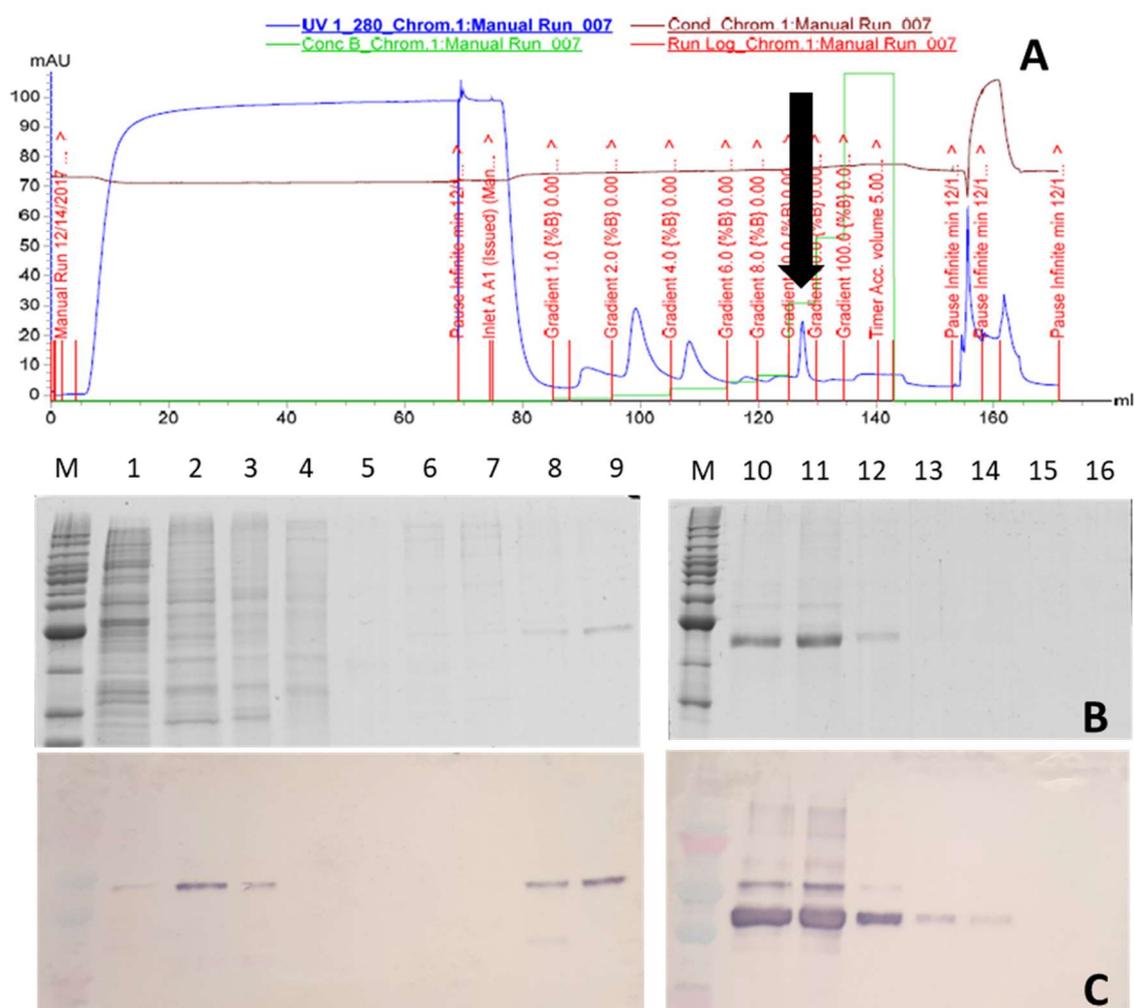


Figura 4.7: Purificação por IMAC em “steps” da proteína E ecto YF no Akta Purifier. A: Cromatograma da purificação. A seta preta evidencia o pico de eluição da proteína. B: SDS PAGE das frações da purificação. A proteína E ecto YF eluiu majoritariamente na lavagem com 300 mM de Imidazol (raias 10-12). M: Benchmark; 1: Fração solúvel (FS) lavagem com DNase; 2 e 3: FS e fração insolúvel (FI) lisado Sf9 infectado com Ac E ecto YF, respectivamente; 4: Void; 5-9: Lavagens em “steps” com Imidazol nas concentrações 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM e 80 mM, respectivamente. 10-12: Eluição da proteína E ecto YF com 300 mM de Imidazol; 13 e 14: Lavagens com 500 mM e 1 M de Imidazol. 15: Reequilíbrio da coluna com tampão A. 16: Lavagem com NaOH 0,2 M. C: “Western Blotting” revelado com anticorpo policlonal anti E.

Devido ao baixo rendimento obtido nesse sistema de expressão e, conseqüentemente, quantidade limitante desta proteína disponível, optamos por

avaliar sua imunogenicidade e proteção em formulação com o adjuvante Al(OH)₃ para uma análise preliminar desse antígeno de febre amarela obtido nesse sistema.

4.4 Ensaios em modelo animal

4.4.1 Ensaio I: escolha do antígeno modelo e determinação de sua dose

4.4.1.1 Determinação da sobrevivência ao desafio IC

Os camundongos C57BL/6 imunizados com as diferentes formulações experimentais de antígenos de FA com hidróxido de alumínio descritas no material e métodos. Os animais foram submetidos a desafio letal com 30 µL do vírus FA17DD inoculado por via intracerebral contendo 100 DL₅₀ (dose previamente determinada em experimento de DL₅₀). Após o desafio, os animais foram acompanhados por 21 dias para determinar os percentuais de sobrevivência. As respectivas curvas de sobrevivência seguem descritas na figura 4.8.

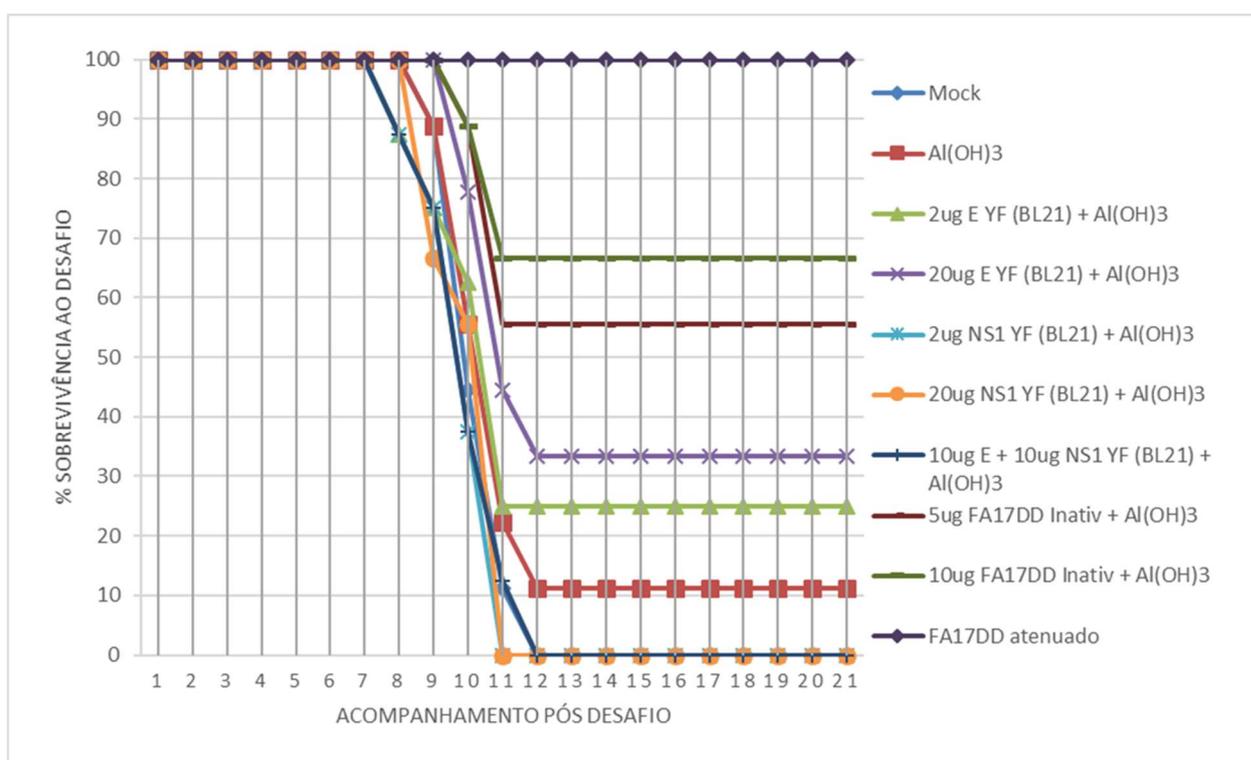


Figura 4.8: Percentual de sobrevivência ao desafio IC dos camundongos do Ensaio I.

Os grupos controle negativo (Mock) e positivo (vírus FA17DD atenuado) apresentaram 0 e 100% de sobrevivência, validando o ensaio de desafio letal. Dentre

as formulações experimentais (todas avaliadas em esquema de 3 doses), aquela contendo 10 µg de vírus FA17DD inativado com hidróxido de alumínio apresentou o melhor desempenho com 67% de sobrevivência, seguida da formulação equivalente contendo 5 µg de vírus inativado (57% de sobrevivência). As formulações de 2 µg e 20 µg da proteína E YF BL21 com hidróxido de alumínio induziram, respectivamente, 25 % e 33 % de sobrevivência. Já as formulações de proteína NS1 YF BL21 (2 µg e 20 µg), bem como combinação de E e NS1 YF (10 µg de cada) não foram capazes de induzir nenhum percentual de sobrevivência.

4.4.1.2 Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT₅₀)

Os títulos de anticorpos neutralizantes induzido pelas diferentes formulações testadas foram determinados por PRNT₅₀. As dosagens nas coletas pré-desafio (tempo no qual o protocolo de imunização foi completado) e pós-desafio (animais sobreviventes) seguem descritas na figura 4.9 a seguir:

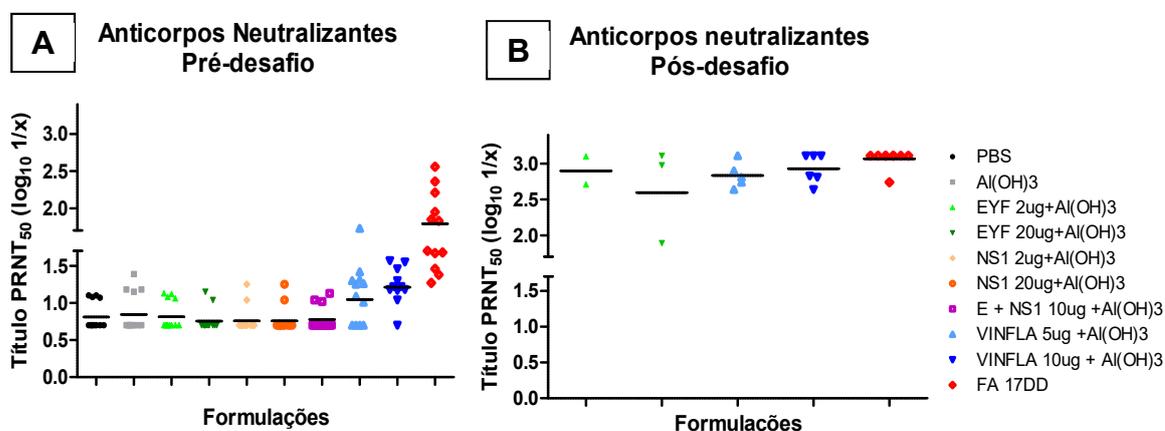


Figura 4.9: Ensaio I: Títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT₅₀ nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B). “Cut off” PRNT₅₀ = 1,43. (A): Dados não normais; p<0,0001 (Kruskal-Wallis). (B): Dados não normais; p=0,1222 (Kruskal-Wallis).

No tempo pré-desafio, apenas o grupo imunizado com a vacina atenuada FA17DD foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes (título médio geométrico, TMG= 1,79 log₁₀). As formulações experimentais de proteínas recombinantes E e NS1 YF apresentaram títulos basais, similares aos controles negativos do teste (PBS e Al(OH)₃). As formulações de vírus inativado, por sua vez, apresentaram apenas títulos discretos (TMG=1,05 log₁₀ e 1,21 log₁₀ para as

formulações contendo 5 µg e 10 µg, respectivamente); pouco acima dos controles negativos e ainda abaixo do ponto de corte do teste ($< 1,43 \log_{10}$).

Os resultados demonstram que todas as amostras dos animais sobreviventes ao desafio (coleta pós-desafio) apresentaram incremento no título de anticorpos neutralizantes, ultrapassando o ponto de corte do ensaio (TMG detalhados no quadro 4.1).

4.4.1.3 Dosagem de IgG total por ELISA

As amostras pré e pós desafio também foram avaliadas por ELISA contra o vírus FA17DD. As amostras foram avaliadas inicialmente em “pool” por grupo e, apenas os animais dos grupos com título acima do ponto de corte (“cut off” ELISA = $0,56 \log_{10} \mu\text{g/mL}$), foram dosados individualmente para avaliação estatística. Os resultados obtidos seguem ilustrados na figura 4.10 a seguir.

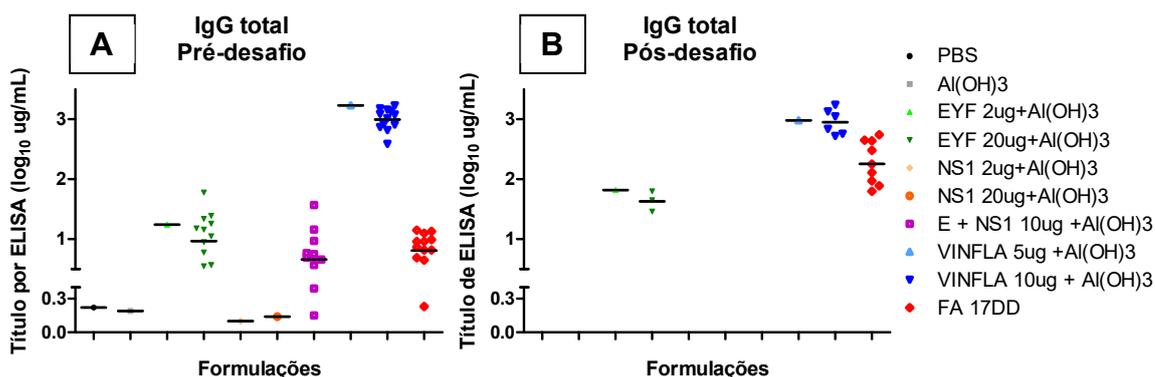


Figura 4.10: Ensaio I: Títulos de IgG total por ELISA nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).* “Cut off” ELISA IgG= 0,56. (A): Dados não normais; $p < 0,0001$, Kruskal-Wallis. (B): Dados não normais; $p = 0,0037$, Kruskal-Wallis.

Na dosagem de IgG total por ELISA contra o vírus no tempo de coleta pré-desafio (gráfico 4.3 A), tanto as formulações baseadas na proteína E YF expressa em *E. coli*, quanto no vírus inativado foram capazes de induzir títulos de IgG total acima do “cut off” estabelecido. As formulações baseadas na proteína NS1, entretanto, se mantiveram abaixo do ponto de corte. Foi observado que a combinação de proteínas E e NS1 gerou uma resposta intermediária, porém menor do que as formulações de proteína E sozinha. O grupo controle positivo imunizado com a vacina atenuada FA17DD, por sua vez, apresentou títulos de IgG positivos, porém menores que as formulações experimentais. Os TMG dos diferentes grupos seguem descritos no quadro 4.1.

Assim como demonstrado pelos resultados de PRNT₅₀, os animais sobreviventes ao desafio apresentaram incremento nos títulos de IgG total contra febre amarela (figura 4.10 B; quadro 4.1), demonstrando o desenvolvimento de resposta anamnésica ao serem desafiados com o vírus.

Quadro 4.1: Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio I.

Ensaio I						
Títulos Médios Geométricos (nº positivos/total do grupo)*						
Grupo	Formulação	Anticorpos Neutralizantes (log ₁₀ 1/x)		IgG total (log µg/mL)		Sobrevivência % (vivos/grupo)
		pré desafio	pós desafio	pré desafio	pós desafio	
1	Mock	0,81 (0/12)	x	0,22	x	0 (0/9)
2	Al(OH) ₃	0,84 (0/12)	x	0,19	x	11% (1/9)
3	2µg E YF (BL21) + Al(OH) ₃	0,81 (0/12)	2,90 (2/2)	1,24	1,82	25% (2/8)**
4	20µg E YF (BL21) + Al(OH) ₃	0,75 (0/12)	2,60 (3/3)	0,97 (10/12)	1,63 (3/3)	33% (3/9)
5	2µg NS1 YF (BL21) + Al(OH) ₃	0,76 (0/12)	x	0,00	x	0 (0/8)**
6	20µg NS1 YF (BL21) + Al(OH) ₃	0,77 (0/12)	x	0,14	x	0 (0/9)
7	10µg E YF + 10µg NS1 YF (BL21) + Al(OH) ₃	0,78 (0/12)	x	0,66	x	0 (0/8)**
8	5µg Vírus FA17DD inativado + Al(OH) ₃	1,05 (1/12)	2,83 (5/5)	3,23	2,98	56% (5/9)
9	10µg Vírus FA17DD inativado + Al(OH) ₃	1,21 (3/12)	2,93 (6/6)	2,99 (12/12)	2,95 (6/6)	67% (6/9)
10	Vacina FA17DD atenuada	1,79 (10/12)	3,06 (9/9)	0,81 (11/12)	2,26 (9/9)	100% (9/9)

*Considerando "Cut off" PRNT₅₀= 1,43 e "Cut off" ELISA IgG= 0,56.

**Morte de animal por causa não relacionada ao vírus (24h pós desafio).

4.4.2 Ensaio II: imunogenicidade e proteção induzida por formulações de vírus inativado com diferentes adjuvantes

4.4.2.1 Determinação da sobrevivência ao desafio IC

Ao longo do segundo ensaio foram avaliadas diferentes formulações baseadas em vírus inativado FA17DD. Uma vez concluídos os protocolos de imunização, os animais foram submetidos ao desafio letal por via intracerebral e acompanhados por 21 dias para determinar os percentuais de sobrevivência. As respectivas curvas de sobrevivência seguem ilustradas na figura 4.11.

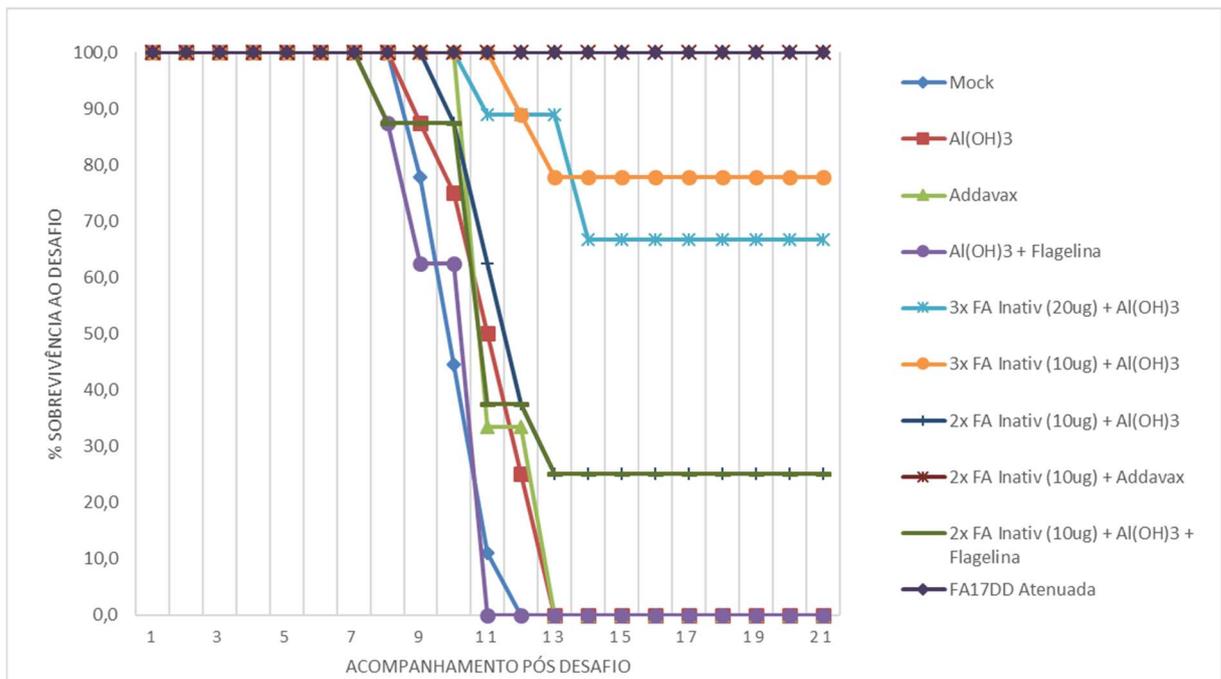


Figura 4.11: Percentual de sobrevivência ao desafio IC dos camundongos do Ensaio II.

O grupos controle negativo (Mock e controles negativos dos adjuvantes na ausência de antígeno) e o controle positivo (vírus FA17DD atenuado) validaram o ensaio com as taxas de 0 e 100 % de sobrevivência, respectivamente. Além da vacina atenuada, a formulação de vírus FA17DD inativado com o adjuvante Addavax aplicada em esquema de 2 doses também foi capaz de induzir 100 % de sobrevivência. Em seguida o segundo melhor desempenho foi obtido com a formulação de vírus FA17DD Inativado (10 µg) em hidróxido de alumínio, com 78 % de sobrevivência após imunização em esquema de 3 doses. Em contrapartida, esta mesma formulação aplicada em esquema de 2 doses apresentou uma baixa eficiência em induzir proteção, com uma taxa de sobrevivência de apenas 25 % contra os 100 % induzidos por formulação similar com Addavax. Já a formulação contendo 20 µg de vírus inativado aplicado em esquema de 3 doses apresentou resultado semelhante (67 % de sobrevivência) a formulação de 10 µg, não gerando incremento de proteção com a maior massa antigênica. A formulação de Al(OH)₃ com flagelina FliC foi capaz de induzir apenas 25 % de proteção quando aplicada em esquema de 2 doses. Os respectivos percentuais de proteção estão descritos na tabela 4.2.

