



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



Georgia de Freitas Guimarães

Clonagem, expressão e análise do tráfego celular das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 3 fusionadas à proteína lisossomal LAMP

RECIFE
2009

GEORGIA DE FREITAS GUIMARÃES

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E ANÁLISE DO TRÁFEGO CELULAR DAS
PROTEÍNAS PRM/E DO VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO 3 FUSIONADAS À
PROTEÍNA LISOSSOMAL LAMP**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil

Co-orientador: Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior

RECIFE

2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

G963c Guimarães, Georgia de Freitas.

Clonagem, expressão e análise do tráfego celular das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 3 fusionadas à proteína lisossomal LAMP/ Georgia de Freitas Guimarães. — Recife: G. F. Guimarães, 2009.

129 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil, Co-orientador: Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior

1. Dengue – imunologia. 2. Clonagem molecular. 3. Otimização – métodos. 4. Vacinas contra dengue. I. Gil, Laura Helena Vega Gonzales. II. Marques Junior, Ernesto Torres de Azevedo. III. Título.

CDU 616.98

GEORGIA DE FREITAS GUIMARÃES

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E ANÁLISE DO TRÁFEGO CELULAR DAS
PROTEÍNAS PRM/E DO VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO 3 FUSIONADAS À
PROTEÍNA LISOSSOMAL LAMP**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Laura Helena V. G. Gil (Orientadora)
CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Carlos Calzavara (Titular Interno)
CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Giovanni Bertani (Revisor/Titular Externo)
Departamento de Bioquímica- UFPE

Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro (Suplente Interna)
CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Rita de Cássia C. Maia (Suplente Externa)
UFRPE

Dedico este trabalho à Minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser esta força que faz sempre seguir em frente.

À minha orientadora, Laura Gil, pelo apoio, aprendizado e que me mostrou que também sou capaz de andar com minhas próprias pernas.

A meu co-orientador quase que onipresente, Ernesto Marques, por todo apoio e confiança.

Ao programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães e ao Núcleo de Plataforma Tecnológica pela colaboração com o sequenciamento e microscopia de confocal, realizado pelas doutoras Cássia Docena, Regina Bressan e pela técnica Viviane.

A meu pai e minha mãe, Renilson e Socorro, meu irmão, Germano, e minha cunhadinha, Jane, por todo amor e compreensão, e por aturarem meus maus-humores e estresses diários.

À minha avó, Severina, mesmo sem ela mesma saber, eu sei que ela torce sempre por mim.

A meu namorado, amor, companheiro, amigo, Carlos Eduardo, por ser meu porto seguro de todas as horas.

À minha sogra, sogro e cunhada, Hilda, Antônio e Luciana, pelo carinho e acolhida.

À minhas amigas, Mônica e Rita, sempre especiais de alma e coração.

A meus amigos de faculdade, Danielle, Gabriel, Lígia, Lillyane e Tamara, que mesmo “No alto daquele cume” sempre estiveram por perto.

A meus queridos amigos de almoço, André, Andréa Melo, Fábria, Gerusa, Jefferson e Thiago, que tantas brigas amigáveis compartilhamos. E a Miguel também.

À minhas companheiras de bancada, Andréa Rangel e Sabrina, que sempre me deixam sem ponteiros e sem espaço pra trabalhar, mas sempre dispostas a me ajudar com os experimentos ou apenas com uma palavra de carinho.

A meus amigos Artur, Bruno e os Berg's, pela amizade e carinhos.

A todo o pessoal do Lavite, que faz a “coisa” acontecer, especialmente a Amanda, Ana Lisa (quase uma extraterrestre em Cingapura), Doris, Carlos, Isabelle, Karla, Lici, Marli, Michelle e Ritinha.

A todos que sempre me apoiaram e me incentivaram no caminhar desta jornada,

Obrigada à todos!!

"Se ao escalar uma montanha na direção de uma estrela, o viajante se deixa absorver demasiado pelos problemas da escalada, arrisca-se a esquecer qual é a estrela que o guia."

Antoine de Saint-Exupéry

Guimarães, Georgia de Freitas. **Clonagem, expressão e análise do tráfego celular das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 3 fusionada à proteína lisossomal LAMP.** 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

RESUMO

Diversas estratégias vacinais contra a dengue tem sido testadas, mas sem sucesso. A vacina de DNA é uma tecnologia recente, onde um ou mais plasmídeos recombinantes contendo o(s) gene(s) desejado(s) é inoculado. Porém uma das principais desvantagens das vacinas de DNA é a baixa imunogenicidade. A fusão do gene que codifica antígeno com o gene que codifica a proteína LAMP (*Lysosome-Associated Membrane Protein*), que direciona o antígeno para o lisossomo, resultam numa melhor resposta imunológica devido a apresentação dos antígenos aos linfócitos T helper CD4⁺ por moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC II), gerando deste modo uma maior atividade proliferativa de linfócitos antígeno-específicos, altos títulos de anticorpos e intensa atividade T- citotóxica. É possível, também, otimizar os códons da sequência gênica do antígeno, resultando em uma maximização da expressão gênica e conseqüentemente uma melhor resposta imunológica. As proteínas pré-membrana e envelope do sorotipo 3 do vírus dengue foram clonadas no vetor p43HIVhumanLAMP/Gag, na forma selvagem e otimizada, resultando nos plasmídeos p43-DENV3-prM/E e p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP. Neste estudo foram analisados a expressão e o tráfego das proteínas clonadas em células HEK-293. Foi possível observar a expressão das proteínas clonadas por imunofluorescência, mas não por Western-blot. Nos estudos de tráfego celular por microscopia confocal observou-se a localização lisossomal das proteínas prM/E fusionadas com a porção c-terminal de LAMP, e uma distribuição perinuclear das proteínas não fusionadas com LAMP. Os resultados obtidos neste projeto representam uma etapa inicial para o desenvolvimento futuro de uma vacina de DNA tetravalente contra o vírus da dengue.

Palavras chave: Dengue – imunologia. Clonagem molecular. Otimização – métodos. Vacinas contra dengue.

Guimarães, Georgia de Freitas. **Cloning, expression and analysis of the cellular traffic of the prM/E protein of dengue virus serotype 3 fused to lysosomal protein LAMP.** 2009. Dissertation (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

ABSTRACT

Several vaccine strategies against the dengue have been tested, but none was successful. The DNA vaccine is a recent technology, where one or more recombinant plasmids containing the desired genes are cloned. However, one main disadvantage of the DNA vaccine is its immunogenicity. The fusion of the antigenic gene with the LAMP protein gene (Lysosome-Associated Membrane Protein) that addresses the antigen to the lysosome, results in a better immunologic response. This is due to the presentation of the antigen to CD4 T lymphocytes for the major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. It generated an intense growth activity of antigen-specific lymphocytes, high titer of the antibody and intense cytotoxic T activity. It is also possible that it optimized the genes codon sequence to antigen, resulting in the maximization of the genes expression and therefore, a better immunologic response. The pre-membrane and envelope proteins of the dengue 3 serotype were cloned in to p43HIVhumanLAMP/Gag vector, in wild type and optimized form, resulting on the p43-DENV3-prM/E e p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP plasmids. It was analyzed the expression and the traffic of that protein in the HEK-293 cell. It was possible to visualize the expression of the cloned proteins throughout the immunofluorescence assay, but not through the Western-blot assay. The confocal microscopy showed lysosomal localization of the prM/E proteins fused with c-terminal region of LAMP, and the perinuclear localization of proteins non-fused with LAMP. The present results represent the initial step towards the future development of a tetravalent DNA vaccine against dengue virus.