4.4.2.2 Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT₅₀)

Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pelas diferentes formulações foram avaliados por PRNT₅₀. A análise das coletas pré e pós-desafio seguem descritas na figura 4.12 abaixo.

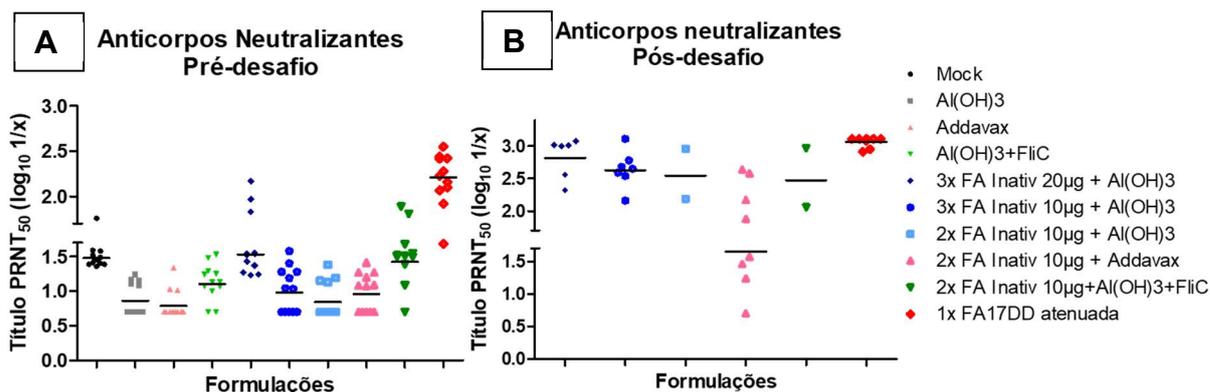


Figura 4.12: Ensaio II: Títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT₅₀ nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B). Esquema de doses para as respectivas formulações indicado na legenda. “Cut off” PRNT₅₀ 1,43. (A): Dados não normais; $p < 0,0001$, Kruskal-Wallis. (B): Dados não normais; $p = 0,0008$, Kruskal-Wallis.

Os resultados das dosagens pré-desafio do segundo ensaio também revelaram a indução de altos títulos de anticorpos neutralizantes apenas no grupo imunizado com a vacina atenuada FA17DD (TMG 2,21 \log_{10}). As formulações experimentais de vírus inativado com os adjuvantes testados ($\text{Al}(\text{OH})_3$, Addavax e $\text{Al}(\text{OH})_3$ / flagelina FliC) apresentaram títulos basais, similares aos controles negativos do teste (grupo Mock e controles negativos dos respectivos adjuvantes na ausência de antígeno). Os camundongos do grupo Mock apresentaram títulos mais altos que o usual, possivelmente pela hemólise das amostras durante a coleta.

No tempo pós desafio, conforme relatado no primeiro ensaio, todas as amostras dos animais sobreviventes ao desafio apresentaram incremento no título de anticorpos neutralizantes, ultrapassando o ponto de corte do ensaio (TMGs detalhados no quadro 4.2).

4.4.2.3 Dosagem de IgG total por ELISA

As amostras pré e pós-desafio dos animais imunizados no segundo ensaio também foram submetidas a dosagem de IgG total por ELISA contra o vírus. Os dados seguem ilustrados na figura 4.13 a seguir.

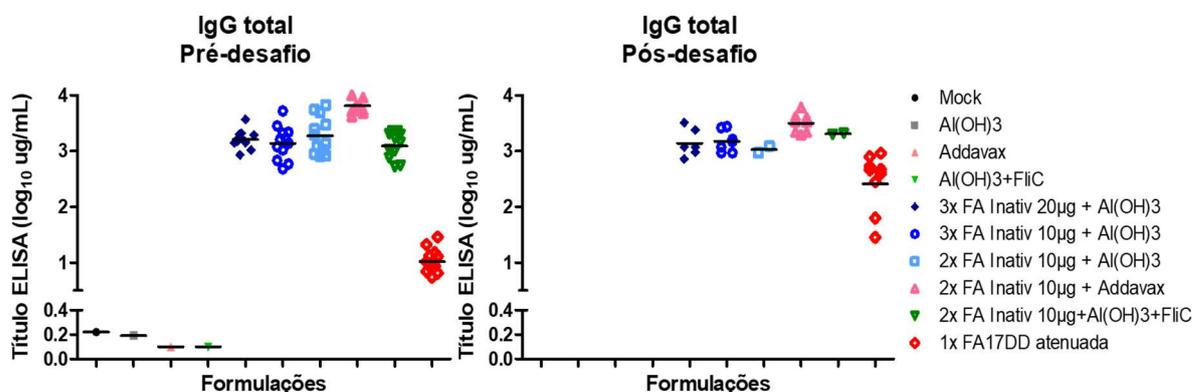


Figura 4.13: Ensaio II: Títulos de IgG total por ELISA nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B). Esquema de doses para as respectivas formulações indicado na legenda. “Cut off” ELISA IgG total 0,56. (A): Dados normais; $p < 0,0001$, One-way anova. (B): Dados não normais; $p = 0,0002$, Kruskal-Wallis.

Todas as formulações experimentais baseadas no vírus inativado foram capazes de induzir altos títulos de IgG contra o vírus no tempo pré-desafio. A vacina atenuada FA17DD, usada como controle positivo do ensaio, também foi capaz de induzir títulos de IgG total após a imunização, porém em limiar menor do que as formulações experimentais de vírus inativado. Pelo pós-teste de Tukey, não houve diferenças significativas entre os seguintes grupos: 3x FA17DD Inativado 20 µg/ Al(OH)₃ e 3x FA17DD Inativado 10 µg/ Al(OH)₃; 3x FA17DD Inativado 10 µg/ Al(OH)₃ e 2x FA17DD Inativado/Al(OH)₃ 10 µg; e 2x ou 3x FA17DD Inativado 10 µg/ Al(OH)₃ e 2x FA17DD Inativado 10 µg /Al(OH)₃ + flagelina FliC. As demais diferenças foram consideradas significativas.

Os animais sobreviventes ao desafio mantiveram altos títulos de IgG total após o contato com o vírus. Um incremento de resposta após o desafio (efeito “booster”), nesse caso, pode ser melhor visualizado no grupo que tomou a vacina atenuada (aumento de 2,4x) devido a maior variação de títulos entre os tempos pré e pós.

Os dados de imunogenicidade e proteção por grupo seguem resumidos no quadro 4.2 a seguir.

Quadro 4.2: Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio II.

Ensaio II		Títulos Médios Geométricos (nº positivos/total do grupo)*				
Grupo	Formulação	Anticorpos Neutralizantes (log ₁₀ 1/x)		IgG total (log µg/mL)		Sobrevivência % (vivos/grupo)
		pré desafio	pós desafio	pré desafio	pós desafio	
1	Mock	1,48 (7/12)	x	0,22	x	0 (0/9)
2	Al(OH) ₃	0,86 (0/12)	x	0,19	x	0 (0/8)*
3	Addavax	0,79 (0/12)	x	0,00	x	0 (0/9)
4	Al(OH) ₃ + Flagelina	1,10 (2/12)	x	0,00	x	0 (0/8)**
5	3x Vírus 17DD inativado 20µg+ Al(OH) ₃	1,53 (8/12)	2,82 (6/6)	3,21 (12/12)	3,14 (6/6)	67 (6/9)
6	3x Vírus 17DD inativado 10µg+ Al(OH) ₃	0,98 (1/12)	2,63 (7/7)	3,14 (12/12)	3,18 (7/7)	78 (7/9)
7	2x Vírus 17DD inativado 10µg+ Al(OH) ₃	0,84 (0/12)	2,55 (2/2)	3,27 (12/12)	3,03 (2/2)	25 (2/8)**
8	2x Vírus 17DD inativado 10µg+ Addavax	0,96 (0/12)	1,65 (6/8)	3,81 (12/12)	3,50 (8/8)	100 (8/8)**
9	Vírus 17DD inativado 10µg + Al(OH) ₃ + Flagelina	1,42 (8/11)	2,47 (2/2)	3,09 (11/11)	3,31 (2/2)	25 (2/8)**
10	Vacina 17DD atenuada	2,21 (12/12)	3,06 (9/9)	1,02 (12/12)	2,41 (9/9)	100 (9/9)

*Considerando Cut off PRNT₅₀= 1,43 e Cut off ELISA IgG= 0,56.

**Morte de animal por causa não relacionada ao vírus (imediatamente após o desafio).

4.4.3 Ensaio III: imunogenicidade e proteção induzida por formulações de antígenos de subunidade com diferentes adjuvantes

4.4.3.1 Determinação da Sobrevivência ao Desafio IC

No terceiro ensaio, camundongos C57BL/6 foram imunizados com as diferentes formulações de proteínas E recombinante (expressas em *N. benthamiana*, *E. coli* ou baculovírus/células Sf9) com diferentes adjuvantes, e submetidos ao desafio letal. A figura 4.14 a seguir ilustra os resultados do desafio com os respectivos percentuais de sobrevivência.

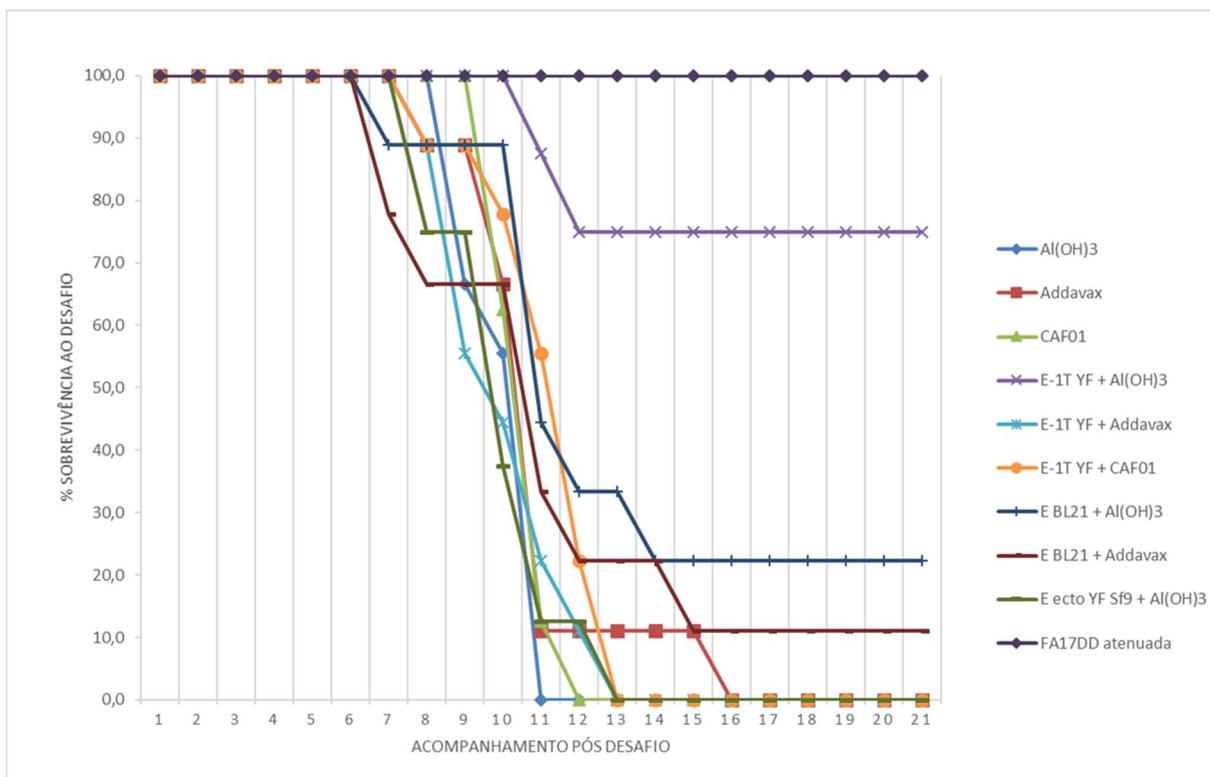


Figura 4.14: Percentual de sobrevivência ao desafio IC dos camundongos do Ensaio III.

Como nos ensaios anteriores, os grupos controle negativo (adjuvantes na ausência de antígeno) e o controle positivo (vírus FA17DD atenuado) mais uma vez validaram o ensaio com as taxas de 0 e 100 % de sobrevivência, respectivamente, demonstrando a reprodutibilidade do modelo de desafio.

Quanto as formulações de proteína E-1T produzida em plataforma vegetal, a formulação com hidróxido de alumínio em esquema de 2 doses foi capaz de induzir 75 % de sobrevivência. Este resultado está de acordo com o esperado para a dose limitante de proteína E-1T usada nesse ensaio (1 µg), escolhida a fim de permitir melhor avaliação de incremento de eficiência das formulações avaliadas. A formulação deste antígeno com os adjuvantes Addavax e CAF01 não foi capaz de induzir nenhuma proteção.

Dentre as formulações de proteína E YF expressa em BL21, a formulação com hidróxido de alumínio induziu apenas 22 % de sobrevivência após a imunização em esquema de 2 doses. A formulação equivalente com o adjuvante Addavax (mesmo esquema de doses) também não foi capaz de induzir incremento de proteção ao desafio letal, com apenas 11 % de sobrevivência.

A formulação com a proteína E ecto YF (3 ug) produzida em baculovirus/ células Sf9 e formulada com hidróxido de alumínio não foi capaz de induzir nenhuma proteção nesse modelo de desafio letal.

4.4.3.2 Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT₅₀)

Os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pelas diferentes formulações de proteínas recombinantes foi avaliado nos tempos pré e pós-desafio. A análise dos dados de PRNT₅₀ seguem na figura 4.15 abaixo:

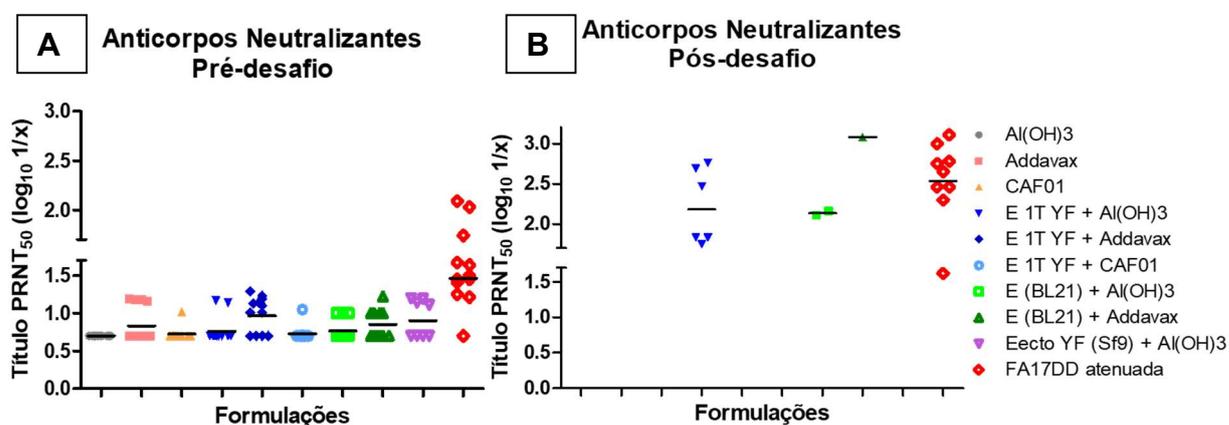


Figura 4.15: Ensaio III: Títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT₅₀ nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).**“Cut off” PRNT₅₀ 1,43. (A) Dados normais; p< 0,0001, One-way anova. (B) Dados não normais; p= 0,2072, Kruskal-Wallis.

Nas dosagens da coleta pré-desafio do terceiro ensaio, as formulações de proteína E YF recombinante expressas em diferentes sistemas (*N. benthamiana*, *E. coli* e baculovirus/ Sf9) não foram capazes de induzir títulos de anticorpos neutralizantes acima do ponto de corte do teste. Apenas o grupo controle positivo imunizado com a vacina FA17DD atenuada (TMG 1,46 log₁₀) foi capaz de induzir anticorpos acima do ponto de corte preconizado (>1,43 log₁₀). Os grupo controles negativos imunizados com os respectivos adjuvantes testados na ausência de antígeno apresentaram títulos abaixo do ponto de corte, validando a especificidade do ensaio. A análise estatística pelo pós-teste de Tukey demonstrou significância estatística apenas nas comparações do grupo imunizado com a vacina atenuada FA17DD com os grupos controles negativos (Al(OH)₃, Addavax e CAF01) e demais

formulações experimentais de proteína recombinantes (E-1T, E BL21 e E ecto Sf9) com estes adjuvantes. As diferentes formulações de cada uma das proteínas com os adjuvantes não apresentaram diferenças significativas.

Após o desafio, os animais sobreviventes, como já descrito nos ensaios anteriores, passaram a apresentar altos títulos de anticorpos neutralizantes induzidos pelas formulações experimentais de proteína E YF testadas (E 1T/ Al (OH)₃ com TMG 2,18 log₁₀; E BL21/ Al (OH)₃ com TMG 2,14 log₁₀ e E BL21/ Addavax com TMG 3,08, respectivamente) (vide quadro 4.3). Cabe ressaltar que a formulação contendo proteína E ecto YF (baculovírus/ Sf9) em hidróxido de alumínio não foi capaz de induzir nenhuma resposta protetora (ausência de animais sobreviventes ao desafio) nas condições de dose (3 µg) e esquema de imunização (2 doses) avaliadas preliminarmente neste ensaio.

4.4.3.3 Dosagem de IgG total por ELISA

As amostras pré e pós-desafio também foram avaliadas por ELISA contra o vírus. Os dados seguem ilustrados na figura 4.16 abaixo.

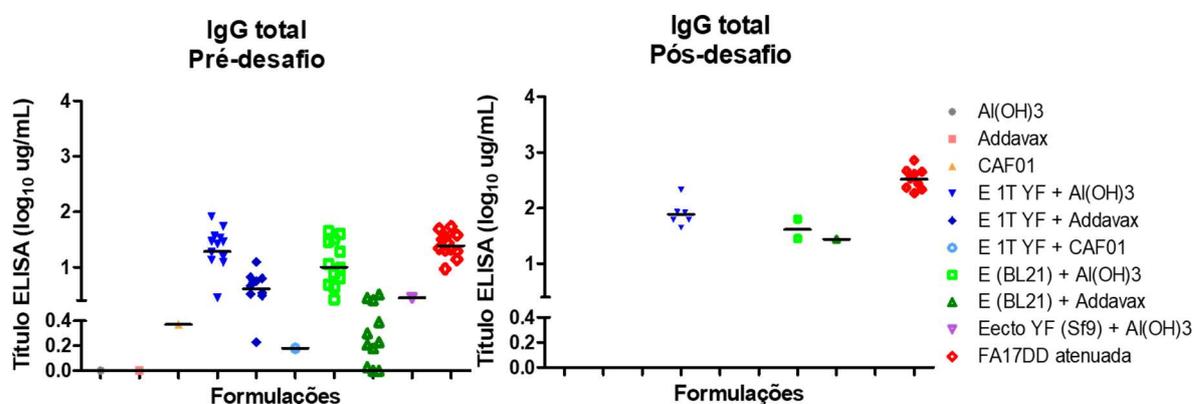


Figura 4.16: Ensaio III: Títulos de IgG total por ELISA nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B).**“Cut off” ELISA IgG= 0,56. (A) Dados normais; p< 0,0001, One-way anova. (B) Dados não normais; p= 0,005, Kruskal-Wallis.

As formulações de proteína E-1T (expressa em plataforma vegetal) e E (BL21) com hidróxido de alumínio foram capazes de induzir os maiores títulos de IgG total para febre amarela dentre as formulações avaliadas neste ensaio (TMG de 1,29 e 1,00 log₁₀, respectivamente; diferença não significativa_ p> 0,05, pós-teste de Tukey). As formulações equivalentes com adjuvante Addavax foram capazes de gerar títulos

limítrofes (TMG 0,61 log₁₀ para E-1T/ Addavax) ou mesmo abaixo do ponto de corte (0,24 log₁₀ para E (BL21)/Addavax) (p < 0,05, pós-teste de Tukey) (Quadro 4.3). A formulação de proteína E ecto/ Sf9 com hidróxido de alumínio também não foi capaz de gerar títulos de IgG acima do ponto de corte (TMG 0,45 log₁₀). Na análise pelo pós teste de Tukey, as formulações experimentais das proteínas recombinantes (E-1T e E BL21) com hidróxido de alumínio também não apresentaram diferenças significativas em relação a vacina atenuada FA17DD.

Na coleta pós-desafio, conforme demonstrado pelos ensaios anteriores, os animais sobreviventes apresentaram incremento nos títulos de IgG total (TMG entre 1,44 e 2,52 log₁₀). Os dados de imunogenicidade e proteção seguem descritos no quadro 4.3 a seguir.

Quadro 4.3: Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio III.

Ensaio III						
Títulos Médios Geométricos (nº positivos/total do grupo)*						
Grupo	Formulação	Anticorpos Neutralizantes (log ₁₀ 1/x)		IgG total (log µg/mL)		Sobrevivência % (vivos/grupo)
		pré desafio	pós desafio	pré desafio	pós desafio	
1	Al(OH) ₃	0,70 (0/12)	x	0,00		0 (0/9)
2	Addavax	0,83 (0/12)	x	0,00		0 (0/9)
3	CAF01	0,72 (0/12)	x	0,37		0 (0/8)**
4	E 1T YF + Al(OH) ₃	0,76 (0/12)	2,18 (6/6)	1,29 (11/12)	1,89 (6/6)	75 (6/8)**
5	E 1T YF + Addavax	0,97 (0/12)	x	0,61 (5/12)	x	0 (0/9)
6	E 1T YF + CAF01	0,72 (0/12)	x	0,18	x	0 (0/9)
7	E (BL21) + Al(OH) ₃	0,76 (0/12)	2,14 (2/2)	1,00 (11/12)	1,61 (2/2)	22 (2/9)
8	E (BL21) + Addavax	0,85 (0/12)	3,08 (1/1)	0,24 (0/12)	1,44 (1/1)	11 (1/9)
9	Ecto YF (baculo/Sf9) + Al(OH) ₃	0,90 (0/8)	x	0,45 (0/8)	x	0 (0/8)**
10	Vacina 17DD atenuada	2,21 (8/12)	3,06 (9/9)	1,39 (12/12)	2,52 (9/9)	100 (9/9)

*Considerando Cut off PRNT₅₀ = 1,43 e Cut off ELISA IgG = 0,56.

**Morte de animal por causa não relacionada ao vírus.

4.4.4 Ensaio IV: imunogenicidade e proteção induzida pelas melhores formulações avaliadas e duração da imunidade

A partir da análise dos 3 ensaios anteriores, foi montada uma tabela comparativa contendo todas as formulações testadas com algum grau de proteção (quadro 4.4). A partir dessa análise, foram selecionada as duas melhores formulações

(2x FA17DD Inativado/ Addavax e 3x FA17DD Inativado/ Al (OH)₃) para melhor caracterização das respostas protetoras e avaliação da duração da imunidade.

Quadro 4.4: Comparação geral das formulações testadas.

Comparação Geral das Formulações Testadas*					
Formulação	Anticorpos Neutralizantes (log ₁₀ 1/x)		IgG total (log µg/mL)		Sobrevivência %
	pré desafio	pós desafio	pré desafio	pós desafio	
2x FA17DD Inativado + Al(OH) ₃	0,84	2,55	3,27	3,03	25
3x FA17DD Inativado + Al(OH)₃	1,00	2,63	3,07	3,07	70
2x E-1T YF BL21 + Al(OH) ₃	0,76	2,18	1,29	1,89	75
2x E YF BL21 + Al(OH) ₃	0,70	2,03	1,00	1,61	22
3x E YF BL21 + Al(OH) ₃	0,76	2,60	1,03	1,63	33
2x FA17DD Inativado + Addavax	0,86	1,53	3,80	3,66	100
2x E YF BL21 + Addavax	0,70	2,89	0,24	1,44	11
1x FA17DD atenuada	1,64	2,72	1,07	2,39	100

*Apenas formulações com algum grau de proteção foram incluídas na análise. Em negrito, as formulações selecionadas.

Dentre as diferentes formulações testadas, aquelas baseadas no vírus inativado apresentaram melhor desempenho na indução de imunogenicidade e proteção que as baseadas na proteína E expressa em *E. coli* (BL21). Por essa razão, optamos por utilizar esse antígeno como modelo no ensaio subsequente para melhor caracterização do potencial dos adjuvantes analisados.

4.4.4.1 Determinação da Sobrevivência ao Desafio IC

Um dos objetivos da realização do ensaio IV foi validar os resultados obtidos anteriormente com as melhores formulações selecionadas em nosso estudo. Para tal, um novo ensaio foi realizado com as melhores formulações selecionadas e os dados de sobrevivência seguem ilustrados na figura 4.17 a seguir.

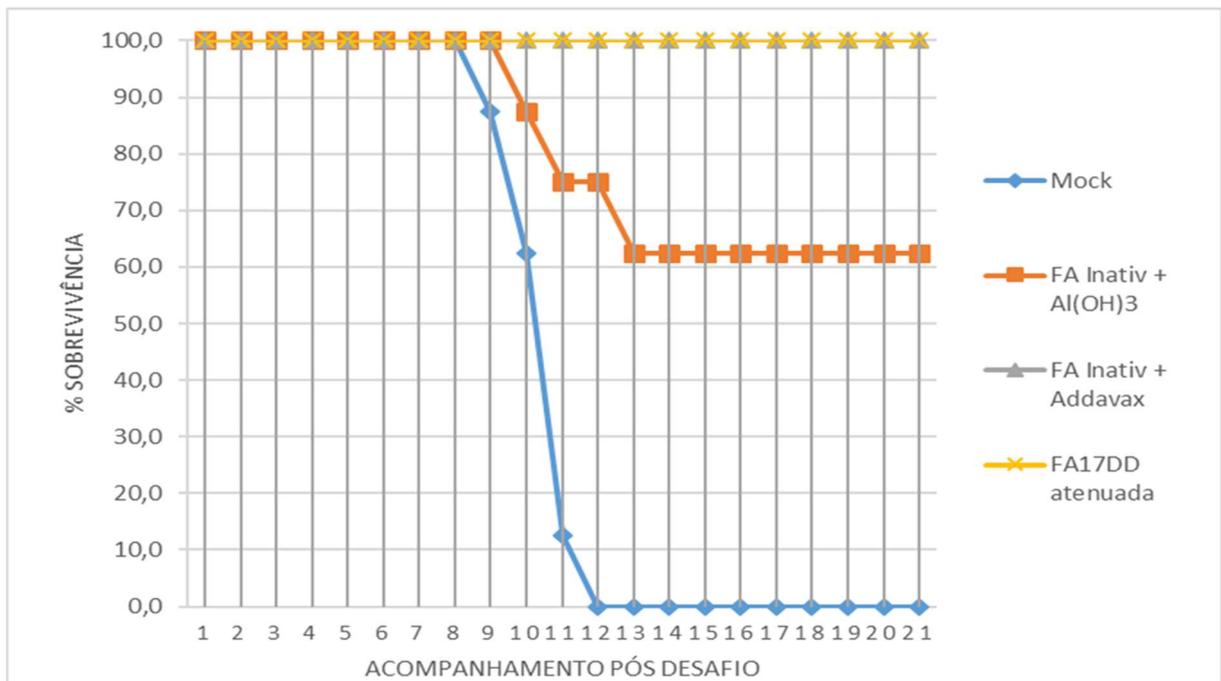


Figura 4.17: Percentual de sobrevivência ao desafio IC dos camundongos do Ensaio IV.

Os grupos controle negativo (Mock) e positivo (vírus FA17DD atenuado) obtiveram taxas de 0 (0/8) e 100 % (8/8) de sobrevivência, respectivamente, validando o ensaio. As formulações experimentais de vírus inativado com Addavax e hidróxido de alumínio também reproduziram os índices de sobrevivência obtidos nos experimentos anteriores. A formulação com o adjuvante Addavax apresentou performance superior ao hidróxido de alumínio para formulações com antígenos particulados (vírus FA17DD inativado), induzindo 100 % (8/8) de proteção em esquema de 2 doses contra os 62 % (5/8) de sobrevivência induzidos pela formulação de hidróxido de alumínio aplicada em 3 doses. Os animais sobreviventes foram acompanhados durante 21 dias após desafio e foram observados alguns sintomas nervosos como paralisia de membros (1/5 dos animais imunizados com FA17DD/Al(OH)₃ e 1/8 dos animais imunizados com FA17DD/Addavax) e sintomas motores (4/5 animais dos animais imunizados com FA17DD/Al(OH)₃ e 1/8 dos animais imunizados com FA17DD/Addavax) em parte dos grupos imunizados com as formulações experimentais. Esses sintomas não são observados nos animais imunizados e protegidos pela vacina atenuada, os quais apresentaram-se 100 % assintomáticos ao longo dos 21 dias de acompanhamento (figura 4.18).

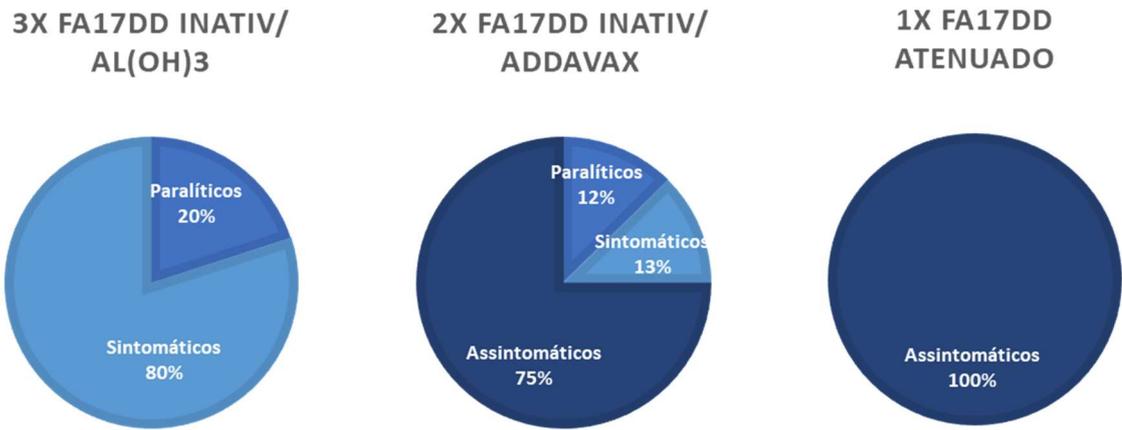


Figura 4.18: Ensaio IV: Morbidade dos animais imunizados com as formulações experimentais durante o acompanhamento clínico pós-desafio.

4.4.4.2 Dosagem de anticorpos neutralizantes para febre amarela pelo Teste de Neutralização por Redução de Placas de lise (PRNT₅₀)

Os títulos de anticorpos neutralizantes individuais foram determinados para os tempos de coleta pré e pós-desafio. Os resultados seguem descritos na figura 4.19 abaixo:

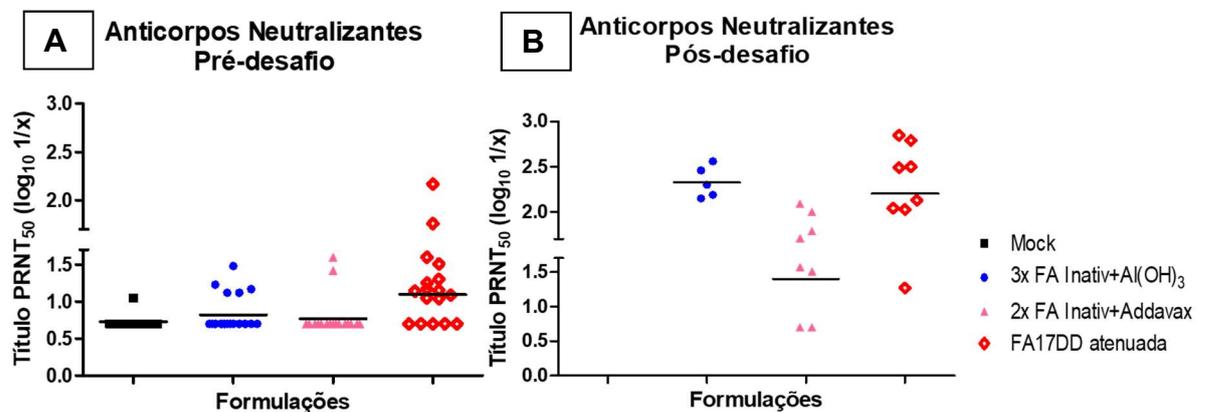


Figura 4.19: Ensaio IV: Títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT₅₀ nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B). “***Cut off” PRNT₅₀ 1,43. O esquema de doses das respectivas formulações está indicado na legenda. (A) Dados normais; p= 0,0009 (One-way Anova). (B) Dados não normais; p= 0,0056 (Kruskal-Wallis).

Os resultados das dosagens de anticorpos neutralizantes do quarto ensaio reproduziram os resultados obtidos anteriormente. No tempo pré-desafio, apenas o grupo imunizado com a vacina atenuada FA17DD foi capaz de induzir níveis

consideráveis de anticorpos neutralizantes (TMG 1,09 log₁₀), ainda que um pouco abaixo do ponto de corte preconizado (>1,43 log₁₀) (p< 0,05 em relação ao grupo mock e demais formulações experimentais, pós-teste de Tukey). As melhores formulações experimentais de vírus inativado selecionadas (2x FA17DD Inativ/Addavax e 3x FA17DD Inativ/ Al(OH)₃) apresentaram apenas títulos basais de anticorpos neutralizantes na coleta pré-desafio. As diferenças foram consideradas não significativas (p< 0,05, pós-teste de Tukey) tanto entre diferentes formulações experimentais, como em relação ao controle negativo (grupo Mock). Os camundongos do grupo controle negativo (Mock) apresentaram títulos baixos, validando a especificidade do ensaio.

Na coleta pós-desafio, por sua vez, todos os animais sobreviventes imunizados com a vacina atenuada e a formulação de vírus inativado com hidróxido de alumínio apresentaram incremento no título de anticorpos neutralizantes (TMG de 2,20 e 2,33 log₁₀, respectivamente), ultrapassando o ponto de corte do ensaio. A formulação de vírus inativado com Addavax induziu títulos de anticorpos neutralizantes limítrofes ao ponto de corte (TMG 1,40 log₁₀) (quadro 4.5).

4.4.4.3 Dosagem de IgG total por ELISA

Da mesma maneira como nos ensaios anteriores, foram dosadas as amostras pré e pós desafio do quarto ensaio. Os dados seguem ilustrados na figura 4.20 a seguir.

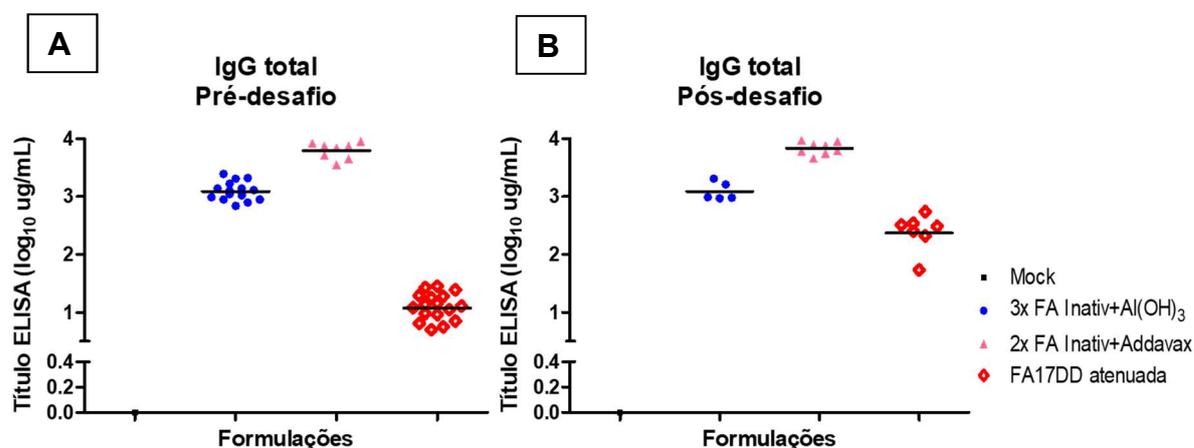


Figura 4.20: Ensaio IV: Títulos de IgG total por ELISA nos tempos pré-desafio (A) e pós-desafio (B). * "Cut off" ELISA IgG= 0,56. (A) Dados normais; p< 0,0001 (One-way Anova). (B) Dados não normais; p= 0,0005 (Kruskal-Wallis).

Assim como nos ensaios anteriores, as formulações selecionadas (3x FA17DD inativado/ Al(OH)₃ e 2x FA17DD inativado / Addavax) foram capazes de induzir altos títulos de IgG contra o vírus da febre amarela (TMG entre 1,07 e 3,79 log₁₀) após a conclusão do protocolo de imunização (coleta pré-desafio). O grupo controle imunizado com a vacina atenuada, mais uma vez, apresentou títulos positivos para febre amarela, porém num limiar menor em comparação com as formulações experimentais de vírus inativado (todas as diferenças foram significativas_ p< 0,05, pós-teste de Tukey).

No tempo pós-desafio, da mesma maneira, todos os grupos apresentaram incremento de título de anticorpos totais contra febre amarela. Este aumento é mais visível no grupo imunizado com a vacina atenuada (aumento de 2,21x), devido a maior variação entre os títulos nos dois tempos de coleta. Os dados detalhados de imunogenicidade e proteção seguem descritos na tabela 4.4 a seguir.

De maneira geral, os resultados de imunogenicidade e proteção obtidos foram validados em dois ensaios independentes, demonstrando a sua consistência.

Quadro 4.5: Resumo geral dos resultados de imunogenicidade e proteção do Ensaio VI.

Ensaio IV						
Títulos Médios Geométricos (nº positivos/total do grupo)*						
Grupo	Formulação	Anticorpos Neutralizantes (log ₁₀ 1/x)		IgG total (log µg/mL)		Sobrevivência % (vivos/grupo)
		pré desafio	pós desafio	pré desafio	pós desafio	
1	Mock	0,73 (0/11)	x	0,00	x	0 (0/8)
2	3x Vírus 17DD inativado 10µg+ Al(OH) ₃	0,82 (1/17)	2,33 (5/5)	3,09 (17/17)	3,09 (5/5)	63 (5/8)
3	2x Vírus 17DD inativado 10µg+ Addavax	0,76 (1/17)	1,40 (6/8)	3,79 (17/17)	3,83 (8/8)	100 (8/8)
4	Vacina FA17DD atenuada	1,09 (4/17)	2,20 (7/8)	1,07 (17/17)	2,37 (8/8)	100 (8/8)

*Considerando Cut off PRNT₅₀= 1,43 e Cut off ELISA IgG= 0,56.

**Morte de animal por causa não relacionada ao vírus.

4.4.4.4 Dosagem de subtipos de IgG

A fim de avaliar quais são os subtipos de IgG induzidos pelas diferentes formulações protetoras avaliadas e associa-los com a possível função das imunoglobulinas, as amostras pré e pós-desafio do quarto ensaio foram submetidas a ensaio de isotipagem por ELISA.

A vacina atenuada FA17DD, apesar de induzir menores títulos de IgG, quando comparada com as formulações experimentais de vírus inativado, demonstrou uma distribuição mais equilibrada entre os subtipos, com prevalência de IgG2a (subtipo de IgG mais associado a função neutralizante).

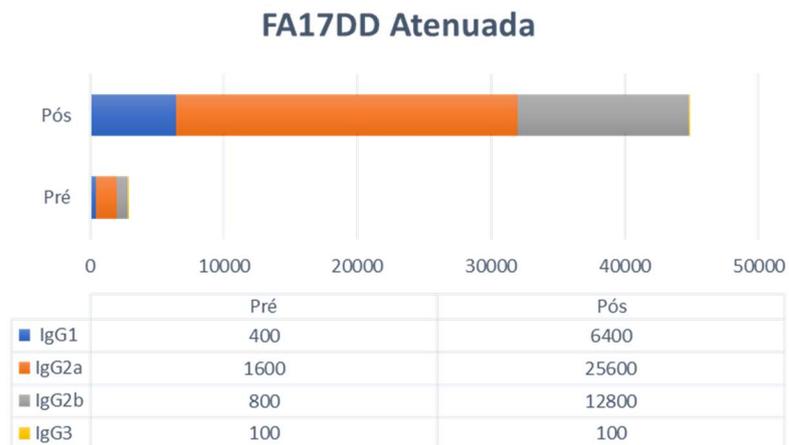
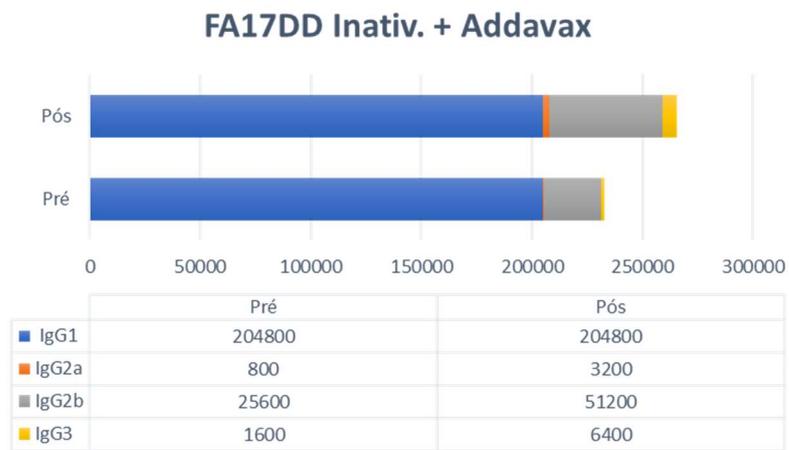
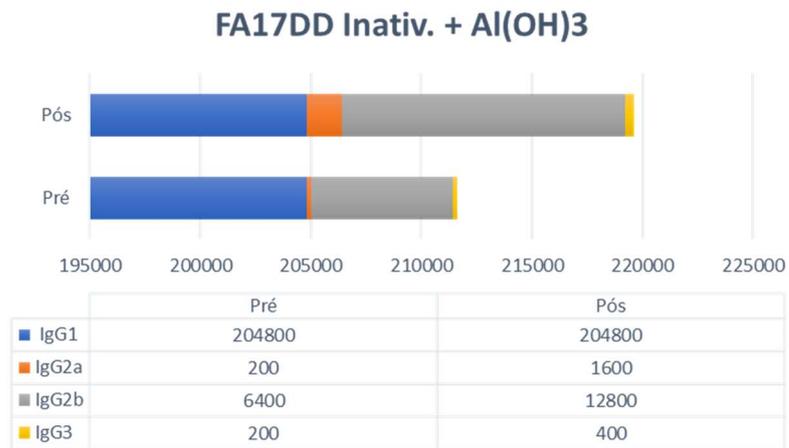
A vacina atenuada induziu título de IgG2a de 1600 a partir da conclusão do protocolo de vacinação, frente aos títulos de 200 e 800 induzidos pelas formulações de vírus inativado com Al (OH)₃ e Addavax, respectivamente. Após o desafio, entretanto, as três formulações avaliadas apresentaram incremento nos títulos de IgG2a, corroborando os resultados obtidos por PRNT (altos títulos de anticorpos neutralizantes) nos animais sobreviventes ao desafio. Com o efeito “booster” do vírus, o nível de IgG2a no grupo imunizado com a vacina atenuada alcançou o título de 25600 (aumento de 16x) em comparação com os aumentos mais modestos (4 a 8x) induzidos pelas formulações experimentais (FA17DD inativ/ Addavax e FA17DD inativ/ Al (OH)₃, respectivamente).

As demais formulações baseadas em hidróxido de alumínio e Addavax, em contrapartida, apresentaram títulos superiores de IgG total, com predomínio de IgG1 ao fim do protocolo de imunização (pré-desafio). As respectivas dosagens de IgG1 revelaram títulos maiores que 204800, contra o título de 400 deste subtipo no grupo imunizado com a vacina atenuada.