Keywords: Dengue – immunology. Molecular Cloning. Optimization – methods. Dengue Vaccines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Incidência de Dengue por Município de Residência, Brasil, 2008	15
Figura 2	Vírus da dengue e estrutura do genoma	18
Figura 3	Antibody dependent enhancement- ADE	21
Figura 4	Resposta imune via MHC I	33
Figura 5	Descrição do mecanismo de geração de resposta celular e humoral	34
Figura 6	Mapas dos plasmídeos utilizados nas clonagens	44
Figura 7	Seqüência da proteína otimizada	45
Figura 8	Mapa do plasmídeo sintético pGA15D-DENV3-prM/E-opt	46
Figura 9	Mapas dos plasmídeos construídos	47
Figura 10	Sistema Lab-Tek® Chamber Slide com 8 poços	48
Figura 11	Esquema das regiões de anelamento dos primers DENV3-369F, DENV3-ER e DENV3-2284R, para reação de PCR na construção dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E e p43-DENV3-prM/E-LAMP	53
Figura 12	Produtos de PCR prM/E e prM/E-2284 do DENV3	54
Figura 13	Esquema da clonagem dos fragmentos DENV3-prM/E-2284 para a fusão com c-LAMP	55
Figura 14	Purificação dos fragmentos DEN3-prM/E-2284 e p43 HIVhuman LAMP/Gag digeridos	56
Figura 15	PCR para confirmação da construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP	57
Figura 16	Digestão dos DNAs plasmidiais para confirmação da construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP	57
Figura 17	Sequência de DNA referente a região dos genes prM/E do sorotipo 3 do vírus da dengue otimizada	58
Figura 18	Estratégia de clonagem para construção dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E-opt p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP	59
Figura 19	Análise da purificação dos fragmentos DENV3-prM/E-opt e vetor p43HIVhumanLAMP/Gag digeridos	60
Figura 20	Digestão dos DNAs plasmidiais para confirmação da clonagens dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP	61
Figura 21	Células HEK-293 transfectadas com os plasmídeos p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP	63
Figura 22	Detecção da proteína celular actina pela técnica de “Western-blot”	65
Figura 23	Análise de “Western-blot” de células HEK-293 e C6/36 infectadas com os vírus DENV3 e a quimera YFV-DENV3 utilizando o anticorpo monoclonal 4G2	66
Figura 24	Localização das proteínas geradas pelas construções p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP; p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP em células HEK-293 transfectadas através da microscopia confocal	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ADE	Antibody-Dependent Enhancement (Realce dependente de anticorpo)
AmpR	Marca de Resistência à Ampicilina
APC	Antigen-Presenting Cell (Células Apresentadoras de Antígenos)
C	Proteína do Capsídeo
CDC	Center for Diseases Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
cDNA	complementary DNA (DNA complementar)
cm	Centímetros
c-terminal	Carboxi-terminal
DC	Dengue Clássica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium (Meio Essencial Dulbecco Modificado)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DENV	Vírus da Dengue
DENV-1	Vírus da Dengue Sorotipo 1
DENV-2	Vírus da Dengue Sorotipo 2
DENV-3	Vírus da Dengue Sorotipo 3
DENV-4	Vírus da Dengue Sorotipo 4
DNA	Desoxirribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)
DTT	Ditiotreitol
E	Proteína Envelope
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fc	Fragment Crystallizable (porção carboxi-terminal da imunoglobulina)
FcR	Receptor para Fc
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína)
GM-CSF	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (Fator Estimulatório de Colônia – Granulócito Monócitos)
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293 cells (Células humanas embrionárias de rins 293)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HPV	Human Papilloma Virus (Vírus do Papiloma Humano)
IFN	Interferon
JE	Japanese Encephalitis (Encefalite Japonesa)
KanR	Marca de Resistência à Canamicina
kDa	quiloDalton
LAMP	Lysosome-Associated Membrane Protein (Proteína de membrana associada ao lisossomo)
LB	Luria Bertani medium (Meio Luria Bertani)
M	Molar
µg	micrograma (10^{-6} gramas)
µl	microlitro (10^{-6} litros)
MHC I	Major Histocompatibility Complex class I (Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I)
MHC II	Major Histocompatibility Complex class II (Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II)
Min	minutos
ml	mililitro (10^{-3} litros)
MS	Ministério da Saúde
NIH	National Institute of Health (Instituto Nacional de Saúde)
NS	Proteínas Não Estruturais
n-terminal	amino-terminal
ORF	Open Reading Frame (Origem da matriz de leitura)
pb	Pares de base
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Salina Fosfato)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDK	Primary Dog Kidney Cell (Células primárias de rins de cachorro)
PGMK	Primary Green Monkey Kidney Cell (Células primárias de rins de macaco verde)
PIV	Purified Inactivated Virus (Vírus inativado purificado)
PM	Peso Molecular
prM/E	Proteínas pré-Membrana/Envelope
prM/M	Proteína pré-Membrana/Membrana
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ribonucleic acid (Ácido Ribonucléico)

SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome (Síndrome Respiratória Aguda Grave)
SCD	Síndrome do Choque da Dengue
Seg	Segundos
SVP	Subviral Particles (Partículas Subvirais)
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TBE	Tick-borne Encephalitis (Encefalite do carrapato)
t-PA	Sequência Ativadora de Plasminogênio Tecidual Humano
UTR	Untranslation Region (Regiões Não Traduzidas)
YF	Yellow Fever (Febre Amarela)
WRAIR	Walter Reed Army Institute of Research (Instituto de Pesquisa Walter Reed Army)
WN	West Nile (Oeste do Nilo)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Dengue	15
1.2 O Vírus	17
1.3 A imunidade ao Vírus da Dengue	20
1.4 A Vacina	23
1.4.1 Vacinas de Vírus Vivo Atenuado	25
1.4.2 Vacinas Vivas Recombinantes	26
1.4.3 Vacinas Inativadas e de Subunidades	29
1.4.4 Vacina de DNA	30
1.5 Estratégias para Realçar a Resposta Imune	34
1.5.1 LAMP	34
1.5.2 Otimização Gênica	35
2 JUSTIFICATIVA	37
3 PERGUNTA CONDUTORA	38
4 HIPÓTESE	39
5 OBJETIVOS	40
5.1 Objetivo Geral	40
5.2 Objetivos Específicos	40
6 METODOLOGIA	41
6.1 Cultivo de células e vírus	41
6.2 Construção dos plasmídeos	41
6.2.1 Plasmídeos contendo os genes das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 3 não fusionados (p43-DENV3-prM/E) e fusionados ao LAMP (p43-DENV3-prM/E-LAMP)	41
6.2.1.1 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E	41
6.2.1.2 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP	42
6.2.2 Plasmídeos contendo os genes otimizados das proteínas prM/E do sorotipo 3 do vírus da dengue não fusionados (p43-DENV3-prM/E-opt) e fusionados a LAMP (p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP)	43
6.2.2.1 Otimização das sequências dos genes prM/E do vírus da dengue sorotipo 3	43
6.2.2.2 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt	45
6.2.2.3 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP	45
6.2.3 Sequenciamento	46
6.3 Transfecção	47
6.4 Análise da expressão das proteínas clonadas em células HEK-293	48
6.4.1 Microscopia de fluorescência	48
6.4.2 Imunoprecipitação	48
6.4.3 Western Blot	49
6.5 Estudo do tráfego celular	51
6.5.1 Microscopia de confocal	51
6.6 Aspectos Éticos	51