Em contrapartida, a formulação baseada em Addavax induziu ainda um alto título inicial de IgG2b (título de IgG2b= 25600), em comparação com as demais formulações (títulos de 6400 e 800 induzidos por FA17DD inativado/ Al (OH)₃ e vacina atenuada FA17DD, respectivamente). Após o desafio com o vírus, formulação com Addavax atingiu o limiar de 51200 de título de IgG2b, frente ao título de 12800 induzido pelas demais. O IgG2b é o segundo subtipo de IgG com maior potencial neutralizante.

O balanço entre os diferentes subtipos seguem descritos na figura 4.21 a seguir.

Figura 4.21: Distribuição dos Subtipos de IgG induzidos pelas formulações testadas nos tempos pré e pós-desafio.



4.4.4.5 Dosagem de citocinas por ELISpot

Para avaliar a contribuição da resposta celular para a proteção neste modelo de desafio, as citocinas IFN γ , IL-2 e IL-4 foram dosadas por ELISpot nos tempos pré e pós-desafio. Para avaliação da resposta local, foram analisados os linfonodos drenantes (poplíteo e inguinal da pata onde foi realizada a última dose) no tempo pré-desafio e o cérebro no tempo pós-desafio. Para a avaliação da resposta sistêmica, foram analisados o baço e a medula óssea dos mesmos animais nos mesmos tempos citados.

Os dados da resposta local seguem descritos nas figuras 4.22 e 4.23. No tempo pré-desafio, há uma discreta produção de IFN γ (FA17DD/Addavax e vacina atenuada) e IL-2 (todas as formulações) e uma sutil produção de IL-4 (apenas para vacina atenuada). Já no tempo pós-desafio, é possível perceber um incremento na secreção das 3 citocinas nos animais imunizados com as diferentes formulações, com destaque para a produção de IFN γ (citocina associada a proteção nesse modelo).

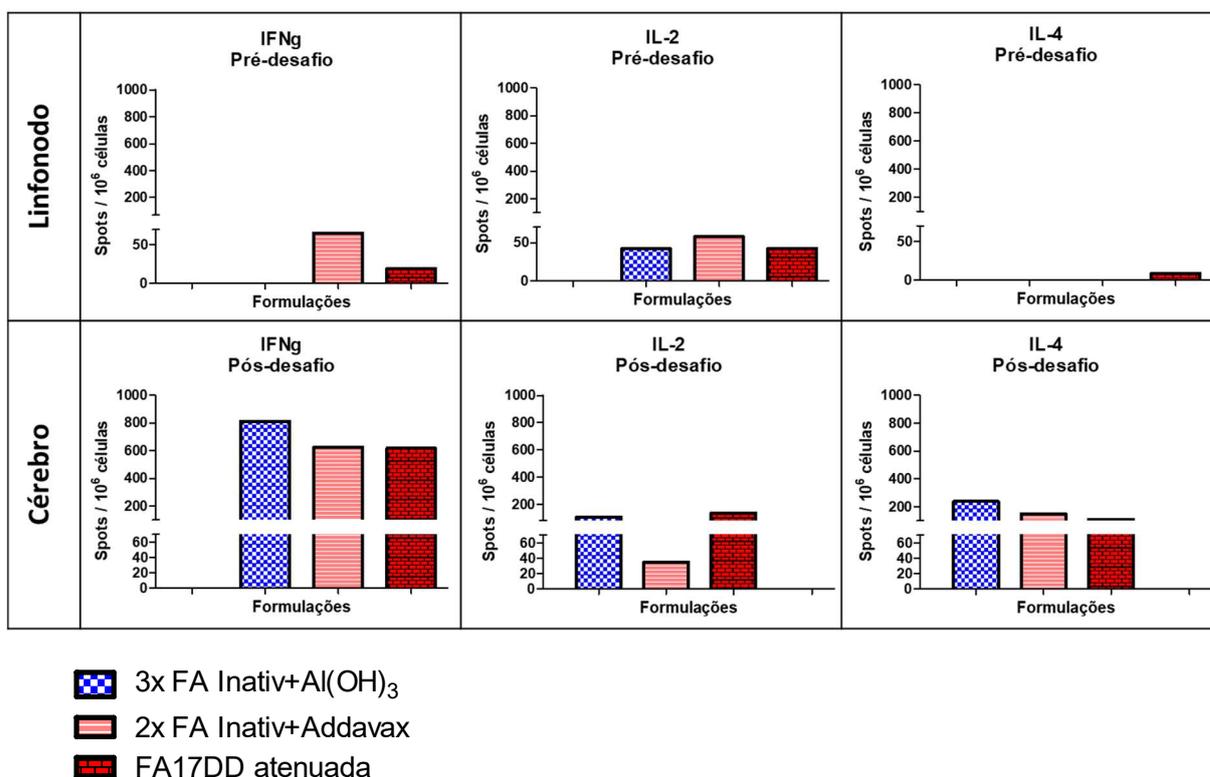


Figura 4.22: Ensaio IV: Dosagem de IFN γ , IL-2 e IL-4 por ELISpot nos tempos pré (linfonodos drenantes) e pós-desafio (cérebro).

A figura 4.23 abaixo ilustra o balanço de citocinas induzidos por cada formulação nos tempos pré e pós-desafio. No tempo pré-desafio, é possível visualizar maior magnitude de resposta induzida pelo formulação com Addavax, em comparação com as demais. Após o desafio, há um incremento na produção de todas as citocinas (aumento de cerca de 10x no total), com prevalência de IFN γ nos animais imunizados com as diferentes formulações.

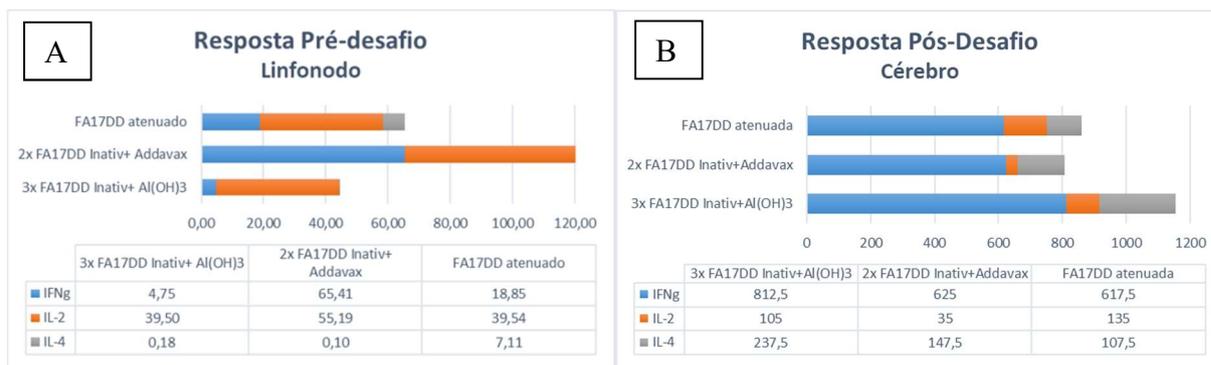


Figura 4.23: Ensaio IV: Balanço de citocinas na resposta local (linfonodos drenantes e cérebro) nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).

A avaliação da resposta sistêmica de citocinas no baço e medula óssea não apresentou resultados consistentes nos tempos pré e pós-desafio (dados não mostrados).

4.4.4.6 Dosagem de Células B secretoras de anticorpos por ELISpot

A avaliação da produção de anticorpos específicos para o vírus por plasmócitos ativados e células B de memória também foi realizada por ELISpot para IgG nos tempos pré e pós-desafio. Infelizmente, para a avaliação da resposta local, a contribuição dos plasmócitos ativados no tempo pré-desafio (linfonodo) não foi determinada por quantidade limitante de células disponíveis para o ensaio. A dosagem das células B de memória no tempo pré-desafio, demonstra uma maior magnitude de resposta induzida pela formulação FA17DD Inativ/ Addavax, seguido de FA17DD Inativ/Al(OH) $_3$ e em menor escala a vacina atenuada. Cabe ressaltar que a coleta pré-desafio não normaliza a cinética de resposta para as diferentes vacinas avaliadas, já que a vacina atenuada é administrada em dose única (intervalo de 42 dias para coleta

de células após a imunização com a vacina atenuada versus 12 dias de intervalo, para as demais formulações) (vide esquema de imunização na figura 3.1).

No tempo pós desafio no cérebro, há um predomínio de plasmócitos ativados em relação ao número de células B de memória induzidos pelas diferentes formulações. A magnitude de secreção de anticorpos por plasmócitos ativados é maior no grupo imunizado com a vacina atenuada (305 spots/ 10^6 células), seguido das formulações baseadas em hidróxido de alumínio (297 spots/ 10^6 células) e addavax (177 spots/ 10^6 células), respectivamente.

Os dados seguem descritos na figura 4.24 a seguir.

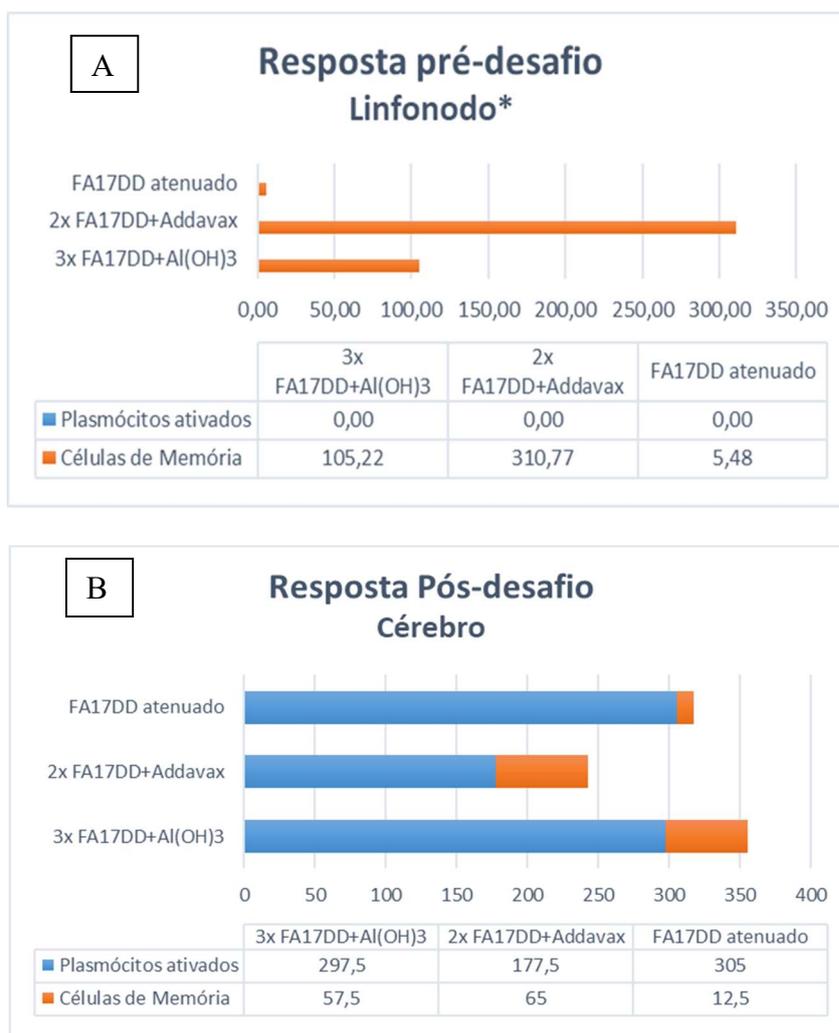


Figura 4.24: Ensaio IV: Análise da resposta local (linfonodos drenantes e cérebro) por dosagem de plasmócitos ativados e células B de memória por ELISpot de IgG nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).* Dosagem de plasmócitos ativados não realizada por falta de células suficientes do macerado de linfonodo disponíveis.

A análise da resposta sistêmica usando células do baço revelou um equilíbrio entre as quantidades de plasmócitos ativados e células B de memória induzidos pelas formulações experimentais com Addavax e Al(OH)₃. Esse equilíbrio não está mantido no grupo imunizado com a vacina atenuada, possivelmente por conta da diferença de intervalo de coleta descrita anteriormente. Neste grupo há um predomínio de células B de memória (figura 4.25A). No tempo pós-desafio, não é possível ver incremento de resposta na avaliação da resposta sistêmica usando o baço para análise, possivelmente por conta do modelo de desafio intracerebral (órgão imunoprivilegiado) (figura 4.25 B).

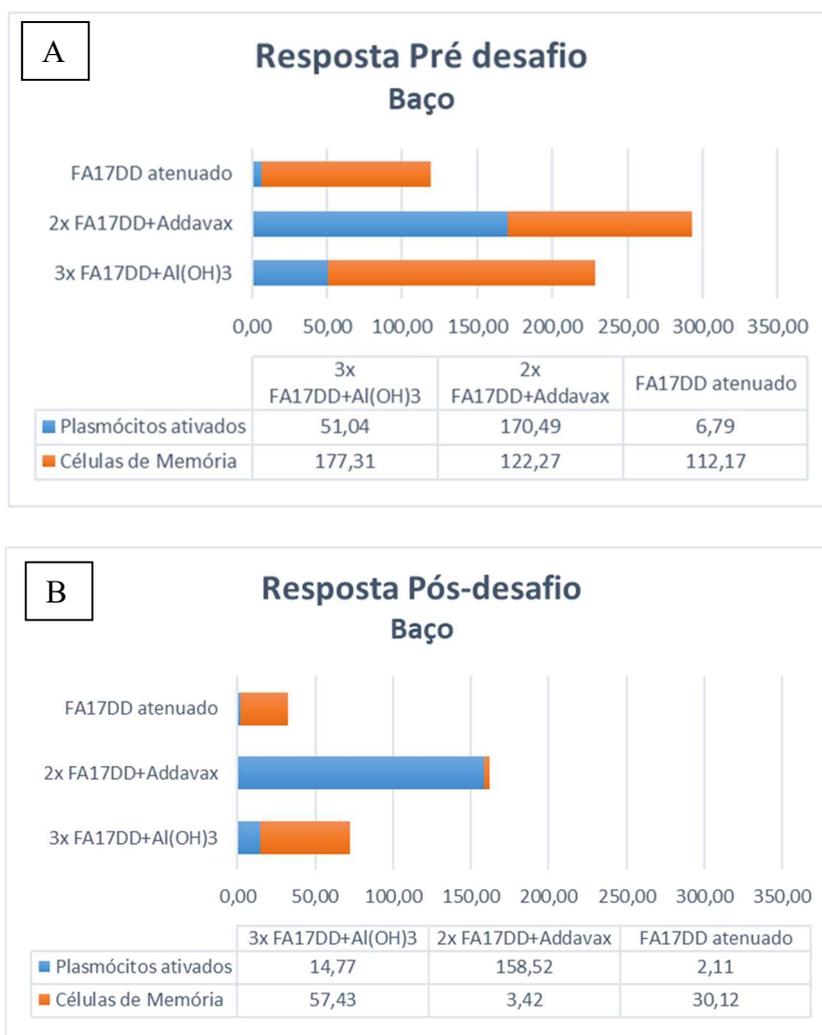


Figura 4.25: Ensaio IV: Análise da resposta sistêmica de plasmócitos ativados e células B de memória no baço por ELISpot de IgG nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).

Analisando o tempo pré-desafio na medula óssea, por sua vez, há um predomínio de plasmócitos ativados em relação a quantidade de células B de memória para cada formulação. Dentre as formulações, a FA17DD Inativ/ Addavax se destaca tanto na dosagem de plasmócitos ativados como de células B de memória em relação às demais (figura 4.26A).

No tempo pós-desafio, também não é possível detectar um incremento de magnitude de resposta na medula óssea em relação a coleta pré-desafio (possivelmente pelas características do modelo). As formulações experimentais apresentam um predomínio de plasmócitos ativados em relação as células B de memória. Essa característica não está presente no grupo imunizado com a vacina atenuada (figura 4.26B).

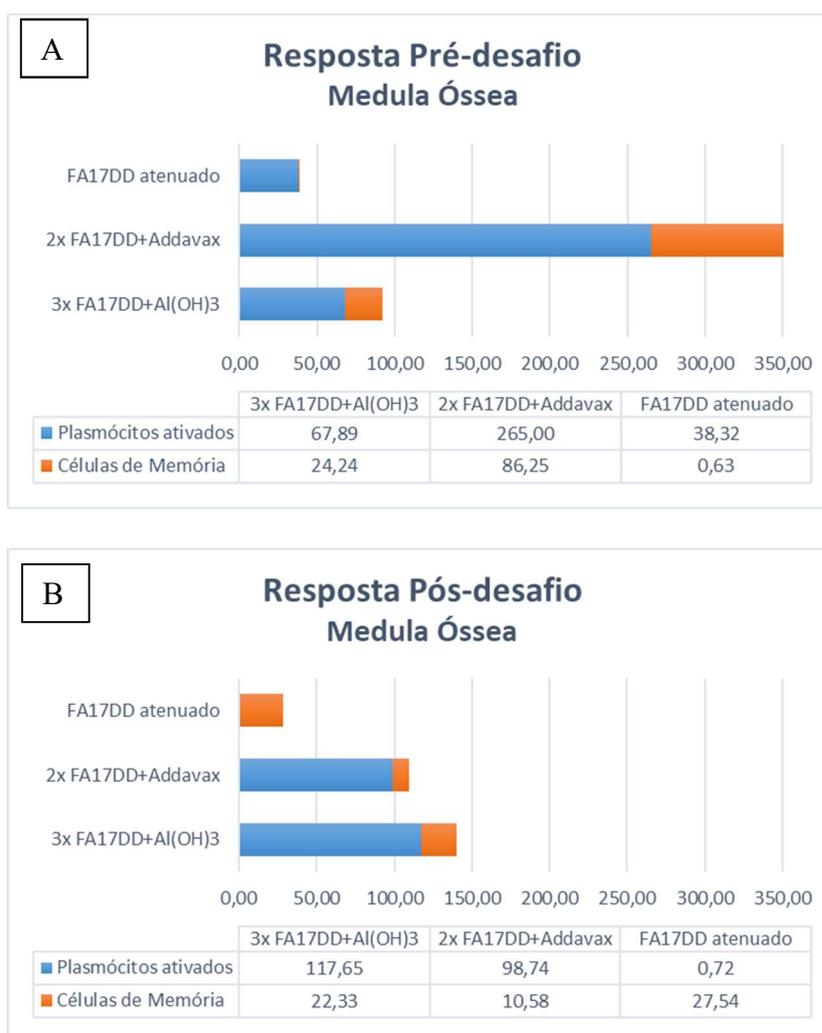


Figura 4.26: Ensaio IV: Análise da resposta sistêmica de plasmócitos ativados e células B de memória na medula óssea por ELISpot de IgG nos tempos pré (A) e pós-desafio (B).

4.4.5 Duração da imunidade

Quanto a cinética de duração da imunidade acompanhada ao longo de 3 meses, tanto os títulos de anticorpos neutralizantes como os títulos de IgG total se mantiveram próximos aos valores basais induzidos pelas respectivas formulações no tempo pré-desafio (40 dpi). Apenas o grupo imunizado com a vacina atenuada apresentou um suave aumento de título de anticorpos neutralizantes no tempo final (132 dpi), porém não significativo devido ao número amostral reduzido. Os resultados seguem na figura 4.27 a seguir.

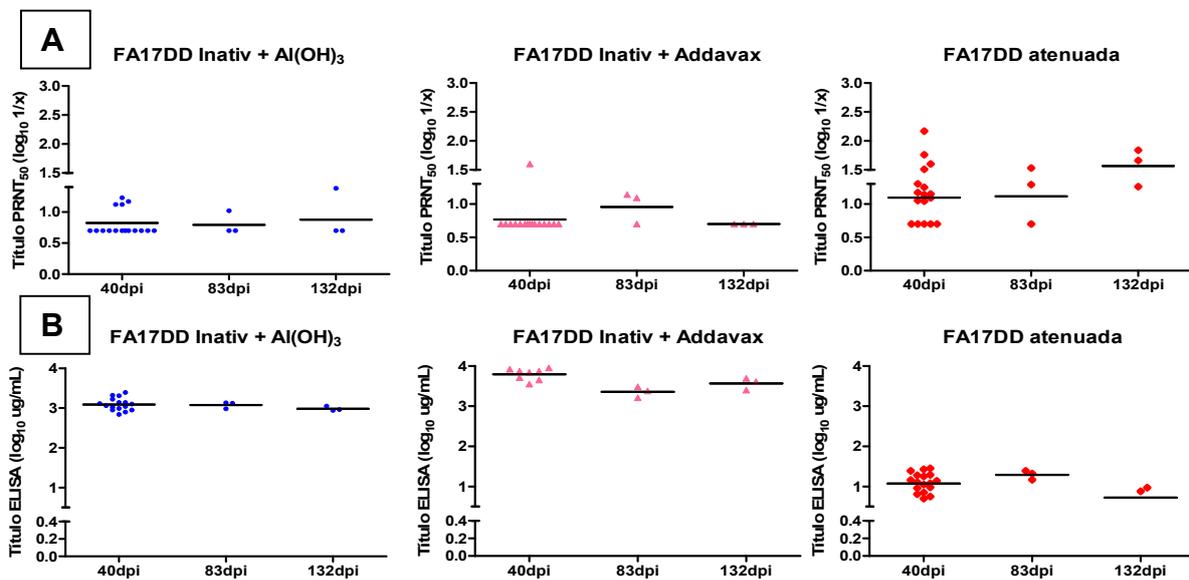


Figura 4.27: Ensaio IV: Cinética dos anticorpos neutralizantes (A) e IgG total (B) nos tempos 40 dpi, 83 dpi e 132 dpi.

Os dados gerais de resposta humoral avaliadas por PRNT₅₀ e ELISA seguem descritos no quadro 4.6 a seguir.

Quadro 4.6: Resumo geral dos resultados de duração da imunidade do Ensaio VI.

Ensaio IV		Duração da Imunidade					
		Títulos Médios Geométricos (nº positivos/total do grupo)*					
Grupo	Formulação	Anticorpos Neutralizantes (log ₁₀ 1/x)			IgG total (log µg/mL)		
		40dpi	83dpi	132dpi	40dpi	83dpi	132dpi
2	3x Vírus 17DD inativado 10µg+ Al(OH) ₃	0,82 (1/17)	0,79 (0/3)	0,88 (0/3)	3,09 (17/17)	3,08 (3/3)	2,99 (3/3)
3	2x Vírus 17DD inativado 10µg+ Addavax	0,76 (1/17)	0,95 (0/3)	0,70 (0/3)	3,79 (17/17)	3,35 (3/3)	3,56 (3/3)
4	Vacina FA17DD atenuada	1,09 (4/17)	1,11 (1/3)	1,57 (2/3)	1,07 (17/17)	1,29 (3/3)	0,72 (3/3)

*Considerando “Cut off” PRNT₅₀= 1,43 e “Cut off” ELISA IgG= 0,56.

5. Discussão

5.1 Expressão das proteínas recombinantes E e NS1 em sistema procarioto

Apesar das conhecidas limitações, tais como dificuldades de enovelamento correto e falta de modificações pós-traducionais), a expressão de proteínas recombinantes em sistema procarioto permanece como a primeira abordagem explorada dentre os sistemas de expressão disponíveis devido a sua simplicidade de manipulação, baixo custo e versatilidade (gama de vetores e linhagens celulares disponíveis) (Ke & Berkmen, 2014). Conforme descrito anteriormente, a proteína E YF expressa em *E. coli* BL21 foi obtida na forma de corpúsculo de inclusão. Para obtenção desta proteína purificada foi necessário realizar sua solubilização com agente caotrópico (ureia 8M), seguida de etapa de reenovelamento por diálise. Essa estratégia, além de reduzir o rendimento da proteína produzida nesse sistema, pode comprometer sua conformação nativa e, conseqüentemente, sua qualidade como antígeno. As dificuldades de produção de proteínas transmembrana são classicamente conhecidas devido a sua hidrofobicidade e baixa solubilidade, sendo ainda agravadas pela ausência de glicosilação na expressão em sistema procarioto (Hawe & Frieb, 2007). Diferentes categorias de aditivos podem ser utilizados a fim de aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes: (i) ligantes que favoreçam a manutenção da proteína em solução (ex: metais ou aminoácidos); (ii) substâncias que reduzam a interação proteína-proteína (agentes caotrópicos); (iii) aditivos que afetam a estabilidade proteica (agentes redutores, açúcares e polióis); ou (iv) aditivos que alteram a condição iônica do tampão (Leibly *et al*, 2012). Em nosso estudo, utilizamos o agente caotrópico ureia como nossa estratégia de solubilização. Após a purificação da proteína por cromatografia, o problema seguinte a ser solucionado foi a retirada lenta deste agente caotrópico, de maneira a propiciar o reenovelamento proteico adequado e a manutenção da proteína em solução (sem formação de agregados e precipitação). Para tal, a etapa de reenovelamento foi realizada por diálise lenta na presença dos aditivos Triton X-100 (detergente não-iônico) e sorbitol (poliálcool). O sorbitol, já descrito como potente termoestabilizador para congelamento-descongelamento de partículas virais (Pastorino *et al*, 2015), se mostrou adequado para manter a estabilidade da proteína E YF em solução e durante o processo de congelamento e estocagem.

Durante o desenvolvimento do projeto, outras alternativas para obtenção da proteína E YF com enovelamento adequado foram exploradas, como a expressão na cepa de *E. coli* “Shuffle” (Lobstein *et al*, 2012; Na Ke & Berkmen, 2014), por exemplo. Esta cepa é descrita como apta a realizar pontes dissulfeto, consideradas essenciais para correto enovelamento da proteína de interesse. Entretanto, a proteína obtida por esta estratégia não apresentou incremento de solubilidade, nem aparente ganho de qualidade estrutural (manteve o mesmo perfil eletroforético e antigenicidade que a proteína expressa na cepa BL21, bem como estrutura similar na avaliação por dicroísmo circular).

Apesar de todas as dificuldades de expressão e purificação da proteína E descritas, sua obtenção em sistema procarioto foi realizada com rendimento e pureza suficientes para sua avaliação como antígeno candidato nos ensaios de imunização em animais.

A proteína NS1 tem sido amplamente explorada como potencial candidato para o desenvolvimento de vacinas de subunidade e métodos de diagnóstico para os diferentes flavivírus de importância médica (Rastogi, Sharma & Singh, 2016). Em nosso estudo, a proteína NS1 expressa em *E. coli* BL21 se apresentou com duas bandas com tamanhos aproximados de 50 e 20 kDa, respectivamente. A banda maior (50 kDa) apresenta tamanho compatível com o esperado para monômeros da proteína NS1. A segunda banda de menor tamanho também foi detectada por “Western Blotting” com o anticorpo anti His sendo, portanto, associada a uma possível expressão truncada nesse sistema. Entretanto, um trabalho de Amorim e colaboradores (2010) relatando a expressão da proteína NS1 de DENV-2 em sistema procarioto também obteve essa mesma característica, presença de duas bandas, em análises por SDS-PAGE. A banda de menor massa, neste caso, foi atribuída a artefato gerado durante a corrida eletroforética, uma vez que não foi recuperada fração de tamanho compatível na análise da amostra por gel filtração (Amorim *et al*, 2010).

Assim como descrito para a proteína E, a proteína NS1 YF também foi obtida apenas na forma insolúvel e, portanto, purificada por lise de corpúsculo de inclusão com agente caotrópico (ureia 6 M) seguida de etapa de reenovelamento por diálise. Apesar das limitações já anteriormente descritas para estas estratégias utilizadas, trabalhos anteriores relatam o uso de abordagens similares para obtenção de proteína NS1 do vírus da dengue com manutenção de sua antigenicidade para potencial utilização em métodos de diagnóstico (Amorim *et al*, 2010; Sankar *et al*, 2013). Em nosso estudo, a proteína NS1 foi obtida com rendimento suficiente para sua avaliação

como antígeno candidato nos ensaios de imunização em animais. Os animais imunizados com esta proteína formulada com hidróxido de alumínio desenvolveram altos títulos de anticorpos para a respectiva proteína em ensaios de ELISA e “Western Blotting”. Entretanto, como a proteína NS1 não está presente na superfície da partícula viral, e os anticorpos contra a mesma são classicamente descritos como fixadores de complemento (Schlesinger, Foltzer & Chapman, 1993), não foi possível a detecção de respostas humorais elicítadas contra esta proteína nos ensaios *in vitro* preconizados para avaliação das diferentes formulações experimentais em nosso trabalho (ELISA contra o vírus da febre amarela e PRNT). Pelas limitações descritas acima e pelo grande número de formulações experimentais já incluídas, optamos por descontinuar a avaliação desse antígeno candidato ao longo do nosso estudo.

5.2 Expressão das proteínas recombinantes E e NS1 no sistema baculovírus/ células de inseto

O sistema baculovírus tem sido usado com sucesso para expressão de proteínas virais e diferentes vacinas profiláticas e terapêuticas baseadas nessa tecnologia já se encontram aprovadas para uso veterinário e humano. Dentre estas, pode-se citar: vacinas de subunidade para febre suína clássica (produzidas pela MSD Animal Health e Bayer/Pfizer Animal Health); VPL para circovírus bovino tipo 2 (MSD animal Health e Ingelvac); VLP para papilomavírus humano (GSK), vacina de subunidade para influenza (vacina trivalente anual produzida pela Protein Sciences) e terapia gênica para deficiência de lipase (UniQure) (revisão em van Oers, Pijlman & Vlak, 2015).

A fim de obter os antígenos recombinantes com as modificações pós traducionais adequadas para preservação das respectivas conformações nativas e antigenicidade, as proteínas E e NS1 de febre amarela foram expressas em Baculovírus/ células de inseto (linhagem Sf9) utilizando o sistema comercial Ba-to-Bac (Invitrogen).

Conforme já descrito, a proteína E YF é composta de um ectodomínio ancorado à membrana através de uma porção c-terminal haste-âncora (Heinz & Stiasny, 2012). Frente a hidrofobicidade apresentada pela expressão do gene completo no sistema procarioto, optamos por expressar apenas o seu ectodomínio no sistema de inseto. A expressão da proteína E ecto YF foi detectada apenas no extrato celular infectado com o baculovírus recombinante, não sendo secretada para o sobrenadante das

culturas infectadas. A purificação de proteínas a partir do extrato celular é mais dispendiosa devido ao grande número de contaminantes presentes na célula hospedeira, reduzindo assim o rendimento da proteína de interesse.

Outra possível consequência da não secreção da proteína de interesse, seria a ausência das modificações pós-traducionais desejadas (glicosilação) que são realizadas no retículo endoplasmático e complexo de Golgi ao longo da via secretória. No ensaio preliminar de marcação de glicosilação com o kit Pro-Q Emerald realizado, não foi detectada glicosilação na proteína E ecto YF, mas a realização de novo ensaio com as massas de antígenos equiparadas seria necessário para validar esse resultado. Com objetivo de obter a proteína E ecto YF secretada com as devidas modificações pós-traducionais, uma nova construção da proteína E ecto contendo a sequência sinal da proteína GP64 (antígeno dominante na superfície da partícula viral de baculovírus) foi desenhada e clonada. Entretanto, não alcançamos sucesso com a nova construção: a expressão da nova proteína E ecto YF SS por “Western Blotting” manteve-se detectada somente no extrato celular da cultura de Sf9 infectada. Vários trabalhos têm demonstrado as dificuldades de produzir glicoproteínas secretadas em sistema de baculovírus (Klaus *et al*, 2015; Silva Junior *et al*, 2016) e muitos esforços têm sido realizados para superar essa dificuldade. Dentre estes, a abordagem mais popular é o uso de um vetor modificado com deleção dos genes *v-cath*, *chitA* e *p10*, que contribuem para a diminuição da carga proteica no retículo endoplasmático (*v-cath* e *chitA*), e aumento do nível de expressão do transgene (*p10*), favorecendo indiretamente o processamento da proteína de interesse (Klaus *et al*, 2015). Novas abordagens utilizando outros peptídeos sinais customizados também podem ser exploradas para obtenção da proteína secretada (Futatsumori-Sugai & Tsumoto, 2010; Wang *et al*, 2015).

Na maioria dos sistemas comerciais disponíveis para expressão em baculovírus, o transgene é controlado por um promotor forte de fase muito tardia. Essa característica faz com que a produção da proteína recombinante seja maximizada apenas imediatamente antes da morte celular, quando o processamento proteico já é sub-ótimo, com comprometimento da maquinaria pós-traducional e da via secretória (Hu, 2005). Além dessa desvantagem, durante a lise celular quantidades significativas de proteína da célula hospedeira são liberadas no sobrenadante, podendo comprometer a estabilidade da proteína de interesse (Kollewe & Vilcinska, 2013). O alto nível de expressão induzido pelos promotores fortes de baculovírus (*p10* e polihedrina) muitas vezes compromete a obtenção da secreção proteína desejada

que, frequentemente se mantém acumulada no citoplasma das células de inseto, sendo apenas parcialmente processada (Klaus *et al*, 2015). Nesse contexto, novas abordagens têm sido desenvolvidas como a utilização de promotores mais precoces e com menor nível de expressão (Hu, 2005), e o desenvolvimento de vetores recombinantes codificando proteínas anti-apoptóticas, capazes de promover infecções mais prolongadas (van Oers, Pijlman & Vlak, 2015). Iniciativas como o desenvolvimento de linhagens de células de inseto contendo vias de glicosilação “humanizadas” e de vetores capazes de co-expressar as enzimas envolvidas na glicosilação junto ao gene de interesse (“SweetBac”) também têm sido realizadas para a obtenção de glicoproteínas com padrão de glicosilação humano nesse sistema (van Oers, Pijlman & Vlak, 2015).

Apesar de conter apenas o ectodomínio em sua estrutura (domínio transmembrana retirado), a proteína E ecto YF apresentou-se apenas como parcialmente solúvel. Diferentes detergentes, sais e aditivos foram avaliados objetivando sua solubilização. Contudo, a mesma somente foi solubilizada completamente na presença de ureia, requerendo etapa de reenovelamento e retirada do agente caotrópico. Essas características de expressão e a estratégia de purificação traçada, possivelmente comprometeram a potencial qualidade da proteína recombinante produzida. O antígeno obtido com um modesto rendimento foi avaliado apenas em formulação com o adjuvante hidróxido de alumínio para uma análise preliminar de sua imunogenicidade no ensaio III. Nas condições testadas no grupo imunizado (dose de 3 µg aplicada em 2 doses), a proteína E ecto YF não foi imunogênica (títulos de IgG e anticorpos neutralizantes abaixo do ponto de corte após o protocolo de imunização), nem capaz de induzir proteção frente ao desafio intracerebral.

A expressão da proteína NS1 também foi realizada nesse sistema, mas de maneira geral, a expressão desta proteína no sistema baculovírus/ células de inseto foi detectada em menores níveis em comparação com a proteína E ecto YF. Possivelmente o baculovírus recombinante Ac NS1 YF tinha um caráter mais lítico e tóxico para a cultura celular infectada ou a respectiva proteína recombinante gerada apresenta menor estabilidade. Frente aos baixos níveis de expressão apresentados por essa construção, não foi possível a obtenção de massa purificada suficiente para sua avaliação em modelo animal.

Trabalhos antigos (Desprès, Girard & Bouloy, 1991; Shiu *et al*, 1991) já relatavam iniciativas de expressão das proteínas E e NS1 em sistema baculovírus/

células de inseto. No estudo realizado por Desprès, Girard & Bouloy (1991), as proteínas E e NS1 foram expressas num mesmo vetor de baculovírus recombinante com tamanho e antigenicidade similares às respectivas proteínas obtidas em células Vero infectadas com o vírus. Neste trabalho, a proteína E também se apresentou hidrofóbica e não foi capaz migrar pela via secretória, permanecendo retida no citoplasma celular. A proteína NS1, por sua vez, sofreu processamento parcial sendo encontrada tanto na porção intracelular como associada a membrana, com padrão de N-glicosilação diverso do nativo (obtido em células de primata). Num estudo subsequente realizado pelo mesmo grupo (Desprès *et al*, 1991), foi descrita a obtenção de imunidade protetora em camundongos utilizando essa construção de baculovírus recombinante. Shiu e colaboradores (1991), também relataram a expressão da proteína E em baculovírus com antigenicidade similar a proteína nativa do vírus quando avaliada *in vitro* por imunomarcagem com anticorpos monoclonais específicos para febre amarela. O trabalho mais recente publicado neste tema (Barros *et al*, 2011) também relata a expressão da proteína E de febre amarela nesse sistema e seu potencial uso na imunodeteção contra o vírus da febre amarela em amostras de soro; porém, apenas com dados preliminares, sem o antígeno purificado para a realização dos ensaios de diagnóstico.

Apesar de todas as dificuldades descritas, o desenvolvimento contínuo de novas estratégias para mitigar essas limitações, somadas às vantagens oferecidas pelo mesmo (segurança, padrão de modificações pós-traducionais semelhante ao humano e capacidade de crescimento em grande densidade celular com baixo custo em relação a células de mamífero) mantém grande interesse na produção de antígenos nesse sistema de expressão (Van Oers, Pijlman & Vlak, 2015).

5.3 Avaliação da proteína E-1T em plataforma vegetal (*N. benthamiana*) como antígeno candidato para estudo de novos adjuvantes

A proteína de envelope E-1T, desenvolvida pela Fraunhofer através da combinação do vírus do mosaico do tabaco com *Agrobacterium tumefaciens* e expressa transientemente em *Nicotiana benthamiana* (expressão transiente), é um antígeno candidato atualmente em desenvolvimento para vacina de subunidade para febre amarela em Biomanguinhos, Fiocruz. Frente às vantagens oferecidas por estratégias de expressão baseadas nessa plataforma (obtenção de antígeno com grande rendimento e conformação potencialmente próxima a proteína nativa)

(Martínez *et al*, 2012) e pela disponibilidade de dados prévios de imunogenicidade e proteção para este antígeno, optamos por avaliar este candidato vacinal nas formulações experimentais de adjuvantes testadas para febre amarela em modelo murino. Segundo Tottey e colaboradores (2018), esta proteína foi imunogênica e capaz de induzir 70 % de proteção ao desafio letal por via intracerebral em modelo murino; além de estimular a produção de anticorpos neutralizantes com grande avidéz em primatas não humanos. Em nosso estudo, optamos por avaliar a proteína E-1T com dose e esquema de imunização de maneira a reproduzir esse percentual de 70 % de proteção com base nos resultados anteriores do grupo. As taxas de proteção obtidas com a formulação com o adjuvante hidróxido de alumínio foram reproduzidas conforme o descrito no estudo citado acima. Entretanto, as formulações baseadas em Addavax e CAF01, com diferentes mecanismos de apresentação e estimulação da resposta imune, não foram capazes de induzir nenhuma proteção (vide tópico 5.6). Por esta razão, a caracterização de formulações experimentais baseadas nesse antígeno não foi priorizada frente às demais (proteína E YF BL21 e vírus FA17DD inativado). Para uma avaliação definitiva do potencial desses adjuvantes em formulações com a proteína expressa em plataforma vegetal, entretanto; seria necessário reproduzir o experimento testando uma maior dose antigênica e o preparo das formulações imediatamente antes da administração, conforme recomendação dos fabricantes (para descartar possível degradação do antígeno).

5.4 Avaliação do vírus inativado FA17DD como candidato para estudo de novos adjuvantes

Conforme já descrito anteriormente, o vírus inativado FA17DD é um antígeno candidato para desenvolvimento de uma vacina inativada para febre amarela em Biomanguinhos. Este antígeno possui metodologia de produção (Souza *et al*, 2009) e inativação estabelecidas, bem como as estratégias de purificação (Pato *et al*, 2014) desenvolvidas e padronizadas pelo grupo de Bio-Manguinhos. Além disso, resultados prévios de imunogenicidade e proteção em modelo murino também estão disponíveis (Pereira *et al*, 2015). Por essas características, decidimos inserir o vírus inativado como antígeno modelo em nosso estudo de novas formulações adjuvantes para febre amarela. Uma abordagem similar de vacina inativada para febre amarela têm sido desenvolvida pelo grupo de Monath e colaboradores, já tendo avançado para a avaliação em ensaios clínicos de fase I (Monath *et al*, 2011).

Segundo dados de Pereira e colaboradores (2015), a formulação de vírus FA17DD inativado com o adjuvante hidróxido de alumínio aplicada em esquema de 3 doses foi capaz de induzir 100 % de proteção no modelo de desafio letal em camundongos C57BL/6. Em nosso estudo, formulações do vírus FA17DD inativado com hidróxido de alumínio aplicadas em esquema de 3 doses foram capazes de gerar apenas 70 % de proteção no modelo de desafio murino. Essa discrepância entre os percentuais de proteção em relação aos resultados anteriormente publicados (Pereira *et al*, 2015) pode ser associada ao incremento do grau de pureza do antígeno usado, a partir da introdução de etapa de polimento na estratégia de purificação. Tal fato ressalta ainda mais a importância de selecionar adjuvantes adequados para o desenvolvimento de candidatos vacinais para febre amarela com eficácia similar a vacina atenuada e maior segurança.

Em nosso estudo com diferentes formulações experimentais, a formulação de vírus inativado FA17DD com o adjuvante Addavax obteve 100 % de proteção após a imunização em esquema de duas doses; contra apenas 25 % de proteção obtido pela formulação com Al (OH)₃ em duas doses e 70 %, em três doses. Embora tenhamos induzido altos níveis de proteção com as formulações experimentais de vírus FA17DD inativado com hidróxido de alumínio e Addavax (70 e 100 %, respectivamente) ao longo do nosso estudo, essas não foram acompanhadas de altos títulos de anticorpos neutralizantes por PRNT₅₀ após a vacinação (níveis abaixo do ponto de corte no tempo pré-desafio), ao contrário do vírus vacinal FA17DD aplicado em dose única. Essa inconsistência entre os títulos de anticorpos neutralizantes descritos como o principal correlato de proteção para febre amarela (Pulendran, 2009), e os percentuais de proteção frente ao desafio em modelos animais já foi relatada em trabalho anteriores. No trabalho de Pereira e colaboradores (2015), animais com taxa de proteção de 100 % após a imunização com formulações de vírus inativado FA17DD com hidróxido de alumínio, apresentaram taxa de soroconversão em torno de apenas 44 %. Observações semelhantes foram feitas por Monath e colaboradores (2011) utilizando o modelo de desafio em hamsters, onde taxas de proteção de 90 e 100 % obtidas pelas formulações candidatas foram acompanhadas de índices de soroconversão de 30 e 90 %, respectivamente (Monath *et al*, 2010). Essa falta de correlação entre as dosagens de anticorpos neutralizantes e taxas de proteção obtidas nos modelos animais utilizados pode ser justificada pela participação das respostas celulares no desenvolvimento de proteção para febre amarela, em sinergia com a resposta humoral. A dosagem de anticorpos neutralizantes nos animais sobreviventes

ao desafio (tempo pós-desafio), por sua vez, revelou um incremento de resposta com a indução de altos títulos. Esses resultados demonstram a capacidade das formulações experimentais do vírus FA17DD inativado em conferir uma resposta imunológica basal nos animais imunizados que, num segundo contato com o antígeno (desafio intracerebral com o vírus), propiciou o desenvolvimento de uma resposta anamnésica com produção de anticorpos neutralizantes em níveis protetores. Assim sendo, o incremento no título de anticorpos neutralizantes após o desafio demonstra a existência de resposta anamnésica induzida pelas formulações experimentais de vírus FA17DD inativado, corroborando os resultados de proteção obtidos pelas formulações baseadas nesse antígeno modelo.

Em contrapartida, apesar da ausência de anticorpos neutralizantes no tempo pré-desafio, a avaliação da imunogenicidade das formulações testadas por ELISA contra o vírus FA permitiu detectar a presença de anticorpos IgG induzidos pelas diferentes formulações avaliadas. As formulações experimentais, por sua vez, induziram títulos de IgG total contra o vírus superiores aos induzidos pela vacina FA17DD atenuada. Diferentes especulações podem ser realizadas acerca desse achado. Pode se tratar de um viés experimental devido ao intervalo de coleta diferente entre as formulações (42 dias para vacina atenuada vs. 14 dias para as formulações experimentais). Ou pode sugerir, de fato, que a qualidade dos anticorpos gerados é mais relevante para a proteção que a quantidade (já que a vacina atenuada protege 100% dos animais imunizados com uma única dose).