7 RESULTADOS	52
7.1 Construção dos plasmídeos	52
7.1.1 Plasmídeos contendo os genes das proteínas DENV3-prM/E não fusionados (p43-DENV3-prM/E) e fusionados ao LAMP (p43-DENV3-prM/E-LAMP)	52
7.1.1.1 <i>Amplificação por PCR</i>	52
7.1.1.2 <i>Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E</i>	53
7.1.1.3 <i>Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP</i>	54
7.1.2 Plasmídeos contendo os genes otimizados das proteínas DENV3-prM/E não fusionados (p43-DENV3-prM/E-opt) e fusionados ao LAMP (p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP)	57
7.1.2.1 <i>Otimização dos genes</i>	57
7.1.2.2 <i>Clonagem dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP</i>	58
7.1.3 Sequenciamento das construções p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt, e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP	60
7.2 Transfecção de células HEK-293 e análise da expressão dos plasmídeos construídos em células transfectadas	61
7.2.1 Microscopia de Imunofluorescência	61
7.2.2 “Western-blot”	63
7.3 Estudo do tráfego celular em células transfectadas com os plasmídeos p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP por microscopia confocal	65
8 DISCUSSÃO	68
9 CONCLUSÕES	72
10 PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICES A – Artigo em preparação	97
ANEXO A	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Dengue

A Dengue é uma doença causada por um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) pertencente ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae* (LINDENBACH; RICE, 2001). O vírus da dengue possui 4 sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, -2, -3 e -4), que são transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* considerado o principal vetor da doença (BURKE; MONATH, 2001).

No mundo, estima-se que ocorra cerca de 100 milhões de casos de dengue clássica (DC) e 250.000 a 500.000 casos de febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD) anualmente, e que 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco da doença (DELGADO et al., 2002; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1994). No Brasil, a incidência da dengue tem crescido anualmente e acredita-se que isto seja decorrente da disseminação do *Aedes aegypti*. Na epidemia do ano 2000, os vírus DENV-1 e DENV-2 foram os responsáveis pelos casos de dengue no Brasil, mas desde a introdução do sorotipo DENV-3, em dezembro de 2000 no Rio de Janeiro, este sorotipo tem sido o predominante no país (DE PAULA et al., 2004; MIAGOSTOVICH et al., 2002; NOGUEIRA, 2005; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2002; ROCCO; KAVAKAMA; SANTOS, 2001). A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou em 2008 uma diminuição de áreas consideradas de risco em relação a 2007. Esta melhora foi detectada tanto nas regiões Norte e Nordeste como na região Sudeste, embora esta região ainda permaneça em estado de alerta (Figura1) (BRASIL, 2009).

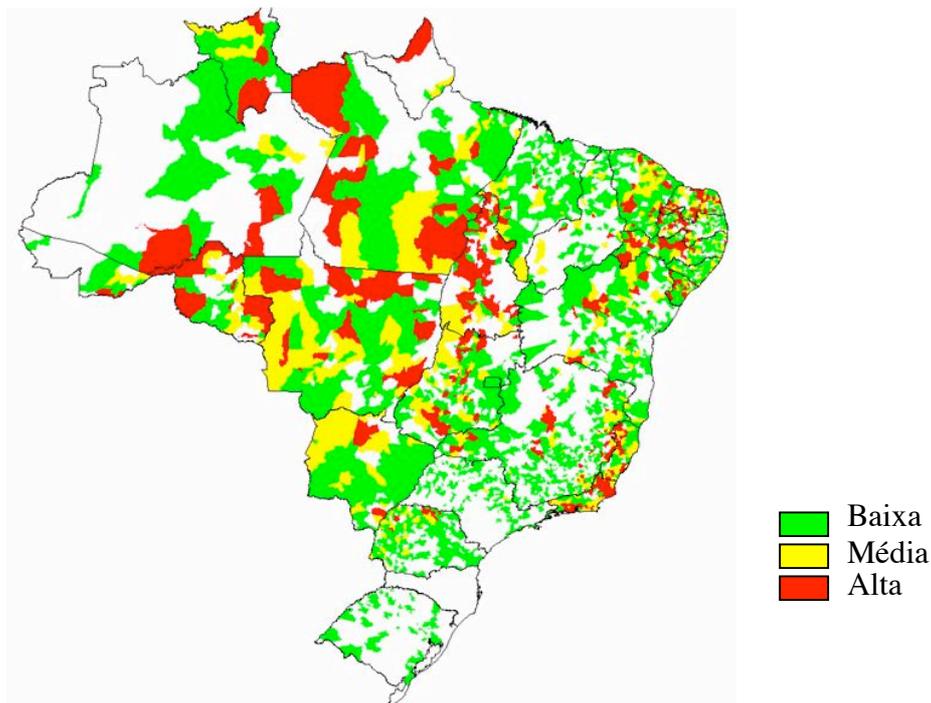


Figura 1- Incidência de Dengue por Município de Residência, Brasil, 2008.

Nota: Baixa (Menos de uma casa infectada para cada 100 entrevistada); Média (de uma a três casas infectada para cada 100 entrevistada); Alta (Mais de quatro casas infectada para cada 100 entrevistada).

Fonte: BRASIL, 2009

A dengue foi considerada erradicada no Brasil na década de 30 do século passado, mas em 1981 a doença voltou a acometer pacientes humanos. A emergência e reemergência da dengue podem ser atribuídas a mudanças sociais e demográficas, crescimento populacional e urbanização mal planejada, isto pode resultar em largos agregados humanos vivendo em centros urbanos com moradia inadequada e sistemas de tratamento de água e esgoto também inadequados. Quando se juntam a esses fatores, o aumento de movimentação de indivíduos para áreas endêmicas, a deterioração das medidas efetivas de controle do mosquito, e dedicação de recursos humanos e financiamentos limitados para infra-estrutura em saúde pública, a dengue pode firmar-se contra a população (TEIXEIRA et al., 2002).

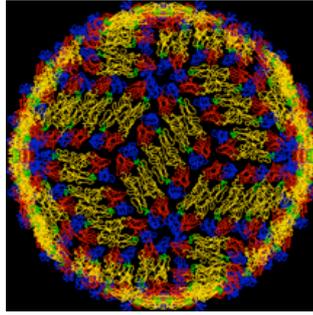
As formas clínicas da dengue são variáveis e podem ser classificadas em assintomáticas, dengue clássica (DC), e febre da dengue hemorrágica/síndrome do choque da dengue (FHD/SCD) (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2005; LIBRATY et al., 2002; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1994). A DC é caracterizada por febre, cefaléia, prostração, mialgia, artralgia, dor retro-orbitária e prurido, mas anorexia, náuseas, vômitos e diarreia também podem ser observados. Uma pequena porção de pessoas infectadas pode desenvolver a FHD, e apresentam aumento excessivo da permeabilidade vascular, acompanhado por trombocitopenia, alterações na homeostase, e problemas hepáticos, observados por aumento nas aminotransferases, e ainda pode evoluir para a SCD e morte

(BURKE; MONATH, 2001; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997). Pode-se ocorrer manifestações atípicas como alterações hepáticas (SENEVIRATNE; MALAVIGE; DE SILVA, 2006; UEHARA et al., 2006) e manifestações neurológicas (CHIMELLI et al., 1990; GUBLER, 1983; NOGUEIRA et al., 2002; PATEY et al., 1993; SOLOMON et al., 2000). Acredita-se que a infecção secundária seja o fator de risco principal da FHD, entretanto, outros fatores tais como a carga viral e as características do hospedeiro são considerados também importantes (GUZMAN et al., 2002a). Outros fatores também têm sido postulados como importantes para patogênese da FHD são: 1- virulência específica do genótipo viral que se replica em altos níveis resultando num aumento da resposta imune e aumento da severidade (LEITMEYER et al., 1999; RICO-HESSE et al., 1997; ROSEN, 1986); 2- pré-disposição genética para a doença severa entre a população (CHIEWSILP; SCOTT; BHAMARAPRAVATI, 1981) e 3- outros fatores de risco, como idade (GUZMAN et al., 1984), sexo (GUZMAN et al., 1984; HALSTEAD, 1970) e nutrição (ANTO et al., 1983; THISYAKORN; NIMMANNITYA, 1993). Embora o aumento na carga viral possa ser necessário para desenvolver FHD, isto não está claro que ocorra (VAUGHN et al., 2000).

1.2 O Vírus

O Dengue (DENV) é um vírus envelopado, contendo um capsídeo denso envolvido por uma bicamada lipídica. Seus genes são organizados em uma molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva, cujo genoma é composto de aproximadamente 10.800 nucleotídeos (em torno de 3400 aminoácidos) flanqueados pela estrutura 5' cap e uma extremidade 3' terminal não-poliadenilada (RICE et al., 1985). As estruturas secundárias das regiões 5'UTR (Untranslated Region) e 3'UTR estão envolvidas na replicação viral, tradução e empacotamento do genoma do vírus. A tradução do RNA genômico origina uma longa poliproteína que, por sua vez, sofre sucessivas clivagens, por proteases do hospedeiro e do próprio DENV, resultando na formação das proteínas estruturais e não estruturais do vírus (CHAMBERS et al., 1990). A organização das proteínas do DENV na poliproteína é: C-prM/M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5, onde C (capsídeo), prM/M (membrana) e E (envelope) representam as proteínas estruturais ou seus precursores, enquanto as proteínas NS (NS1-NS5) representam as proteínas não estruturais (KUHN et al., 2002) (Figura 2).

A



B

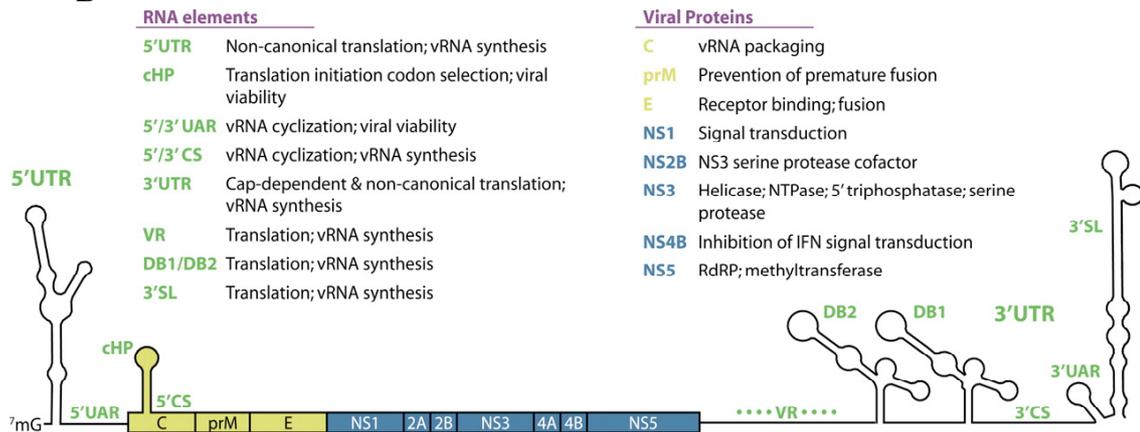


Figura 2- Vírus da dengue e estrutura do genoma.

Nota: (A) Homodímero da proteína E forma uma superfície lisa na partícula viral madura (B) Estrutura do genoma e função conhecidas de alguns genes

Fonte: (A) WHITEHEAD et al., 2007; (B) CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006.

Proteínas C nascentes apresentam um domínio hidrofóbico na região carboxi-terminal (NOWAK; FARBER; WENGLER, 1989) que atua como uma sequência sinal para a translocação da proteína prM para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE) (CHAMBERS et al., 1990). A proteína C também possui, na sua porção central, um domínio hidrofóbico que interage com membranas celulares, sendo atribuído à mesma um papel na montagem viral (MARKOFF; FALGOUT; CHANG, 1997). A proteína precursora prM/M, por sua vez, é clivada durante a morfogênese viral e acredita-se que sua função esteja relacionada a estabilização da proteína E durante os primeiros eventos de montagem do vírus. A proteína E do envelope é a maior e principal proteína estrutural responsável pela ligação ao receptor e penetração celular. Esta proteína é diferentemente glicosilada, de acordo com o sorotipo e a célula no qual o vírus é propagado (JOHNSON; GUIRAKHOO; ROEHRIG, 1994; LEE; WEIR; DALGARNO, 1997; LOZACH et al., 2005; NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; POKIDYSHEVA et al., 2006), a glicosilação da proteína E está implicada na ligação à receptores (HUNG et al., 1999; LOZACH et al., 2005; NAVARRO-SANCHEZ et

al., 2003; POKIDYSHEVA et al., 2006); e na fusão endossomal (GUIRAKHOO et al., 1993; LEE; WEIR; DALGARNO, 1997).

A proteína E apresenta-se compreendida em 3 domínios (domínios I, II e III), em que o domínio I é o domínio central, domínio II está envolvido na dimerização da proteína E por contato de moléculas adjacentes ao longo da superfície viral, e o domínio III é um domínio semelhante a imunoglobulinas (CARDOSA, 1998), e está relacionado com a atividade de ligação a receptores celulares (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Anticorpos neutralizantes para o domínio II e III da proteína E primariamente bloqueiam a fusão à membrana e o attachmento viral, respectivamente (BURKE; MONATH, 2001; CRILL; ROEHRIG, 2001; ROEHRIG; BOLIN; KELLY, 1998).

Considerando que a superfície viral seja composta principalmente pelas proteínas M e E entrelaçadas, estes antígenos são capazes de induzir resposta por anticorpos neutralizantes, sendo a proteína E a principal mediadora da proteção contra a infecção do DENV (BURKE; MONATH, 2001; LINDENBACH; RICE, 2001; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1997; WHITEHEAD et al., 2007). A expressão de prM e E na ausência de C pode levar a formação de partículas subvirais (Subviral Particles, SVPs), os quais não contém RNA ou proteína C (MASON et al., 1991). O cassete prM/M-E produzido nas SVPs tem sido a base para diversas vacinas candidatas (ABERLE et al., 1999; COLOMBAGE et al., 1998; DAVIS et al., 2001; FONSECA et al., 1994; KANESA-THASAN et al., 2000; KOCHER et al., 1997; KOCHER et al., 2000; KONISHI et al., 1992a; KONISHI et al., 1992b; KONISHI et al., 2000a; KONISHI et al., 2000b; KONISHI; FUJII; MASON, 2001; KONISHI; FUJII, 2002; PINCUS et al., 1992; MASON et al., 1991; MINKE et al., 2004; PHILLPOTTS; VENUGOPAL; BROOKS, 1996; PUGACHEV et al., 2004; QIAO et al., 2004; SCHMALJOHN et al., 1997).