A fim de correlacionar os anticorpos desenvolvidos com sua potencial função, ensaios de isotipagem foram conduzidos. De maneira geral, as formulações baseadas em hidróxido de alumínio são associadas ao desenvolvimento de respostas do tipo Th2. Em camundongos, o perfil Th2 está mais associado a produção de anticorpos do tipo IgG1 (Germann *et al.*, 1995). Essa característica foi reproduzida em nosso estudo, com predomínio de IgG1 no grupo imunizado com a formulação baseada em hidróxido de alumínio no tempo pré-desafio. Já a vacina atenuada FA17DD, usada como controle positivo em todos os nossos ensaios, é descrita como capaz de induzir altos níveis de IFN γ , ativando o perfil Th1 de células T helper (Neves *et al.*, 2010). O perfil Th1, em camundongos, está associado à produção de anticorpos IgG2a, IgG2b e IgG3 (Germann *et al.*, 1995). Essa premissa também foi reproduzida no nosso ensaio, onde a produção do subtipo IgG2a foi prevalente no grupo imunizado com a vacina atenuada no tempo pré-desafio.

Anticorpos podem exercer sua função antiviral através da neutralização direta de partículas infecciosas, ou via mecanismos efetores coordenados por sua porção constante da cadeia pesada (porção Fc) (Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Alguns desses mecanismos efetores ocorrem mediante interações com proteínas do sistema complemento presentes no soro. Esse sistema é um componente da resposta imune inata capaz de reconhecer o patógeno e eliminá-lo através de uma complexa cascata de eventos de clivagem. Sua ativação pode ocorrer por três diferentes vias convergentes que levam a liberação de anafilotoxinas, fatores quimiotáticos, opsonização de células infectadas e lise mediada pela formação do complexo de ataque a membrana. A via clássica do complemento é ativada pela interação entre a proteína C1q do complemento e a porção Fc da molécula de anticorpo. Essas interações da proteína Cq1 com moléculas de IgG variam conforme o isotipo em questão. Em camundongos, a hierarquia de afinidade de Cq1 por isotipo de IgG é IgG2a > IgG2b > IgG1 (Dowd e Pierson, 2011). Ensaios *in vitro* demonstraram maior capacidade neutralizante dos anticorpos na presença desta proteína do sistema complemento, associando sua atuação com incremento de avidéz dos anticorpos pela partícula viral. Anticorpos IgG2a, induzidos pelo perfil Th1 se ligam com maior afinidade à proteína C1q do que os anticorpos IgG1 induzidos pelo perfil Th2. Portanto, respostas do tipo Th1 são associadas com o sistema complemento e, potencialmente apresentam maior atividade neutralizante contra muitos vírus, incluindo flavivírus (Dowd e Pierson, 2011). Ambas as formulações candidatas (Al(OH)₃ e Addavax) apresentaram predomínio do isotipo IgG1 (perfil Th2) no tempo pré-desafio, ao contrário do vírus vacinal FA17DD (predomínio de IgG2a/ perfil Th1). Os resultados apresentados pelos animais sobreviventes ao desafio no ensaio IV, em contrapartida, demonstram um nítido incremento do subtipo IgG2a, inclusive nos animais imunizados com as formulações experimentais, validando a associação de proteção com altos títulos de IgG2a (Dowd e Pierson, 2011). A dosagem de anticorpos neutralizantes por PRNT₅₀ no tempo pós-desafio também demonstra incremento de título após o efeito “booster” promovido pelo vírus. Resultados prévios avaliando os subtipos de IgG induzidos por formulações baseadas em hidróxido de alumínio (Pereira *et al*, 2015) e addavax (Fox *et al*, 2013) também apresentaram caráter mais Th2, com prevalência de IgG1.

Conforme já discutido anteriormente, a vacina de febre amarela atenuada tem sido amplamente estudada como modelo de vacina bem-sucedida, pela eficácia após a aplicação em dose única e indução de resposta protetora de longa duração

(Pulendran, 2009). Essa eficiente resposta protetora, além de ser baseada na produção de altos níveis de anticorpos neutralizantes, conta com uma importante contribuição de respostas celulares TCD4⁺ e TCD8⁺ e com a produção precoce de interferon gama, tanto em modelos animais (camundongos e macacos) (Neves *et al*, 2010 e 2013), como em pessoas vacinadas (Querec *et al*, 2009). Devido a experiência do grupo e a disponibilidade de metodologias padronizadas e validadas, optamos por realizar a avaliação de nossas formulações experimentais utilizando o modelo de desafio letal por via intracerebral (Pereira *et al*, 2015; Tottey *et al*, 2018). Este modelo, apesar de utilizar uma via de infecção artificial e diversa das vias naturais, permite a utilização de camundongos com sistema imune intacto, e a avaliação da contribuição das respostas celulares e humoral para a proteção. Além disso, essa abordagem se mostrou altamente reprodutível nos diferentes ensaios realizados, com taxas de sobrevivência reproduzidas para os grupos controle negativo e positivo (0 e 100, respectivamente), bem como cinética de infecção pós desafio nos animais não protegidos (início dos sintomas entre 7 e 10 dias pós desafio e definição de prognóstico de morte ou sobrevivência até o 13^o dia, em média).

Diferentes trabalhos publicados na literatura demonstram a participação de uma resposta de células T CD8⁺ ampla e polifuncional, com desenvolvimento de memória de longa duração para proteção induzida pela vacina de febre amarela em humanos (Mueller *et al*, 2008; Akondy *et al*, 2009; Blom *et al*, 2013). A importância de respostas T CD8⁺ para o controle de infecções virais é amplamente documentada, sendo inclusive uma das principais vantagens oferecidas pelo uso de vetores virais como estratégias de desenvolvimento de vacinas recombinantes (Ewer *et al*, 2016). Dentre os mecanismos desempenhados pelos linfócitos T CD8⁺, sua ação efetora mediante a liberação de IFN γ pode controlar a replicação viral (Neves *et al*, 2013; Bassi *et al*, 2015). No estudo de Bassi e colaboradores (2015) acerca das contribuições dos diferentes mecanismos de resposta imune no modelo de desafio letal em camundongos, a proteção em camundongos “knockout” para células B era mediada quase exclusivamente por células T CD8⁺. Na presença de resposta humoral, entretanto, células T CD8⁺ assumiam uma participação redundante na sobrevivência dos camundongos imunizados. Em nosso trabalho, realizamos a dosagem das citocinas IFN γ , IL-2 e IL-4 para caracterização da resposta local nos tempos pré (linfonodos drenantes dos animais imunizados) e pós-desafio (cérebros dos sobreviventes). Acredita-se que a produção dessas citocinas no sistema nervoso central seja decorrente da entrada de células do sistema imune da periferia a partir da

perda da integridade da membrana hematoencefálica (Liu & Chambers, 2001). As citocinas $\text{IFN}\gamma$ e IL-2 apresentam caráter pró-inflamatório, sendo associadas a respostas do tipo Th1; ao passo que a IL-4 possui perfil imunomodulador, sendo associadas a respostas do tipo Th2. Nossos dados demonstram um nítido incremento de $\text{IFN}\gamma$ em relação às demais citocinas (IL-2 e IL-4) no cérebro dos animais sobreviventes, corroborando a contribuição dessa citocina para o controle da infecção viral e proteção (Bassi *et al*; 2015; Lam *et al*, 2018). A produção de IL-4 aparentemente também apresentou um aumento nos sobreviventes imunizados com as diferentes formulações, porém em níveis discretos em relação a produção de $\text{IFN}\gamma$. A expressão de citocinas com perfil Th2 (IL-4 e IL-10) pode contribuir para a regulação da resposta inflamatória dirigida pelo $\text{IFN}\gamma$, prevenindo injúrias imunomediadas pela continuidade do ambiente proinflamatório (Liu & Chambers, 2001). De maneira geral, as três melhores formulações avaliadas (FA17DD Inativ/ $\text{Al}(\text{OH})_3$; FA17DD Inativ/ Addavax e FA17DD atenuada) apresentaram respostas polarizadas do tipo Th1 (relação Th1/Th2 estimada pela proporção $\text{IFN}\gamma$ / IL-4) após o desafio. A fim de identificar quais os tipos celulares responsáveis pela produção destas citocinas, ensaios de citometria estão sendo conduzidos para indicar o perfil celular associado.

Células B “naive” são geralmente ativadas a partir da apresentação de antígenos por linfócitos T CD4^+ e proliferam na zona medular nos linfonodos ou baço. Uma vez ativadas, as células B podem (i) permanecer na zona medular e diferenciar-se em células efectoras secretando anticorpos contra o antígeno (plasmócitos ativados de curta duração), ou podem (ii) migrar para os folículos de células B, onde com o auxílio de células T CD4^+ , iniciarão uma reação de centro germinativo para o desenvolvimento de células B de memória de longa duração. Os centros germinativos são áreas especializadas nos folículos, onde ocorrem recombinação para troca de classe, aumento da avidéz e maturação da afinidade das imunoglobulinas (De Silva & Klein, 2005; Bergmann *et al*, 2013). Os plasmócitos são células efectoras terminalmente diferenciadas, portanto não se dividem. Eles migram entre o baço e a medula óssea e são a principal fonte de anticorpos. Já as células B de memória possuem receptores BCR de alta afinidade e podem persistir por muitas décadas após a vacinação, sendo capazes de responder mais rapidamente num segundo encontro com o antígeno (resposta anamnésica) (De Silva & Klein, 2005; Shapiro-Shelef & Calame, 2005). Em nossos ensaios, apenas os dados de células B de memória estão disponíveis para avaliação da resposta local (linfonodos drenantes) no tempo pré-

desafio, devido a disponibilidade limitada de células nos linfonodos. Neste tempo de coleta, há uma maior produção de células B de memória pela formulação FA17DD inativado/ Addavax, seguida da formulação FA17DD Inativado/ Al(OH)₃ e por último pela vacina atenuada FA17DD (Figura 4.24 A). Entretanto, devido as diferenças de intervalo entre o último estímulo e a coleta das células para as diferentes formulações (42 dias para vacina atenuada vs. 14 dias para as formulações experimentais), pode se tratar de um viés de desenho experimental apenas. Na avaliação da resposta local no tempo pós-desafio, entretanto, é possível visualizar a mesma hierarquia de magnitude de células B de memória (FA17DD inativado/ Addavax > FA17DD Inativado/ Al(OH)₃ > FA17DD atenuada), a partir do intervalo de desafio normalizado entre os diferentes grupos (21 dias após o desafio). Quanto a dosagem de plasmócitos ativados, as vacinas FA17DD Inativada / Al(OH)₃ e FA17DD atenuada apresentaram maior nº de clones secretores (305 e 298 spots/ 10⁶ células, respectivamente) em comparação com a formulação baseada em Addavax (178 spots/ 10⁶ células) (Figura 4.24 B). A avaliação da resposta sistêmica em nosso estudo, por sua vez, não foi capaz de detectar incremento de resposta seja de plasmócitos ativados ou células B de memória no diferentes órgãos avaliados (baço e medula óssea) nos tempos pré e pós-desafio (Figura 4.25). É possível que essa análise não tenha revelado diferenças devido às limitações do modelo de desafio realizado (via intracerebral). Como o cérebro é um órgão imunoprivilegiado (Iwasaki, 2017), análises de respostas sistêmicas podem não refletir a mobilização celular para confecção da resposta imune nesses tecidos de mais difícil acesso.

Cabe ressaltar que no grupo imunizado com a formulação de vírus FA17DD inativado/ Addavax capaz de induzir 100 % de proteção (nível comparável a vacina atenuada), parte dos animais sobreviventes ao desafio (25 %) apresentaram alguns sintomas motores. Essa observação foi realizada em grau ainda mais acentuado (20 % de paráliticos e 80 % de sintomáticos) nos animais sobreviventes do grupo imunizado com a formulação FA17DD inativado/Al(OH)₃. Os animais imunizados com a vacina atenuada, entretanto, apresentam-se assintomáticos durante os 21 dias de acompanhamento, demonstrando a superioridade da vacina viva sobre as formulações experimentais avaliadas. A fim de especular se os níveis de anticorpos neutralizantes induzidos poderiam ser associados com esses prognósticos, analisamos os títulos de PRNT₅₀ dos animais sobreviventes pareados com as observações clínicas de cada animal nos diferentes grupos; contudo não foi visualizada correlação entre os dados.

5.5 Comparação dos adjuvantes

Adjuvantes de diferentes naturezas foram avaliados ao longo do estudo. O hidróxido de alumínio, amplamente utilizados em formulações licenciadas para uso humano, se mostrou capaz de induzir altos títulos de IgG para os diferentes antígenos avaliados (E YF (BL21), E-1T, E ecto YF (Sf9/ baculovírus) e vírus FA17DD inativado). A formulação de hidróxido de alumínio com o vírus FA17DD inativado se destacou frente às demais com o segundo melhor percentual de proteção (70 %) após o desafio intracerebral. A caracterização das respostas obtidas revelou uma polarização Th2 com predominância de anticorpos do tipo IgG1 no tempo pré-desafio. Respostas do tipo Th2 têm sido atribuídas a formulações com hidróxido de alumínio (Del Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018). Seu mecanismo de ação, conforme já descrito, é multifatorial. Envolve efeitos físicos por seu tamanho, massa e composição em se tratando de um agregado insolúvel, que estimula o influxo de células do sistema imune para sua fagocitose. Paralelamente, ocorre um efeito imunológico, com estimulação da inflamação local através de várias vias de sinalização inatas com regulação positiva de citocinas e quimiocinas, gerando um ambiente imunocompetente local no músculo (Brito & O'Hagan, 2014). Embora seja capaz de promover incremento de fagocitose de antígenos por células apresentadoras, sais de alumínio não são capazes de ativar células dendríticas diretamente. A ativação de células apresentadoras de antígeno é mediada indiretamente pela inflamação local, demonstrando porque esses compostos não são fortes indutores de respostas celulares (Del Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018).

Pelos mecanismos de ação elucidados e segurança amplamente comprovada, sais de alumínio têm sido utilizados como plataformas para o desenvolvimento de novos adjuvantes a partir da combinação com diversos agonistas de TLR, de maneira a obter respostas balanceadas para diferentes patógenos. O sistema adjuvante AS04 (hidróxido de alumínio com agonista de TLR4, MPLA) desenvolvido pela GSK já está licenciado para uso clínico nas vacinas para HPV e HBV (Brito & O'Hagan, 2014). Essas combinações oferecem como vantagem, além de uma resposta sinérgica com as propriedades dos dois adjuvantes, uma maior segurança pelo efeito de depósito proporcionado pelo hidróxido de alumínio, restringindo a inflamação ao sítio de administração. Seguindo essa abordagem, em nosso estudo avaliamos a formulação de hidróxido de alumínio com flagelina FliC (agonista de TLR5) usando o vírus FA17DD inativado. A flagelina tem sido descrita como potente indutora de anticorpos

e respostas balanceadas Th1/ Th2 (Apostólico *et al*, 2016). Vacinas de subunidade para Influenza baseadas em hemaglutinina e proteína de matriz fusionadas com flagelina já foram avaliadas em ensaios clínicos e demonstraram segurança e imunogenicidade (Taylor *et al*, 2012; Hajam *et al*, 2017). Em nosso estudo, entretanto, a formulação de vírus FA17DD inativado com Al(OH)₃ e flagelina FliC, aplicada em esquema de 2 doses, foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes e IgG total para febre amarela, contudo falhou em induzir proteção frente ao desafio (apenas 25 % de sobrevivência).

Outra abordagem de adjuvante avaliada em nosso estudo foi a entrega de antígenos com lipossomas catiônicos, representada pelo adjuvante CAF01 avaliado com a proteína E-1T produzida em plataforma vegetal. A escolha de avaliação desse adjuvante junto a um antígeno de subunidade foi realizada visando a compatibilidade de tamanho entre a partícula carreadora e o antígeno solúvel. O CAF01, descrito como eficiente sistema de entrega de antígenos para células apresentadoras, foi originalmente desenvolvido para candidatos vacinais contra tuberculose por sua capacidade de estimular as respostas celulares essenciais para proteção nesse modelo (Christensen *et al*, 2009). Sua segurança e imunogenicidade já foram avaliadas em ensaios clínicos em formulações candidatas para tuberculose (Van Dissel *et al*, 2014). Uma abordagem similar de associação de lipossomas com substâncias imunomoduladoras já foi licenciada em formulação para malária desenvolvida pela GSK (vacina Mosquirix contendo o sistema adjuvante AS01) e apresentou resultados promissores em testes clínicos de uma vacina para herpes zoster (revisão em Del Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018). Nossa formulação de proteína E-1T com o adjuvante CAF01 não foi capaz de induzir nenhuma proteção nos animais imunizados. A análise da resposta humoral por PRNT₅₀ e ELISA também não demonstrou a produção de anticorpos. É possível que este adjuvante seja mais adequado para o desenvolvimento de respostas celulares, não sendo o mais indicado no modelo de febre amarela, cujo correlato de proteção é baseado na presença de anticorpos neutralizantes. Entretanto, apesar da grande estabilidade relatada para lipossomos, é indicado que a formulação do CAF01 com o antígeno seja preparada imediatamente antes de sua administração (Brito & O'Hagan, 2014). Como em nosso ensaio as formulações foram preparadas “overnight” a 4°C, seria interessante a realização de um novo ensaio seguindo esta recomendação para verificar sua capacidade adjuvante no modelo de febre amarela. Além disso, explorar outras possibilidades de utilização (vias, doses e intervalos entre dose) também seria

interessante para verificar melhor avaliar sua capacidade adjuvante no modelo de febre amarela.

Finalmente, a última classe de adjuvantes explorada em nosso estudo foi a de emulsões, representada pelas formulações com Addavax. Conforme já descrito anteriormente, esta emulsão óleo-em-água é baseada em esqualeno, substância presente no análogo MF59 desenvolvido pela Novartis e licenciado para uso humano junto a vacinas de influenza. Esta emulsão baseada em esqualeno possui potente ação adjuvante capaz de induzir respostas celulares e humorais, incluindo altos títulos de anticorpos funcionais (Apostólico *et al*, 2016). Estudos acerca de seu mecanismo de ação apontam para o estabelecimento de um ambiente imunocompetente no sítio de injeção, promovendo o recrutamento de células do sistema imune, incluindo células apresentadoras de antígenos, favorecendo a fagocitose de antígenos e seu transporte para os linfonodos drenantes para montagem das respostas imunes (O'Hagan *et al*, 2012; Cioncada *et al*, 2017). Assim como para o hidróxido de alumínio, seu mecanismo de ação não é dependente de ativação via receptores do tipo Toll (TLR) e o seu desenvolvimento foi empírico, sem sólidos conhecimentos acerca dos mecanismos imunoestimulatórios envolvidos (Del Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018). Um estudo de 2012 de O'Hagan e colaboradores comparando os mecanismos de ação dos adjuvantes hidróxido de alumínio e MF59 demonstrou que esta emulsão é capaz de estimular sinais locais mais potentes no músculo, particularmente para recrutamento de células, além de atuar sobre diferentes populações celulares. A fim de comparar os mecanismos envolvidos na geração dos anticorpos de alta avidéz e células B de memória, Lofano e colaboradores (2015) demonstraram uma maior formação de centros germinativos de células B nos linfonodos drenantes e maior frequência de linfócitos T foliculares induzidos pelo MF59 em comparação com o adjuvante hidróxido de alumínio. Em termos de magnitude de resposta inflamatória, o MF59 é mais potente que sais de alumínio em estimular positivamente genes associados a resposta inata como *IL-1b*, *caspase-1* e *Ccr2* (Del Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018). Outros mecanismos como a liberação de ATP extracelular (sinal de perigo endógeno capaz de ativar vias de resposta inata) também foram descritos para este adjuvante. Em resumo, apesar de não ser capaz de ativar diretamente células dendríticas *in vitro*, o MF59 promove um ambiente imunoestimulatórios local pela expressão de diversas citocinas que, indiretamente, ativam células dendríticas através de mecanismos independentes de TLR (Del Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018). Em nosso estudo, a formulação de addavax com o antígeno particulado

FA17DD inativado se destacou com imunogenicidade (altos títulos de anticorpos) e proteção comparáveis a vacina atenuada. Apesar de sua ação balanceada com indução de potente resposta celular e humoral, em nosso estudo essa formulação apresentou perfil dominante Th2. Visando a balancear as respostas imunológicas obtidas para obter melhor desempenho com esta formulação, associações com agonistas de TLR que favoreçam o desenvolvimento de respostas Th1 podem ser exploradas em experimentos futuros.

5.6 Influência do antígeno no desempenho da formulação

Dentre os antígenos candidatos avaliados ao longo o nosso estudo, as formulações baseadas nos adjuvantes hidróxido de alumínio e Addavax apresentaram os melhores desempenhos. Entretanto, a eficácia da formulação foi influenciada pela natureza do antígeno em questão. Vários trabalhos têm investigado a contribuição de diferentes epítomos na proteína E para a obtenção de respostas protetoras específicas (Vratskikh *et al*, 2013). A proteína E, antígeno imunodominante na partícula viral de febre amarela, possui 3 domínios: DI, DII e DIII. O DIII é descrito como o principal alvo de anticorpos neutralizantes; enquanto o DII, por apresentar o peptídeo de fusão (sequência altamente conservada entre os diferentes flavivírus), é descrito como alvo de anticorpos amplamente neutralizantes, menos específicos e de menor avidéz (Pierson *et al*, 2008). Estudos acerca da estrutura molecular antigênica de flavivírus demonstraram a existência de diferentes alvos para os anticorpos neutralizantes gerados: domínios específicos da proteína E, domínios sobrepostos, subunidades sobrepostas e epítomos quaternários complexos (Heinz & Stiasny, 2012). Em 2013, Vratskikh e colaboradores realizaram ensaios de depleção de anticorpos a fim de esclarecer a contribuição dos anticorpos gerados contra diferentes alvos para a proteção. Os resultados demonstraram que grande proporção dos anticorpos neutralizantes gerados eram direcionados para epítomos complexos (estruturas quaternárias formadas por sobreposição de subunidades) dispostas na superfície viral, em detrimento de epítomos presentes em proteínas monoméricas. Sendo assim, a partícula viral inativada potencialmente é um melhor antígeno alvo para anticorpos neutralizantes que estratégias baseadas em subunidade como a proteína E monomérica. De maneira geral, nossos resultados corroboram com esses achados, uma vez que as formulações baseadas no vírus inativado foram mais imunogênicas (indução de anticorpos neutralizantes e IgG total contra febre amarela) e induziram

percentuais de proteção superiores do as formulações baseadas na proteína E expressa em *E. coli*.