A proteína não estrutural NS1 tem um papel importante na replicação viral, embora ainda não esteja claro como este processo acontece, ela é encontrada colocalizada com o complexo de proteínas envolvidas na replicação do genoma viral (MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; WESTAWAY et al., 1997). A glicosilação desta proteína é requerida para replicação viral em células de mosquito e para neurovirulência em camundongos (CRABTREE; KINNEY; MILLER, 2005). A forma secretada da proteína NS1 é um alvo dominante da imunidade humoral e pode ter um papel importante na patogênese da doença (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). A proteína NS2A é requerida para o processamento da proteína NS1, sua função ainda não está clara, mas sabe-se que ela está envolvida na montagem viral e na replicação do RNA (LINDENBACH; RICE, 2001). Estudos recentes

com a proteína NS2A do DENV-2 têm demonstrado sua ação antagonista ao interferon (IFN), por inibir a resposta celular ao interferon (MUNOZ-JORDAN et al., 2003; SABCHAREON et al., 2004). A proteína NS2B está associada à membrana, forma um complexo com a proteína NS3 e é requerida como cofator para a função de serina protease apresentada pela NS3 (ARIAS; PREUGSCHAT; STRAUSS, 1993; CHAMBERS et al., 1990). A proteína NS3 é uma proteína multifuncional, apresenta atividades enzimáticas (protease, helicase/trifosfatase), importantes no processamento da poliproteína do dengue e na replicação do RNA viral (LINDENBACH; RICE, 2001; MATHEWS et al., 1991). Estudos recentes têm demonstrado que a proteína NS4A induz alteração na membrana das células infectadas, e pode servir como uma plataforma para ancorar o complexo de replicação viral (MILLER et al., 2007; ROOSENDAAL et al., 2006). A proteína NS4B é um potente inibidor de IFN- α e IFN- β (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006), e também pode estar envolvida na replicação viral, na qual uma interação com a proteína NS3 aparenta ser necessária (MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006; UMAREDDY et al., 2006). E por fim, a proteína NS5 que possui atividade de RNA polimerase (NOMAGUCHI et al., 2003; TAN et al., 1996), bem como metiltransferase (EGLOFF et al., 2002), esta proteína é a maior e a mais conservada dentre as proteínas dos *Flavivirus* (CHANG, 1997; LINDENBACH; RICE, 2001).

1.3 A Imunidade ao Vírus da Dengue

A infecção com um sorotipo do vírus da dengue promove imunidade por toda vida contra este sorotipo, mas não confere imunidade protetora cruzada contra os outros sorotipos, de modo que as pessoas que vivem em áreas endêmicas onde circulam mais de um sorotipo, poderão ter mais de um infecção durante sua vida (GUBLER; CLARK, 1995; SEEMA; JAIN, 2005). A infecção por um sorotipo do dengue gera uma fraca proteção cruzada para os outros sorotipos, que não dura mais que 12 semanas (SABIN, 1952). A cocirculação de mais de um sorotipo é comum em países que são muito afetados por DENV (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004). De acordo com Halstead (1970), a presença de anticorpos heterólogos em concentração subneutralizantes pode mediar a entrada do vírus nas células (HALSTEAD, 1970). Alguns trabalhos descrevem que a infecção com um sorotipo pode estimular a produção de anticorpos neutralizantes conferindo imunidade ao longo de toda a vida para este sorotipo, mas a existência destes anticorpos pode promover um realce da

infecção subsequente com outro sorotipo (LAOPRASOPWATTANA et al., 2005). Ou seja, a presença de anticorpos não neutralizantes de uma infecção prévia com outro sorotipo pode contribuir para facilitar a entrada do vírus nas células, onde o vírus utiliza a porção Fc dos anticorpos no qual encontram-se ligados e se ligam aos receptores FcR presentes nas células (macrófagos, monócitos, células B, neutrófilos e granulócitos) (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977; HALSTEAD, 1988; KLIKS et al., 1989), esta ligação aumenta o atachamento do vírus na superfície celular e, conseqüentemente, sua entrada na célula. A entrada facilitada deste complexo vírus-anticorpo via FcR nas células, conduz a um aumento na carga viral e severidade da doença. Este fenômeno é conhecido como ADE (*Antibody-dependent enhancement*) e pode resultar em um aumento do número de células apresentadoras de antígeno (APCs – Antigen-Presenting Cell) infectadas durante a infecção secundária, levando a ativação de linfócitos T específicos pré-existentes de uma infecção primária, e, conseqüentemente, uma reação cruzada com linfócitos pré-existentes (GREEN et al., 1999; KURANE; MEAGER; ENNIS, 1989). Esta cascata auto-amplificante pode levar a liberação de citocinas e mediadores químicos que podem causar aumento na permeabilidade vascular (KURANE et al., 1991) (Figura 3).

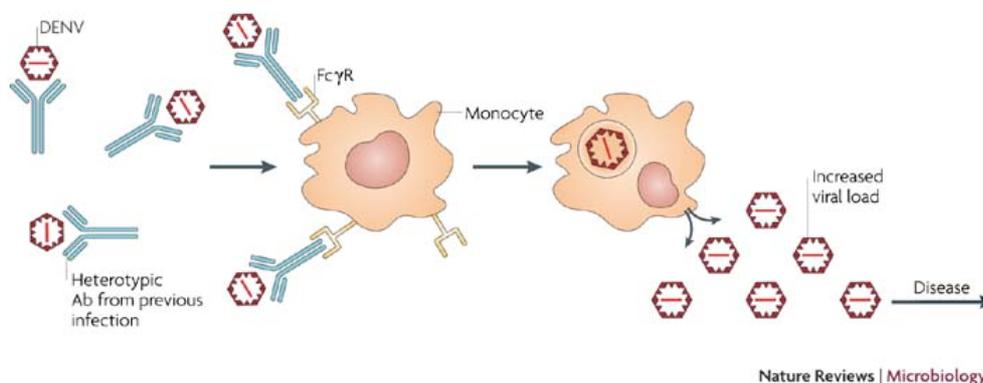


Figura 3- Antibody dependent enhancement- ADE.

Nota: O vírus da dengue ligado a um anticorpo pré-existente contra outro sorotipo, se ligando a monócitos circulantes, desencadeando a amplificação da replicação do vírus, levando a potencialização, severidade da doença.

Fonte: VAUGHN et al., 2000.

O aumento da replicação do vírus da dengue nas células alvo é provavelmente responsável pelos elevados níveis de viremia nos estágios precoces da doença, e alguns estudos correlacionam esta viremia com incidência da FHD (ENDY et al., 2004; VAUGHN et al., 2000).

Apesar do resultado da ADE ser aumentado pela infectividade do vírus, não tem sido ainda diretamente evidenciado que o aumento da replicação viral levará a severidade da

doença *in vivo*, pois ainda não estão compreendidos os mecanismos pelo qual a carga viral aumentada possa predispor a FHD. Hipóteses alternativas sobre a patogênese da FHD incluem argumentos que FHD é uma consequência da ativação de complemento na superfície de células infectadas expressando antígenos do vírus da dengue contra o qual anticorpos anti-dengue têm se ligado (BHAKDI; KAZATCHKINE, 1990), ou que a infecção secundária com heterotipos da dengue resulta no número aumentado de monócitos infectados levando a um aumento na ativação da reação cruzada de linfócitos T citotóxico de memória CD4 e CD8 que desencadeiam uma cascata de citocinas e outros mediadores (KURANE et al., 1994). Ambos os argumentos, atualmente, implicam na aceitação de que uma resposta imune secundária é um fator de risco para a severidade da doença, e que a presença de anticorpos heterotípicos levará ao aumento da infecção. A resposta ADE como o mecanismo para patogênese da FHD, pode ser uma simplificação na compreensão do papel das citocinas e células mediadoras da imunidade, mas está claro que a potencialização da resposta imune tem um papel como um fator de risco para FHD (CARDOSA, 1998).