Nossos resultados demonstraram sucesso na utilização do adjuvante Addavax junto ao vírus inativado (antígeno particulado) para incremento de proteção e redução de número de doses (100 % proteção após a administração em esquema de 2 doses de FA17D inativado/ Addavax, contra apenas 70 % de proteção induzida pela formulação FA17DD inativado/ Al(OH)₃ em esquema de 3 doses). Entretanto, tal característica não foi reproduzida utilizando as formulações baseadas nos antígenos expressos nas plataformas vegetal (E-1T) e procariota (E YF BL21), podendo sugerir a ineficiência do adjuvante Addavax em conferir incremento de resposta a antígenos solúveis. Um estudo recente de Younis e colaboradores (2018) visando estabelecer uma estratégia de seleção de adjuvantes também evidenciou a influência do antígeno sobre o desempenho das formulações de adjuvantes testadas. O MF59 (análogo ao Addavax) está presente na formulação de vacinas já licenciadas para uso humano como a vacina de influenza sazonal e pandêmica (Fluad e Pandemrix). Sua eficácia junto a formulações baseadas em vírus inativados, portanto, já foi comprovada.

5.7 Considerações gerais

A vacinologia de sistemas tem investigado os mecanismos envolvidos na potencialização de respostas protetoras em adultos, crianças e idosos. Esse conhecimento pode prevenir possíveis riscos de segurança associados ao uso de adjuvantes, bem como permitir melhor predição de sua eficácia. Nesse contexto, o estabelecimento de correlatos associados à segurança e eficácia são de fundamental importância (Del Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018).

Cabe ressaltar que a maioria dos estudos acerca dos mecanismos de ação de adjuvantes foram realizados em modelo murino. Apesar dessa escolha ser compreensível devido a facilidade de acesso aos órgãos linfoides, permitindo elucidar as diferentes facetas da resposta imunológica; os resultados obtidos devem ser confirmados e validados em humanos. A distribuição de TLRs em células dendríticas de camundongos e de humanos pode apresentar diferenças significativas, impactando no sucesso das formulações avaliadas nas diferentes espécies (Kastenmueller *et al*, 2014). Ainda como exemplo, formulações de MF59 são relatadas com indutoras de potentes respostas do tipo Th2 em modelo murino, o que não é observado em humanos de nenhuma faixa etária, nos quais prevalecem os perfis Th0/ Th1 (Del

Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018). A compreensão das respostas imunes efetoras desencadeadas tanto nos sítios de imunização (linfonodos drenantes), como nos locais onde a proteção é esperada (pele e mucosa, por exemplo) é de fundamental importância, a fim de garantir que as respostas sistêmicas inferidas no sangue demonstrem uma representação adequada das respostas imunes induzida pelas formulações candidatas. Essa ainda é uma importante limitação a ser superada na avaliação de respostas protetoras em humanos nos quais o acesso a diferentes espécimes clínicos é restrito e, indiretamente, torna indispensável a avaliação preliminar e caracterização das respostas imunológicas em modelos animais, mesmo frente às diferenças entre espécies já exemplificadas (Del Giudice, Rappuoli & Didierlaurent, 2018).

Além da utilização de diferentes combinações de adjuvantes para incremento de respostas desejadas e obtenção de proteção com candidatos vacinais em desenvolvimento, outras estratégias como a exploração de diferentes vias de imunização e intervalos entre doses podem ser avaliados a fim de obter incremento de imunogenicidade e, até mesmo, redução de dose (Dacoba *et al*, 2017; Herzog, 2014). Em nosso trabalho escolhemos a via intramuscular por ser classicamente empregada na vacinação humana, sendo passível de utilização para os diferentes adjuvantes avaliados e volume de dose escolhido. Entretanto, trabalhos na literatura tem relatado a via intradérmica como ideal para estimulação de respostas imunológicas pela presença de células apresentadoras de antígenos em maior variedade e número, quando comparada a via intramuscular (Hickling *et al*, 2011). Para a exploração dessa via, vários instrumentos têm sido desenvolvidos a fim de padronizar a dose inoculada e promover maior estimulação local e recrutamento de células do sistema imune. A utilização de vias alternativas como a mucosa pode ainda trazer vantagens como mimetizar a via natural de infecção, induzir respostas locais no sítio de infecção e aumentar a adesão vacinal (usando aplicação livre de agulhas e menor número de doses) (Lycke, 2012).

Trabalhos recentes (Younis *et al*, 2018) tem buscado fornecer conhecimentos sobre combinações de antígenos modelos com adjuvantes a fim de nortear escolhas de formulações adequadas para indução das respostas imunológicas desejadas. Em nosso trabalho visamos o mesmo objetivo, utilizando a plataforma de febre amarela como modelo. Frente a disponibilidade de modelo murino de desafio bem estabelecido e reprodutível, bem como de testes celulares e sorológicos para caracterização das respostas imunológicas desenvolvidas; é possível avaliar novos candidatos vacinais

para febre amarela, como também extrapolar os conhecimentos obtidos para outras vacinas em desenvolvimento.

6. Conclusões

- As proteínas recombinantes E e NS1 do vírus da febre amarela foram expressas e purificadas no sistema em procarioto (*E. coli*), com rendimento suficiente para sua avaliação nos ensaios de imunogenicidade e proteção em camundongos.
- A proteína NS1 se mostrou pouco imunogênica e sua avaliação como antígeno modelo foi descontinuada.
- A proteína E YF (BL21), apesar da baixa imunogenicidade, foi passível de utilização como antígeno modelo de subunidade para a avaliação de formulações de adjuvantes alcançando 22 a 33 % de proteção.
- A expressão das proteínas recombinante E e NS1 também foi realizada com sucesso no sistema eucarioto Baculovírus/ células de inseto. Entretanto, apenas a proteína E ecto YF (Sf9) foi recuperada com rendimento suficiente para uma avaliação preliminar de imunogenicidade e proteção em formulação com o adjuvante hidróxido de alumínio.
- Os resultados iniciais com a proteína E ecto YF como antígeno modelo não foram satisfatórios em termos de rendimento e proteção, contudo inúmeras alternativas podem ser exploradas a fim de obter um antígeno com melhor qualidade nesta plataforma de expressão.
- O vírus FA17DD inativado apresentou o melhor desempenho como antígeno modelo para avaliação das novas formulações adjuvantes.
- O vírus FA17DD inativado formulado com o adjuvante hidróxido de alumínio e aplicado em esquema de três doses conferiu proteção em torno de 67-70 %.
- O vírus FA17DD inativado formulado com o adjuvante Addavax foi capaz de induzir proteção de 100 % após aplicação em duas doses, contra 25 % (2 doses) e \pm 70 % (3 doses) de proteção induzida pelas formulações do mesmo antígeno baseadas em hidróxido de alumínio.

- Os resultados preliminares com o adjuvante Addavax baseado em esqualeno demonstram seu potencial em gerar incremento de proteção, redução de concentração e número de doses, características essas a serem exploradas em estudos futuros de dose resposta.

- Nossos resultados comprovam a aplicabilidade do modelo de desafio intracerebral em camundongos como ferramenta essencial para avaliação de novas formulações experimentais para febre amarela, já que esse demonstrou excelente reprodutibilidade nos diferentes ensaios realizados em animais.

- A avaliação das respostas imune humorais induzidas para as diferentes formulações experimentais realizada através de ensaios de PRNT₅₀ e ELISA contra o vírus também apresentou resultados consistentes nos diferentes ensaios.

- A dosagem de anticorpos neutralizantes não foi capaz de ser correlacionada com as taxas de proteção obtidas, sugerindo a contribuição de respostas celulares para proteção no modelo de desafio utilizado.

- A avaliação do balanço de subtipos de IgG induzidos pelas diferentes formulações apresentou boa correlação com os dados de neutralização, demonstrando o seu potencial uso como ferramenta adicional de avaliação de novas formulações experimentais para febre amarela.

- A avaliação das respostas celulares pela dosagem de citocinas por ELISpot permitiu a associação da presença de IFN γ com proteção no modelo de desafio utilizado, conforme já descrito na literatura. Entretanto, a caracterização dos fenótipos celulares por citometria deve ser realizada para melhor definição de outros correlatos de proteção no modelo de febre amarela, gerando novas ferramentas de avaliação de formulações candidatas em desenvolvimento.

- A avaliação da resposta imune local (linfonodos drenantes e cérebro) contribuiu para uma melhor comparação das respostas imunológicas protetoras induzidas pelas diferentes formulações.

- A avaliação da duração da resposta imune humoral (por PRNT₅₀ e ELISA) induzida pelas melhores formulações vacinais selecionadas (FA17DD inativado/ Al (OH)₃ e FA17DD inativado/ Addavax) em comparação com a vacinas atenuada FA17DD ao longo de 3 meses não permitiu detectar diferenças entre as formulações.
- Os animais imunizados com a formulação FA17DD inativado/ Addavax (2 doses) mantiveram os mesmos limiares de anticorpos ao longo do tempo que os imunizados com a formulação FA17DD inativado/ Al (OH)₃ (3 doses) e a vacina atenuada FA17DD (1 dose).
- De maneira geral, nossa proposta de utilização da plataforma de febre amarela (modelo de desafio e ensaios *in vitro*) para avaliação de novas formulações adjuvantes foi bem-sucedida tanto para a identificação de formulações experimentais promissoras nesse modelo, bem como para a aquisição de conhecimentos extrapoláveis para o desenvolvimento de candidatos vacinais para outros alvos.

7. Bibliografia

- Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H *et al.* The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8⁺ T cell response. *J Immunol* (2009);183(12):7919-30. doi: 10.4049/jimmunol.0803903.

- Almeida MA, Cardoso JC, Dos Santos E, da Fonseca DF, Cruz LL, Faraco FJ, *et al.* Surveillance for yellow fever virus in non-human primates in southern Brazil, 2001–2011: A tool for prioritizing human populations for vaccination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, e2741. doi: 10.1371/journal.pntd.0002741. eCollection 2014 Mar.

- Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, *et al.* Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of native protein. *Journal of Virological Methods* 167 (2010), (2): 186-192. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.04.003.

- Apostólico JS, Lunardelli VAS, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, *Modus Operandi*, and Licensing. *J Immunol Res.* 2016; 2016:1459394. doi: 10.1155/2016/1459394. Epub 2016 May 4. Review.

- Bargieri DY, Soares IS, Costa FT, Braga CJ, Ferreira LC, Rodrigues MM. Malaria Vaccine Development: Are Bacterial Flagellin Fusion Proteins the Bridge between Mouse and Humans? *J Parasitol Res.* 2011; 2011: 965369. doi: 10.1155/2011/965369. Epub 2011 Mar 14

- Barrett ADT. Yellow Fever Vaccines. *Biologicals* (1997), 25: 17–25.

- Barrett AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol.* 2007; 52: 209-29.

- Barrett AD, Teuwen DE. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol.* 2009 Jun; 21 (3): 308-13.

- Barrett ADT. The reemergence of yellow fever. *Science*. 2018 Aug 31; 361 (6405): 847-848. doi: 10.1126/science.aau8225. Epub 2018 Aug 23.

- Bassi MR, Kongsgaard M, Steffensen MA, Fenger C, Rasmussen M, Skjødt K, *et al*. CD8+ T cells complement antibodies in protecting against yellow fever virus. *J Immunol*. 2015 Feb 1; 194 (3): 1141-53. doi: 10.4049/jimmunol.1402605. Epub 2014 Dec 24.

- Bastola R, Noh G, Keum T, Bashyal S, Seo J, Choi J, *et al*. Vaccine adjuvants: smart components to boost the immune system. *Arch. Pharm. Res.* (2017) 40:1238–1248 DOI 10.1007/s12272-017-0969-z

- Beasley DW, Barrett AD. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J Virol* 2002; 76: 13097-13100.

- Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2013) 40: 257–274. doi 10.1007/s10295-013-1235-0

- Beck AS, Barrett ADT. Current Status and Future Prospects of Yellow Fever Vaccines *Expert Rev Vaccines*. 2015; 14 (11): 1479–1492. doi:10.1586/14760584.2015.1083430.

- Bertholet S, Ireton GC, Ordway DJ, Windish HP, Pine SO, Kahn M, *et al*. A defined tuberculosis vaccine candidate boosts BCG and protects against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med* (2010) 2: 53ra74. doi:10.1126/scitranslmed.3001094.

- Blom K, Braun M, Ivarsson MA, Gonzalez VD, Falconer K, Moll M, *et al*. Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector-to a memory-type response. *The Journal of Immunology* (2013): 1202234.

- Brito LA, O'Hagan DT. Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 563–579.

- Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G *et al.* Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccin Immunother.* 2016; 12 (2): 491-502. doi: 10.1080/21645515.2015.1082693.
- Chaterji S, Allen JC Jr, Chow A, Leo YS, Ooi EE. Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84 (2): 224-8.
- Chen, LH; Hamer, DH. Vaccination strategies during shortages of yellow fever vaccine Reply. *JAMA* 2018, 319, 1280–1281.
- Chichester JA, Yusibov V. Plants as alternative systems for production of vaccines. *Hum Vaccin.* 2007 Jul-Aug; 3 (4): 146-8.
- Christensen D, Agger EM, Andreasen LV, Kirby D, Andersen P, Perrie Y. Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): Past, present and future. *Journal of Liposome Research.* 2009; 19 (1): 2-11.
- Cioncada R, Maddaluno M, Vo HTM, Woodruff M, Tavarini S, Sammicheli, C, *et al* (2017). Vaccine adjuvant MF59 promotes the intranodal differentiation of antigen-loaded and activated monocyte-derived dendritic cells. *PloS one*, 12 (10), e0185843.
- Cluff CW. Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti- cancer vaccines: clinical results. *Adv Exp Med Biol* (2010) **667**: 111– 23. doi:10.1007/978-1-4419-1603-7_10.
- Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity.* 2010 October 29; 33 (4): 492–503. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002.
- Coler RN, Bertholet S, Moutaftsi M, Guderian JA, Windish HP, *et al.* Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PLoS One* 6 (2011) e16333.

- Costa-Pereira C, Campi-Azevedo AC, Coelho-Dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Araújo MSS, do Vale Antonelli LR, *et al.* Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after 17DD-YF primary vaccination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Jun 7;12 (6): e0006462. doi: 10.1371/journal.pntd.0006462. eCollection 2018 Jun.

- Dacoba TG, Olivera A, Torres D, Crecente-Campo J, Alonso MJ. Modulating the immune system through nanotechnology. In *Seminars in immunology* 2017, December, (34): 78-102. Academic Press.

- Das D, Mongkolaungkoon S, Suresh MR. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* 66 (2009) 66-72. doi: 10.1016/j.pep.2009.02.003.

- De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur. J. Immunol.* 2008. 38: 2068–2071. DOI 10.1002/eji.200838648.

- De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol.* 2013 Jul 31; 4: 214. doi: 10.3389/fimmu.2013.00214. eCollection 2013.

- Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Seminars in Immunology* 39 (2018): 14-21.

- Desprès P; Girard M; Bouloy M. Characterization of yellow fever virus protein E and NS1 expressed in Vero and *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of General Virology* (1991) (72): 1331-1342.

- Desprès P, Dietrich J, Girard M, Bouloy M. Recombinant baculoviruses expressing yellow fever virus E and NS1 proteins elicit protective immunity in mice. *Journal of general virology* (1991), 72 (11): 2811-2816.

- De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol.* 2015 Mar;15 (3): 137-48. doi: 10.1038/nri3804. Epub 2015 Feb 6.

- Dickens F. Carcinogenic Lactones and Related Substances. *Br Med Bull.* 1964 May; 20: 96-101.

- Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, *et al.* AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* (2009) **183**: 6186–97. doi:10.4049/jimmunol.0901474

- Dowd KA, Pierson TC. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology* (2011) 411: 306–315.

- Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, Spencer AJ, Hill, AV, Dorrell L. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. *Current opinion in immunology* (2016), (41): 47-54.

- Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*. 2018 Aug 31; 361 (6405): 894-899. doi: 10.1126/science.aat7115. Epub 2018 Aug 23.

- Fox CB, Barnes VL, Evers T, Chesko JD, Vedvick TS, Coler RN, *et al.* Adjuvanted pandemic influenza vaccine: variation of emulsion components affects stability, antigen structure and vaccine efficacy. *Influenza and other respiratory viruses* (2013). 7 (5), 815-826.

- Simões M, Camacho LA, Yamamura AM, Miranda EH, Cajaraville AC, da Silva Freire M.. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals* (2012) Nov; 40 (6): 399-404.

- Futatsumori-Sugai M, Tsumoto K. Signal peptide design for improving recombinant protein secretion in the baculovirus expression vector system. *Biochemical and biophysical research communications* 2010, 391 (1): 931-935.

- Galler R, Pugachev KV, Santos CL, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, *et al.* Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology*. 2001 Nov 25; 290 (2): 309-19.

- Gaspar LP, Mendes YS, Yamamura AM, Almeida LF, Caride E, Gonçalves RB, *et al.* Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: implications for vaccine development. *J Virol Methods.* 2008 Jun; 150 (1-2): 57-62.

- Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, *et al.* Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* (2008) 205: 3119-3131.

- Germann T, Bongartz M, Dlugonska H, Hess H, Schmitt E, Kolbe L, *et al.* Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo. *Eur J Immunol.* 1995 Mar; 25 (3): 823-9.

- Gómez MM, Abreu FVS, Santos AACD, Mello IS, Santos MP, Ribeiro IP *et al.* Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016-2017 Brazilian outbreak. *J Gen Virol.* 2018 Apr; 99 (4): 536-548. doi: 10.1099/jgv.0.001033. Epub 2018 Feb 22.

- Gotuzzo E, Yactayo S, Cordova E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: Systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am J Trop Med Hyg* 2013, (89): 434-444.

- Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, Jaume JC, Lee JH. Bacterial flagellin— a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med.* 2017 Sep 1; 49 (9): e373. doi: 10.1038/emm.2017.172. Review.

- Han M, Su T, Zu YG, An ZG. Research advances on transgenic plant vaccines. *Acta genetica Sinica.* 2006 Apr; 33 (4): 285-93.

- Hawe A; Frieb W. Formulation development for hydrophobic therapeutic proteins. *Pharmaceutical development and technology* 2007, 12: 223-237. doi: 10.1080/10837450701247350.

- Hayes EB. Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Oct; 101 (10): 967-71.

- Hayes EB. Is it time for a new yellow fever vaccine? *Vaccine*. 2010 Nov 29; 28 (51): 8073-6.
- Heinz FX; Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology* 55 (2012) 289-295.
- Herzog C. Influence of parenteral administration routes and additional factors on vaccine safety and immunogenicity: a review of recent literature. *Expert Rev Vaccines*. 2014 Mar; 13 (3): 399-415. doi: 10.1586/14760584.2014.883285. Epub 2014 Feb 10.
- Hickling JK, Jones KR, Friede M, Zehrung D, Chen D, Kristensen D. Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. *Bulletin of the World Health Organization* 2011, (89): 221-226.
- Hoffman RK, Warshowsky B. Betapropiolactone vapor as a disinfectant. *Appl Microbiol*. 1958 Sep; 6 (5): 358-62.
- Hu Y. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian Cells. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005 Apr; 26 (4): 405–416. doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00078.x
- Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity, *FASEB J*. 26 (2012) 1272–1279.
- Iwasaki A. Immune Regulation of Antibody Access to Neuronal Tissues. *Trends Mol Med*. 2017 Mar; 23 (3): 227–245. doi: 10.1016/j.molmed.2017.01.004
- Ishikawa T, Wang G, Widman DG, Infante E, Winkelmann ER, Bourne N, *et al*. Enhancing the utility of a prM/E-expressing chimeric vaccine for Japanese encephalitis by addition of the JEV NS1 gene. *Vaccine* 2011; 29 (43): 7444–55.
- Kastenmüller W, Kastenmüller K, Kurts C, Seder RA. Dendritic cell-targeted vaccines- hope or hype? *Nat Rev Immunol*. 2014 Oct; 14 (10): 705-11. doi: 10.1038/nri3727. Epub 2014 Sep 5. Review.

- Ke N, Berkmen M. Production of Disulfide-Bonded Proteins in *Escherichia coli*. Current Protocols in Molecular Biology 16.1B.21-16.1B.21, October 2014. Wiley Online Library. doi: 10.1002/0471142727.mb1601bs108

- Klaus T, Kulesza M, Bzowska M, Wyroba B, Kilarski WW, Bereta J. Overcoming inefficient secretion of recombinant VEGF-C in baculovirus expression vector system by simple purification of the protein from cell lysate. Protein expression and purification 2015, (110): 151-158.

- Klitting R, Gould EA, Paupy C, Lamballerie X. What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (I) *Genes* 2018 June 8; 9(6), 291; doi: 10.3390/genes9060291

- Klitting R, Fischer C, Drexler JF, Gould EA, Roiz D, Paupy C, *et al.* What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (II) *Genes* (Basel). 2018 Aug 21;9(9). pii: E425. doi: 10.3390/genes9090425.

- Kollwe C, Vilcinskis A. Production of recombinant proteins in insect cells. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 2013, 9 (3): 255-271. doi:10.3844/ajbbbsp.2013.255.271

- Kost TA, Condeary JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nature Biotechnology 2005, May. Volume 23 Number 5. doi:10.1038/nbt1095.

- Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, Tary-Lehmann M. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISpot assays. J Immun Methods 2003, 278: 79-93.

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970 ago 15; 227 (5259): 680-5.

- Lam, LM, Watson AM, Ryman, KD, Klimstra, WB. Gamma-interferon exerts a critical early restriction on replication and dissemination of yellow fever virus vaccine strain 17D-204. NPJ vaccines, (2018); 3 (1), 5.