Estudos demonstram que o aumento nos anticorpos contra a dengue pode afetar a severidade da doença em até 20 anos depois da primeira infecção, especialmente durante a infecção de DENV-2 e DENV-3 seguida da primeira com DENV-1 (ALVAREZ et al., 2001). Entretanto, todos os sorotipos da dengue têm demonstrado ser capaz de causar severidade da doença (ENDY et al., 2002). Em contraste, a doença leve está associada com baixa carga viral e altos níveis de anticorpos neutralizantes heterotípicos pré-existentes durante a infecção secundária (PANG; CARDOSA; GUZMAN, 2007). Outros trabalhos também revelam que a habilidade em causar severidade em infecções primárias variam com o sorotipo, demonstrando o possível potencial patogênico de cada sorotipo da dengue (BALMASEDA et al., 2006; NISALAK et al., 2003; VAUGHN et al., 2000).

Em áreas endêmicas, é raro que crianças com menos de 6 meses de vida apresentem-se infectadas pela dengue, indicando que anticorpos maternos são transferidos passivamente para a criança (HALSTEAD et al., 2002; KLIKS et al., 1989). Este tipo de resposta, também, tem sido visto em estudos com camundongos (KAUFMAN et al., 1987; KAUFMAN et al., 1989). O papel do ADE no desenvolvimento da FHD/SCD está fortemente suportado por estudos com crianças que tiveram a incidência aumentada da ocorrência de FHD/SCD em áreas endêmicas entre as idades de 6 a 12 meses (HALSTEAD et al., 2002; KLIKS et al., 1988; NGUYEN et al., 2004).

Em resumo, para se explicar o desenvolvimento da forma hemorrágica, algumas teorias têm sido desenvolvidas. A primeira teoria é a imunológica, de Halstead (HALSTEAD,

1970; HALSTEAD, 1980; HALSTEAD, 1981), em que associa a existência da forma hemorrágica a duas infecções sequenciais, por diferentes sorotipos, com tempo mínimo de 3 anos entre as infecções, quando a resposta imunológica seria amplificada pela segunda infecção em função da existência prévia de anticorpos heterotípicos (ADE). A segunda está relacionadas a uma maior virulência de determinadas cepas do vírus, esta teoria é defendida por Rosen (ROSEN, 1977; ROSEN, 1986). E a terceira, e mais aceita, propõe uma teoria multifatorial, segundo a qual estão envolvidos diversos fatores de risco: individuais (idade, sexo, raça, estado nutricional, pré-existência de enfermidades crônicas, características imunológicas e genéticas do paciente), fatores virais (virulência da cepa circulante, sorotipo viral envolvido em cada evento epidemiológico) e os fatores epidemiológicos (imunidade de grupo, competência vetorial, densidade vetorial, intervalo de tempo entre as infecções por diferentes sorotipos e intensidade da circulação viral) (BALMASEDA et al., 2006; GUBLER, 1998; GUY; ALMOND, 2008; GUZMAN et al., 2002a; GUZMAN et al., 2002b; HALSTEAD et al., 2001; KOURI; GUZMAN; BRAVO, 1987; PANG, 1987; MARTINEZ-TORRES, 1992; MESSER J. et al., 2003; RICO-HESSE et al., 1997; VAUGHN et al., 2000).

1.4 A Vacina

A infecção pelo vírus da dengue tem se tornado difícil de se controlar ou impossível de se erradicar devido a massiva urbanização, superpopulação, saneamento precário, aumento regional e internacional de viagens, falhas nos programas de controle do *A. aegypti*, e emergência global de genótipos mais virulentos do DENV (RICO-HESSE, 2003). Até o momento, não existem vacinas seguras e eficazes contra o dengue, ao contrário de outros membros da família *Flaviviridae*, como febre amarela (YF- Yellow Fever), encefalite japonesa (JE- Japanese Encephalitis) e encefalite transmitida por carrapatos (TBE- Tick-borne Encephalitis) que possuem vacinas bem sucedidas (BARRETT, 2001; CARDOSA., 1998).

A necessidade de se desenvolver uma vacina tetravalente, combinando os quatro sorotipos, é suportada por três importantes fatores epidemiológicos e imunológicos. Primeiramente, a infecção primária com um sorotipo pode induzir proteção prolongada ao sorotipo homólogo, entretanto, a imunidade contra sorotipo heterólogo perdura somente por alguns meses (SABIN, 1952). Segundo, presença de diversos sorotipos circulantes simultaneamente em um mesmo local. Terceiro, o desencadeamento do ADE e

desenvolvimento de dengue hemorrágica devido a presença de anticorpos contra a dengue (GUZMAN et al., 1990; HALSTEAD; NIMMANNITY; COHEN, 1970).

Um obstáculo no desenvolvimento de uma vacina é que estudos com modelos animais ainda são insuficientes para prever como a resposta imune induzida pela vacina iriam interferir com os mecanismos imunopatogênicos da FHD. A ligação direta entre viremia em modelos animais e atenuação fenotípica em humanos também não está claro (HALSTEAD, 1988; HOMBACH, 2007). Modelos animais (macacos) são importantes para testar neurovirulência, viremia e imunogenicidade, e devido às limitações do modelo se faz necessário uma triagem em voluntários humanos para inicialmente associar reatogenicidade, imunogenicidade, e possível proteção. (HOMBACH, 2007). Outro obstáculo está na complexidade de formulação de uma vacina tetravalente e na competição entre os sorotipos que levam a uma resposta imune não uniforme, dificultando desde modo a velocidade do desenvolvimento clínico (BHAMARAPRAVATI; SUTEE, 2000; KANESA-THASAN et al., 2001; SABCHAREON et al., 2002). Um outro problema está na diversidade viral (ROTHMAN, 2004), que resulta em produção de célula T tipo-específico e tipo-cruzado, devido a variação de cepas dentro de um mesmo sorotipo (LIVINGSTON et al., 1995). Estudos para compreensão da imunologia do vírus da dengue são necessários para harmonização e validação dos métodos imunológicos, especialmente para avaliação funcional dos anticorpos neutralizantes (ANTUÑANO; MOTA, 2000).

Enfim, uma vacina ideal contra o vírus da dengue deverá cumprir as seguintes exigências: promover imunização duradoura contra os 4 sorotipos (não causando ADE); ter baixo custo; ter baixa toxicidade (principalmente neuro e hepatotoxicidade) e manter títulos virais no refrigerador ou à temperatura ambiente por 3 dias (BHAMARAPRAVATI; YOKSAN, 1997; KHIN et al., 1994).

Estudos para o desenvolvimento de vacinas contra dengue começaram em 1920, com extratos inativados de mosquitos *Aedes* infectados. Durante a II Guerra Mundial, mais estudos foram realizados utilizando-se passagens virais em células, cientistas militares dos Estados Unidos, incluindo Albert Sabin, encarregaram-se destas pesquisas (HOMBACH, 2007; INNIS; ECKELS, 2003). A primeira vacina bem sucedida foi reportada em 1945 por Sabin e Schlesinger, na qual a cepa havaiana do DEN-1 foi atenuada em cérebro de camundongo por passagens seriadas e então utilizada como vacina para proteger 16 voluntários contra picadas de mosquitos infectados (SABIN, 1952). Atualmente diversas vacinas de dengue estão em fase de desenvolvimento, como: vacinas de vírus vivo atenuado, de vírus inativados ou de subunidades, de vírus quiméricos e de DNA.

1.4.1 Vacinas de Vírus Vivo Atenuado

As vacinas compostas de vírus vivos atenuados baseiam-se na atenuação viral através de passagens sucessivas do vírus em células, que não são de origem do hospedeiro natural, onde a virulência é reduzida devido a uma mutação accidental. O principal inconveniente deste tipo de vacina é a possível reversão da atenuação para a virulência viral (BHAMARAPRAVATI; YOKSAN, 1997; BURKE; MONATH, 2001; FIGUEIREDO, 1999).

Candidatas à vacina atenuada tetravalente têm falhado na indução de imunidade adequada contra os quatro sorotipos de dengue simultaneamente, e isto foi presumivelmente decorrente a interferência da replicação viral entre os quatro sorotipos virais vacinais, resultando na indução de anticorpos preferencialmente para o sorotipo viral de melhor replicação (BLANEY et al., 2005; EDELMAN et al., 2003; KANESA-THASAN et al., 2001; KITCHENER et al., 2006; SABCHAREON et al., 2002).

Vacinas com vírus vivos atenuados têm sido desenvolvidas por cientistas da Universidade do Mahidol (Tailândia). Estas vacinas são baseadas na passagem de cepas humanas virulentas de DENV-1, -2, e -4 em células PDK (Primary Dog Kidney cell - células primárias de rins de cachorro) e DENV-3 em células PGMK (Primary Green Monkey Kidney cell - células primárias de macaco verde). Até o momento foram testados em ensaios clínicos com formulações mono-, bi-, tri-, e tetravalente e os resultados demonstram a detecção de títulos de anticorpos neutralizantes por até 2 anos após a imunização (BHAMARAPRAVATI; SUTEE, 2000). Devido à interferência causada pelo DENV-3, que resultou em supressão dos títulos de anticorpos, 7 diferentes formulações foram testadas em adultos na Tailândia, dentre estas quatro formulações apresentaram níveis aceitáveis de segurança e imunogenicidade (SABCHAREON et al., 2002). Duas dessas formulações (variando na concentração entre os sorotipos para diminuir a interferência entre eles) foram selecionadas para um estudo com crianças da Tailândia, com idades entre 5 e 12 anos. Três doses sequenciais desta vacina resultaram em uma moderada reatogenicidade e alta soroconversão contra os quatro sorotipos do dengue após a última dose (SABCHAREON et al., 2004).

O Instituto de Pesquisa Walter Reed Army (Walter Reed Army Institute of Research, WRAIR) tem utilizado uma estratégia similar para desenvolvimento de uma vacina tetravalente com vírus atenuados. Onde isolados humanos virulentos, de cada sorotipo do vírus da dengue, foram passados em células PDK para atenuação, e diferentes níveis de passagens foram selecionadas para avaliar a atenuação, imunogenicidade, e a capacidade

protetora em modelos animais. As formulações monovalentes demonstraram segurança e imunogenicidade, mas na formulação tetravalente, foi observado interferência entre os sorotipos de dengue (EDELMAN et al, 1994; KANESA-THASAN et al, 2003; SUN et al, 2003). Dezesesseis diferentes formulações tetravalentes foram comparadas em voluntários humanos, e satisfizeram na resposta com relação à indução de anticorpos para, pelo menos, 3 de 4 sorotipos, em um grupo de 3-4 indivíduos, nenhuma formulação induziu resposta tetravalente em todos os indivíduos quando administrado 2 vezes com intervalo de 28 dias (EDELMAN et al., 2003).

1.4.2 Vacinas Vivas Recombinantes

A tecnologia de DNA recombinante tem facilitado o desenvolvimento de vacinas com vírus atenuado para o dengue e outros flavivirus, incluindo Oeste do Nilo, Encefalite Japonesa e Encefalite causada por Carrapato (GUIRAKHOO et al., 1999; GUIRAKHOO et al., 2004; HUANG et al., 2003a; PLETNEV et al., 2002; VENUGOPAL; GOULD, 1994). A possibilidade de produzir flavivírus geneticamente modificado tem possibilitado a construção de vacinas recombinantes, três estratégias têm sido utilizadas para atenuação do vírus: 1- a atenuação molecular do vírus da dengue por introdução de mutações selecionadas, 2- a inserção de genes estruturais da dengue (prM/E) em uma cepa atenuada classicamente do vírus da dengue, e 3- a inserção dos genes prM/E do vírus da dengue na cepa vacinal de febre amarela 17D (HOMBACH, 2007).

A atenuação molecular do vírus da dengue é dificultada pela falta de detalhes na compreensão das bases moleculares da replicação viral e determinantes de virulência que podem ser alvos específicos para atenuação viral (HOMBACH, 2007).

Vacinas quiméricas contra a dengue permitem a introdução de genes do vírus da dengue em outros flavivírus ou no próprio vírus da dengue modificado, como também permite a atenuação viral por modificação específica ou troca dos genes, para isso, busca-se conhecer os critérios moleculares que determinam a virulência dos diferentes sorotipos e genótipos do vírus da dengue (BURKE; MONATH, 2001; CHAMBERS et al., 1997; VENUGOPAL; GOULD, 1994). Esta vacina é denominada de ChimeriVax-DEN, e possui como vetor viral a cepa vacinal do vírus da febre amarela 17D, onde os genes que codificam as proteínas prM e E foram substituídos pelos genes correspondentes do dengue (GUIRAKHOO et al., 2001; GUIRAKHOO et al., 2002; GUIRAKHOO et al., 2004; GUIRAKHOO ET AL, 2006; JOHNSON et al., 2004; LAI; MONATH, 2003). Este mesmo sistema também tem sido

utilizado para o desenvolvimento de outras vacinas quiméricas para flavivírus, como para encefalite japonesa e febre do Oeste do Nilo (ARROYO et al., 2004; BEASLEY et al., 2004; JOHNSON et al., 2003; MONATH et al., 2002).

Em mosquitos, a vacina ChimeriVax-DEN-1-4 demonstrou uma habilidade restrita para replicação no vetor *Aedes* (JOHNSON et al., 2004). Estudos em macacos imunizados com uma formulação tetravalente, contendo uma mistura física de igual concentração para todos os vírus quiméricos monovalente, resultaram em um aumento da resposta imune direcionada para YF/DENV2, situação também demonstrada pela vacina de vírus vivo atenuado desenvolvido pelo Mahidol/Aventis Pasteur (KANESA-THASAN et al., 2001). A dose ajustada para quimera YF/DENV2 resultou em uma resposta mais balanceada contra DENV1, DENV2 e DENV3, mas, no entanto, teve uma elevação na resposta para DENV4 (GUIRAKHOO et al., 2002). Quatro formulações tetravalentes foram testadas em macacos e demonstraram baixos níveis de viremia pós-imunização em todos os macacos, e nas formulações que apresentavam iguais concentrações para os sorotipos (tanto altos títulos, como em baixos títulos) houve soroconversão contra os quatro sorotipos, 92% dos macacos foram protegidos, determinado pela falta de viremia pós-desafio (GUIRAKHOO et al., 2004).

Recentemente, Guy e colaboradores analisaram em macacos *Cynomolgus* a imunogenicidade e viremia induzida por diferentes formulações vacinais, baseadas nas vacinas atenuadas vivas para DENV-1 e DENV-2 derivadas das vacinas construídas pelo Mahidol (SABCHAREON et al., 2002) e na vacina ChimerixVaxDEN1-4 (GUIRAKHOO et al., 2002; GUIRAKHOO et al., 2006). Neste estudo foram utilizados diferentes combinações mono-, bi-, ou tetravalente em uma série de imunizações programadas em diversos experimentos independentes para avaliar a influência de certos fatores na interferência entre os sorotipos. Fatores como a administração simultânea de 2 vacinas bivalentes em locais anatomicamente separados, a administração simultânea de 2 vacinas bivalentes complementares, a influência de uma imunização prévia com um flavivírus heterólogo nas subsequentes imunizações tetravalentes, a adaptação da formulação por diminuição da dose de sorotipos imunodominantes, e o efeito de um “booster” após um ano, foram analisados. Os resultados demonstraram que a interferência entre os quatro sorotipos quimerizados com ChimeriVaxDEN1-4 (CYD1-4), estava relacionada a diferentes habilidades de replicação *in vivo* e/ou a epítomos dominantes, embora seja necessário mais estudos para elucidar o mecanismo pelo qual isto ocorre. Antígenos recombinantes não replicativos podem ser usados para diferenciar entre replicação e/ou interferência ligada à epítomos, e em alguns casos, foi possível demonstrar que é possível modular essas interferências e conseguir induzir resposta

immune em animais para todos os sorotipos (GUY et al., 2009).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças – CDC (Centers for Disease Control and Prevention) também tem desenvolvido uma candidata a vacina tetravalente quimérica recombinante, baseada na atenuação por mutação em genes não estruturais do DENV-2 (HUANG et al., 2003), onde genes prM/E de sorotipos selvagens de DENV-1, -3 e -4 são clonados no DENV-2 atenuado. Esta vacina tem demonstrando boa imunogenicidade e baixa viremia em camundongos, porém nas formulações tetravalentes foram observados interferência viral entre os quatro sorotipos de dengue (HUANG et al., 2003).