- Leibly DJ, Nguyen TN, Kao LT, Hewitt SN, Barrett LK, Van Voorhis WC. Stabilizing additives added during cell lysis aid in the solubilization of recombinant proteins. *Plos One* 2012. 7 (12): e52482. doi: 10.1371/journal.pone.0052482.

- Liang F, Loré K. Local innate immune responses in the vaccine adjuvant-injected muscle. *Clinical & Translational Immunology* (2016) 5, e74; doi:10.1038/cti.2016.19.

- Liang H, Lee M, Jin X. Guiding dengue vaccine development using knowlegde gained from the success of the yellow fever vaccine. *Cellular & Molecular Immunology* (2015) 13, 36-46; doi:10.138/cmi.2015.76

- Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jul 25; 12 (8): 592-605. doi: 10.1038/nri3251.

- Lofano, G., Mancini, F., Salvatore, G., Cantisani, R., Monaci, E., Carrisi, C, *et al.* Oil-in-water emulsion MF59 increases germinal center B cell differentiation and persistence in response to vaccination. *The Journal of Immunology* 2015, 1402604.

- Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact.* 2012 May 8; (11): 56. doi: 10.1186/1475-2859-11-56.

- Marchevsky RS, Freire MS, Coutinho ES, Galler R. Neurovirulence of yellow fever 17DD vaccine virus to rhesus monkeys. *Virology* 2003. 316 (1): 55-63.

- Martínez CA, Giulietti AM, Talou JR. Research advances in plant-made flavivirus antigens. *Biotechnology Advances* 2012 (30): 1493–1505.

- Martins RM, Maia MLS, Farias RH, Camacho LA, Freire MS, Galler R, *et al.* 17DD yellow fever vaccine: a double blind randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum Vaccin Immunother.* 2013; 9 (4): 879-88.

- Martins RM, Maia MLS, de Lima SMB, Noronha TG, Xavier JR, Camacho LAB, *et al.* Duration of post-vaccination immunity to yellow fever in volunteers eight years after a dose-response study. *Vaccine*. 2018; 36 (28): 4112-7.

- Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog*. 2009 Oct; 5 (10): e1000614. doi: 10.1371/journal.ppat.1000614. Epub 2009 Oct 9.

- Mett V, Farrance CE, Green BJ, Yusibov V. Plants as biofactories. *Biologicals* 2008, 36 (6), 354-358.

- Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, *et al.* Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 2008; 28 (5): 710-722.

- Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenço-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep*. 2017 Aug 7; 7 (1): 7385. doi: 10.1038/s41598-017-07873-7.

- Monath TP, Arroyo J, Levenbook I, Zhang ZX, Catalan J, Draper K, *et al.* Single mutation in the flavivirus envelope protein hinge region increases neurovirulence for mice and monkey but decreases viscerotropism for monkeys: relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines. *J Virol* 2002; 78: 1932 – 1943.

- Monath TP, Lee CK, Julander JG, Brown A, Beasley DW, Watts DM, *et al.* Inactivated yellow fever 17D vaccine: development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity. *Vaccine*. 2010 May 14; 28 (22): 3827-40.

- Monath TP, Fowler E, Johnson CT, Balser J, Morin MJ, Sisti M, Trent DW. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever. *N Engl J Med*. 2011 Apr 7; 364 (14): 1326-33.

- Monath TP, Gershman M, Staples EJ, Barrett ADT. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 6th ed. Saunders Elsevier; 2012. p. 870–96 [chapter 36].
- Monath TP. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. *Expert Rev Vaccines*. 2012 Apr; 11 (4): 427-48.
- Monath, TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *Journal of Clinical Virology* 2015, (64): 160-173.
- Moorthy VS, Okwo-Bele JM. Final results from a pivotal phase 3 malaria vaccine trial. *Lancet* 2015; 386: 5–7.
- Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhaye S, Baras B, Jacob V, *et al.* Adjuvant System AS03 containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity, *Vaccine* 2011, (29): 2461–2473.
- Musiychuk K, Stephenson N, Bi H, Farrance CE, Orozovic G, Brodelius M, *et al.* A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza and other respiratory viruses* 2007, 1 (1): 19-25.
- Muyanja E, Ssemaganda A, Ngauv P, Cubas R, Perrin H, Srinivasan D, *et al.* Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. *J Clin Invest*. 2014 Jul; 124 (7): 3147-58. doi: 10.1172/JCI75429. Epub 2014 Jun 9.
- Neves PC, Rudersdorf RA, Galler R, Bonaldo MC, de Santana MG, Mudd PA, *et al.* CD8⁺ gamma-delta TCR⁺ and CD4⁺ T cells produce IFN- γ at 5-7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine* 2010, 28 (51): 8183-8188.
- Neves PC, Santos JR, Tubarão LN, Bonaldo MC, Galler R. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. *PLoS One*. 2013 Dec 6; 8 (12): e81953. doi: 10.1371/journal.pone.0081953. eCollection 2013.

- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (1): 34–47.

- Nobel Prize of Medicine in 1951 [acesso em 05 dez 2018]. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1951/theiler/biographical/>

- Nohynek H, Jokinen J, Partinen M, Vaarala O, Kirjavainen T, Sundman J, *et al.* AS03 adjuvanted AH1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland, *PLoS One* 2012; 7 (3): e33536.

- O'Hagan DT, Ott GS, De Gregorio E, Seubert A. The mechanism of action of MF59-An innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* 2012 (30): 4341– 4348.

- O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59((R)) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes, *Expert. Rev. Vaccines* 2013 (12): 13–30.

- Pato, TP, Souza MCO, Silva AN, Pereira RC, Silva MV, Caride E, *et al.* Development of a membrane adsorber based capture step for the purification of yellow fever virus. *Vaccine* 2014, 32 (24): 2789-2793.

- Pastorino B, Baronti C, Gould EA, Charrel RN, De Lamballerie X. Effect of chemical stabilizers on the thermostability and infectivity of a representative panel of freeze-dried viruses. *PloS one* 2015, 10 (4): e0118963.

- Pereira RC, Silva AN, Souza MC, Silva MV, Neves PP, Silva AA, *et al.* An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. *Vaccine.* 2015 Aug 20; 33 (35): 4261-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.077. Epub 2015 Apr 7.

- Perez O, Paolazzi CC. Production methods for rabies vaccine. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 1997 May; 18 (5): 340-7.

- Pestana CP, Lawson-Ferreira R, Lessa-Aquino C, Leal MDLF, Freire MDS, Homma A, Medeiros MA. Sanger-based sequencing technology for yellow fever vaccine

genetic quality control. *J Virol Methods*. 2018 Oct; 260: 82-87. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.07.006. Epub 2018 Jul 26.

- Pino PA, Cardona AE. Isolation of Brain and Spinal Cord Mononuclear Cells using Percoll Gradients. Video article disponível em <http://www.jove.com/video/2348/> . [acesso em 17 jul 2018].

- Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro FP, Pissinatti A, Cunha RV, *et al*. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2018, Sep 3; 113 (10): e180278. doi: 10.1590/0074-02760180278. Review.

- Post PR, de Carvalho R, da Silva Freire M, Galler R. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil- a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2001, 96 (6): 849-857.

- Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010; 17:1055–1065.

- Plotkin SA. Increasing Complexity of Vaccine Development. *J Infect Dis*. 2015 Jul 15; 212 Suppl 1: S12-6. doi: 10.1093/infdis/jiu568.

- Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nature Reviews Immunology* 2009, (9): 741-747.

- Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, *et al*. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR 2, 7, 8 and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med*. 2006 Feb 20; 203 (2): 413-24. Epub 2006 Feb 6.

- Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, *et al*. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*. 2009 Jan; 10 (1): 116-125. doi: 10.1038/ni.1688. Epub 2008 Nov 23.

- Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal* 2016; 13; 131. doi: 10.1186/s12985-016-0590-7.

- Reed SG, Orr MT & Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med.* 2013 Dec;19 (12): 1597-608. doi: 10.1038/nm.3409. Epub 2013 Dec 5. Review.

- Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology* [Internet]. 3rd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013.

- Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. -New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001.

- Sampath A, Padmanabhan R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res.* 2009 Jan; 81 (1): 6-15.

- Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangués R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Fact.* 2016 Feb 9; 15: 33. doi: 10.1186/s12934-016-0437-3. Review.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors sequenciamento. *Prot Natl Acad Sci USA* 1977; (74): 5463-7.

- Sankar SG, Dhanajevan KJ, Paramasivan R, Thenmozhi V, Tyagi BK, Vennison SJ. High-Level Expression of functionally active Dengue-2 Non-Structural Antigen 1 production in *Escherichia coli*. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:343195. doi: 10.1155/2013/343195. Epub 2013 Sep 8.

- Schlesinger JJ, Foltzer M, Chapman S. The Fc portion of antibodies to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against yellow fever encephalitis in mice. *Virology* 1993; (192): 132-141.

- Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2005 Mar; 5 (3): 230-42.

- Shearer FM, Moyes CL, Pigott DM, Brady OJ, Marinho F, Deshpande A, *et al.* Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *Lancet Infect Dis.* 2017 Nov; 17 (11): 1209-1217. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30419-X. Epub 2017 Aug 16

- Shiu SYW, Morikawa S, Buckley A, Higgs S, Karunakarannair V, Blachere C, *et al.* 17D yellow fever vaccine virus envelope protein expressed by recombinant baculovirus is antigenically indistinguishable from authentic viral protein. *Journal of General Virology* 1991, 72 (Pt 6): 1451-1454.

- Silva Junior HC, Pestana, CP, Galler R, Medeiros MA. Solubility as a limiting factor for expression of hepatitis A virus proteins in insect cell-baculovirus system. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2016. 111 (8): 535-538.

- Simões M, Camacho LA, Yamamura AM, Miranda EH, Cajaraville AC, da Silva Freire M. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals.* 2012 Nov; 40 (6): 399-404. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.09.005. Epub 2012 Sep 30.

- Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 2005, 99 (4): 303–310.

- Souza, MCO, Freire MS, Schulze EA, Gaspar LP, Castilho LR. Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures. *Vaccine* 2009, 27 (46): 6420-6423.

- Staples JE, Monath TP, Gershman MD, Barrett ADT. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM editors. *Vaccines*. 7th ed. Saunders Elsevier; 2017. p. 1181–1265 [chapter 63].

- Stauffer F, El-Bacha T, Da Poian AT. Advances in the development of inactivated virus vaccines. *Recent Pat. Anti-Infective Drug Discov.* 2006 Nov; 1 (3): 291-6.

- Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Purtha WE, Oliphant T, Nybakken GE, Schlesinger JJ *et al.* Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of

dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol* 2007; 81: 12826- 12826.

-Taylor DN, Treanor JJ, Strout C, Johnson C, Fitzgerald T, Kavita U, *et al.* Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1SI). *Vaccine* 2011, 29:4897–902. doi:10.1016/j. vaccine.2011.05.001

- Taylor DN, Treanor JJ, Sheldon EA, Johnson C, Umlauf S, Song L, *et al.* Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine* 2012, 30 (39): 5761–5769.

- Theiler M. Studies on the action of yellow fever virus in mice. *Ann Trop Med Parasitol.* 1930. 24, 249-272.

- Theiler M, Smith HH. The effect of prolonged cultivation *in vitro* upon the pathogenicity of yellow fever virus. *J Exp Med* (1937a) 65: 767- 786.

- Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J Exp Med* (1937b) 65: 787- 800.

- Tottey S, Shoji Y, Jones RM, Chichester JA, Green BJ, Musiychuk K, *et al.* Plant-Produced Subunit Vaccine Candidates against Yellow Fever Induce Virus Neutralizing Antibodies and Confer Protection against Viral Challenge in Animal Models. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Feb; 98 (2): 420-431. doi: 10.4269/ajtmh.16-0293. Epub 2017 Nov 30.

- Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell factories* 2004, 3: 11. doi: 10.1186/1475-2859-3-11

- van Dissel JT, Joosten SA, Hoff ST, Soonawala D, Prins C, Hokey DA, *et al.* A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived Mycobacterium tuberculosis-specific T-cell responses in human. *Vaccine* 2014 Dec 12; 32 (52): 7098-107. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.10.036. Epub 2014 Oct 30.

- van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM. Thirty years of baculovirus–insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *Journal of General Virology* 2015, 96 (1): 6-23.

- Vasconcelos PF. Yellow fever in Brazil: Thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. *Rev. Saúde Pública* 2010, 44, 1144–1149.

- Vratskikh O, Stiasny K, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Karrer U, *et al.* Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (6): e1003458. doi: 10.1371/journal.ppat.1003458. Epub 2013 Jun 20.

- Wang Y, Mao Y, Xu X, Tao S, Chen H. Codon usage in signal sequences affects protein expression and secretion using Baculovirus/insect cell expression system. *PloS one* 2015, 10 (12): e0145887.

- Watson AM, Klimstra WB. T cell-mediated immunity towards Yellow Fever Virus and useful animal models. *Viruses.* 2017 Apr 11; 9 (4). pii: E77. doi: 10.3390/v9040077. Review.

- World Health Organization. Annex 2: Requirements for yellow fever vaccine (Requirements for Biological Substances No. 3). *Tech Rep. Ser. Geneva: WHO;* (1998) 872: 30 - 68.

- Wu TYH, Singh M, Miller AT, De Gregorio E, Doro F, D'Oro U, *et al.* Rational design of small molecules as vaccine adjuvants. *Sci Transl Med.* 2014 Nov 19; 6 (263): 263ra160. doi: 10.1126/scitranslmed.3009980.

- Yusibov V, Streatfield SJ, Kushnir N, Roy G, Padmanaban A. Hybrid Viral Vectors for Vaccine and Antibody Production in Plants. *Curr Pharm Des.* 2013;19(31):5574-86. Review.

Anexo 1: Vetores plasmídeos

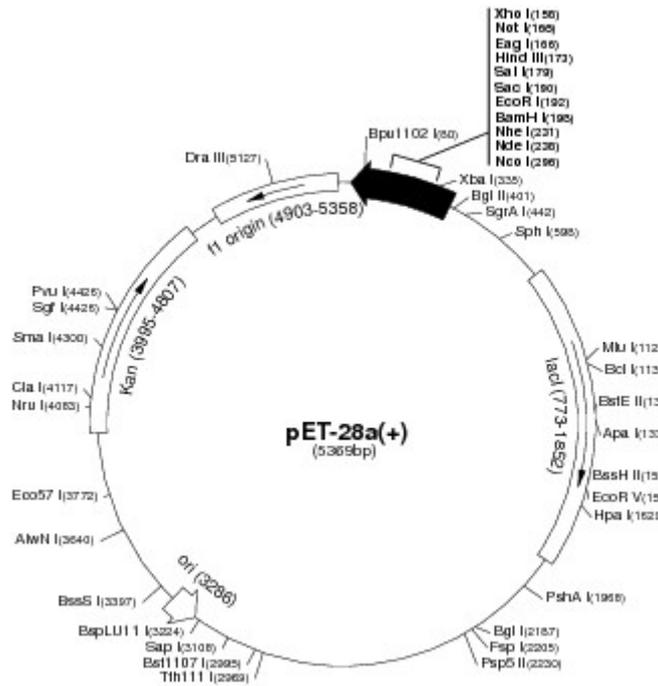


Figura A.1: Mapa do vetor pET28a. Disponível em: http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/pET-28a+-DNA-Novagen,EMD_BIO-69864#anchor_VMAP. Acesso em 26/03/2019.

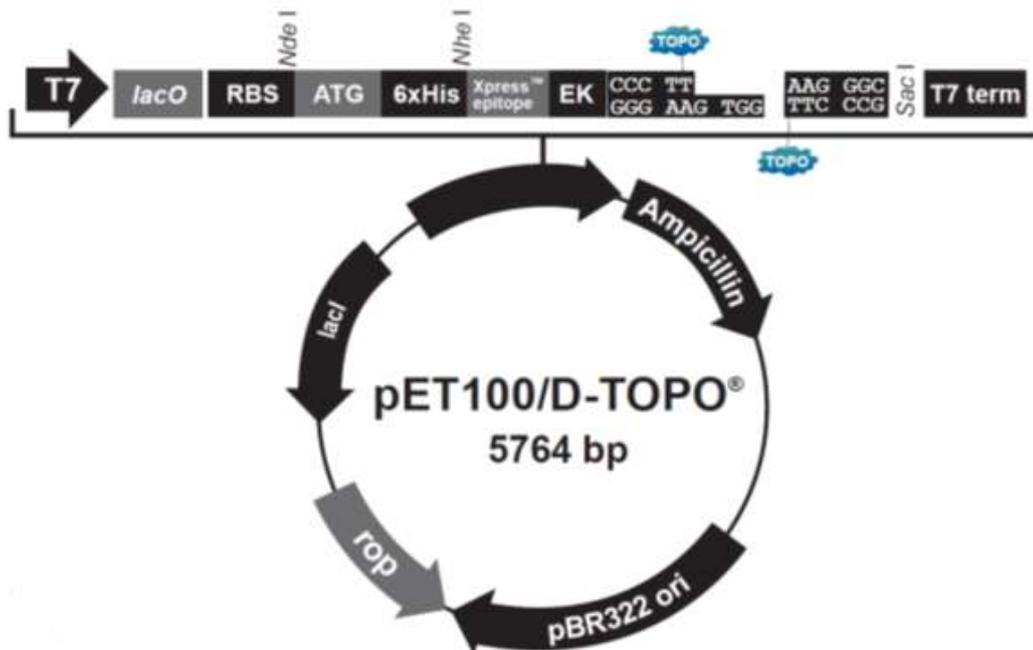


Figura A.2: Mapa do vetor pET100/ D-TOPO. Disponível em: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pet100dtopo_map.pdf. Acesso em 26/03/2019.

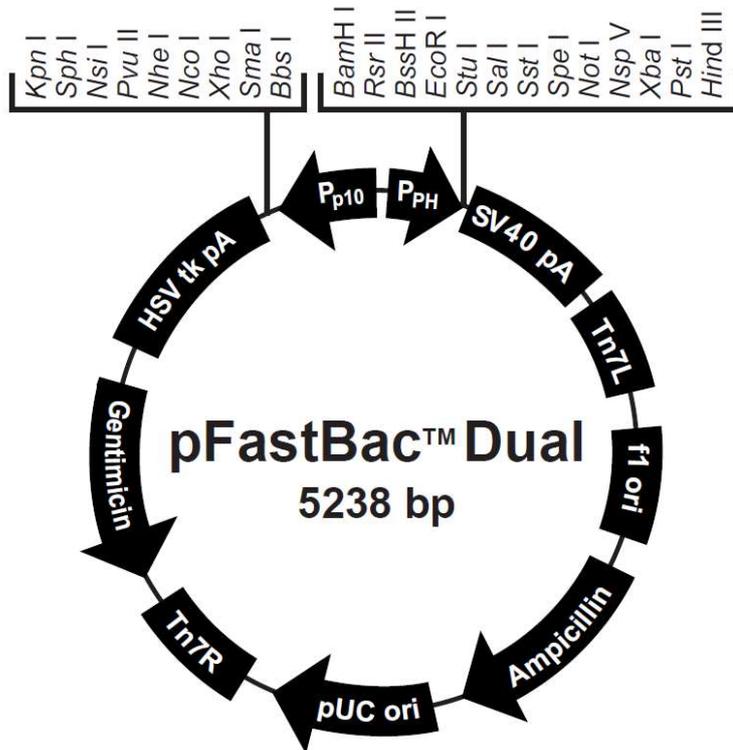


Figura A.3: Mapa do vetor pFast Bac Dual. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/vectors/pfastbacdual_map.pdf. Acesso em 26/03/2019.

Anexo 2: Oligonucleotídeos iniciadores

Quadro A.2.1: Descrição dos iniciadores, plasmídeos e sistemas de expressão utilizados para as diferentes construções testadas.

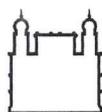
Sequências	Plasmídeo	Sistema de expressão	Iniciadores
Gene da proteína E	pET 28a	<i>E. coli</i> BL21	CAGGTACCAAAGGCAGAG CCAAACACC Fw
			CATCTAGACGCTCACTGC ATTGGAATTAC Rv
Gene da proteína NS1	pET100	<i>E. coli</i> BL21	CACCGATCAAGGATGCGC CATC Fw
			CTA AGCCACTGTGAGTTT CAGC Rv
Gene da proteína E (ectodomínio)	Baculovírus recombinantes (sistema Bac-to-Bac)	Células de inseto Sf9	GCTCTAGAGC ATG GCTCACTGCATTGG Fw
			CCAAGCTTTCAATGATGA TGATGATGATGACCTATT GAGCTTCCCTCTTTGTG Rv
Gene da proteína NS1	Baculovírus recombinantes (sistema Bac-to-Bac)	Células de inseto Sf9	AATGCGGCCGCTAAATG GATCAAGGATGCGCC Fw
			GCTGAAACTCACAGTGGCT CATCATCATCATCAT TGAGCTCTAGAGC Rv
Gene da proteína E (ectodomínio + sequência sinal GP64)	Baculovírus recombinantes (sistema Bac-to-Bac)	Células de inseto Sf9	CTAGCTAGCGCTCACTGC ATTGGAATTAC Fw
			CACAAAGAGGGAAGCTCAA TAGGACATCATCATCAT CATTAAAGGTACCCC Rv

Anexo 3: Meios de cultura

Quadro A.3.1: Composição dos meios de cultura bacterianos.

Meio de Cultura	Composição
SOC	2% Triptona, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM glicose
LB	1% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 1% NaCl
TB	1,2% Triptona, 2,4% Extrato de levedura, 0,5% Glicerol

Anexo 4: Protocolo CEUA aprovado



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-25/16

Certificamos que o protocolo (P-26/15-4), intitulado "Vacinas de subunidade para febre amarela como modelo de estudo de novos adjuvantes", sob a responsabilidade de GABRIELA DOS SANTOS ESTEVES, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 18/07/2020 e inclui o uso total de :

Oryctolagus cuniculus

- 10 Machos de Nova Zelândia, Peso: 2,0000 Kilo(s).

Mus musculus

- 100 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 9 Semana(s).

Mus musculus

- 3478 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 4 Semana(s).

Rio de Janeiro, 18 de julho de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA


Etelcia M. Molinaro
Vice - Coordenadora
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 0463096

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550
18/07/2016

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br