O NIH (National Institutes of Health) tem desenvolvido uma outra possível candidata a vacina geneticamente atenuada através da deleção de 30 nucleotídeos da região 3' UTR do vírus DENV-4, denominado de rDEN4 Δ 30. Estudos de fase I/II em humanos com esta vacina demonstraram ser segura, com baixa viremia na infecção, imunogênica, reatogenicidade mínima, e sem efeitos adversos sérios (BLANEY et al., 2005; DURBIN et al., 2001; DURBIN et al., 2005). Outras duas estratégias baseada no vírus rDEN4 Δ 30 foram desenvolvidas pelo mesmo grupo: 1) incorporação da deleção Δ 30 nos vírus selvagem DENV-1, DENV-2 e DENV-3, resultando nos vírus recombinantes rDEN1 Δ 30, rDEN2 Δ 30 e rDEN3 Δ 30, e 2) construção de vírus quiméricos através da clonagem das regiões dos gene prM/E de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 no vírus atenuado geneticamente, rDEN4 Δ 30, gerando os vírus rDEN1/4 Δ 30, rDEN2/4 Δ 30 e rDEN3/4 Δ 30 (BLANEY et al., 2006). Os vírus DEN1 Δ 30 e DEN4 Δ 30 foram testados como formulações monovalentes em adultos jovens da Universidade de Johns Hopkins demonstrando segurança e alta imunogenicidade (DURBIN et al., 2005; DURBIN et al., 2006a). A fase clínica I com estes mesmos vírus tem se mostrado segura, clinicamente bem tolerada, imunogenicidade robusta, e geneticamente estável, em voluntários americanos adultos depois de uma simples inoculação (BLANEY et al., 2006; DURBIN et al., 2001). Infelizmente, os vírus rDEN2 Δ 30 e rDEN3 Δ 30 não apresentaram o fenótipo de atenuação satisfatório e não foram testadas em humanos (BLANEY et al., 2004a; BLANEY A et al., 2004b). Uma estratégia alternativa foi o desenvolvimento de um vírus quimérico para DENV-2 e DENV-3 com o vírus rDEN4 Δ 30, destas novas construções resultaram os vírus rDEN2/4 Δ 30 e o rDEN3/4 Δ 30 (BLANEY et al., 2004a; WHITEHEAD et al., 2003). A vacina quimérica rDEN2/4 Δ 30 tem sido testada em humanos e apresentou-se segura e fortemente imunogênica (DURBIN et al., 2006b), já o vírus rDEN3/4 Δ 30 está sendo avaliado clinicamente (BLANEY et al., 2004a; BLANEY et al., 2005). Blaney e colaboradores vêm testando mais duas estratégias para produzir uma candidata a vacina atenuada para DENV3. Numa das estratégias foram introduzidas deleções nas regiões 3' UTR

do DENV3, quatro de nove protótipos mutados replicaram eficientemente em células vero e foram geneticamente estáveis. A outra estratégia envolve o vírus quimérico rDENV3 que foi gerado pela substituição da região 3'UTR do cDNA rDEN3 por rDEN4 ou rDEN4Δ30, produzindo rDEN3-3'D4 e rDEN3-3'D4Δ30. Macacos imunizados com os vírus mutantes produziram infecção sem viremia detectável e induziram uma forte resposta por anticorpo neutralizante, capaz de conferir proteção quando desafiado com DENV3 (BLANEY, 2008). Em um estudo em macacos rhesus utilizando a formulação tetravalente contendo os vírus DEN1Δ30, rDEN2/4Δ30, rDEN3/4Δ30 e DEN4Δ30 foi demonstrado uma ausência de interferência entre os sorotipos, e uma proteção contra todos os sorotipos durante o desafio (BLANEY et al., 2005; BLANEY et al., 2006).

1.4.3 Vacinas Inativadas e de Subunidades

Vacinas inativadas para o vírus da dengue são compostas de vírus crescidos em cultivo celular e inativados com formol. Estas vacinas apresentam o inconveniente de serem menos imunogênicas devido a não replicação viral (FIGUEIREDO, 1999). Contrastando com a vacina atenuada, as vacinas inativadas e de subunidades proteicas requerem múltiplas inoculações, apresentam imunogenicidade de curto tempo, e falham na indução robusta do MHC-I restrito a imunidade de célula T que contribui para uma completa proteção contra dengue (CARDOSA., 1998). Outro inconveniente é a necessidade de se concentrar os materiais contendo os vírus inativados, o que dificultam e encarecem a produção deste tipo de vacina (BURKE; MONATH, 2001; CHAMBERS et al., 1997). Diversas formulações vacinais com vírus inativados purificados (Purified Inactivated Virus – PIV) têm sido testadas em macacos rhesus vacinados com vacinas inativadas de DENV-2 e múltiplos adjuvantes, as diferentes vacinas testadas não foram reatogênicas e estimularam anticorpos neutralizantes depois de uma ou duas doses (ROBERT PUTNAK et al., 2005).

Entre as vacinas de subunidades proteicas a que está em estágio mais avançada é a vacina desenvolvida pelo Hawaii Biotech Inc., esta vacina é desenvolvida num sistema de expressão em *Drosophila* S2 e é constituída por 80% da proteína E em combinação com NS1. Macacos rhesus inoculados com esta vacina apresentaram altíssimos títulos de anticorpos neutralizantes após a terceira dose, e proteção durante o desafio com os vírus DENV-2 e DENV-4. Este mesmo grupo tem utilizado esta mesma estratégia para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus Oeste do Nilo, as quais induziram altos títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos (LIEBERMAN et al., 2007).

Outra vacina de subunidade vem sendo desenvolvida pelo Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia em Havana, onde subunidades estruturais da proteína E (domínio III) foram fusionadas a proteína carreadora P64k meningocócica e produzida em sistema de expressão bacteriana em *E.coli* (*Escherichia coli*). As vacinas candidatas produzidas para todos os sorotipos da dengue foram capazes de gerar altos títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos e significativa proteção contra o desafio letal para cada sorotipo do dengue (HERMIDA et al., 2004; HERMIDA et al., 2006; IZQUIERDO et al., 2008; LAZO et al., 2009; ZULUETA et al., 2006).

Camundongos inoculados com peptídeos sintéticos da proteína E de DENV-2 apresentaram uma resposta imune humoral elevada e os anticorpos produzidos durante esta imunização protegeram os animais durante o desafio viral (LECLERC et al., 1993; PUTNAK et al., 2003; ROEHRIG et al., 1994).

1.4.4 Vacina de DNA

As vacinas de DNA são estáveis e com baixo custo para produção e transporte, facilitando sua introdução em áreas endêmicas de dengue (KONISHI; KOSUGI; IMOTO, 2006). A maioria das vacinas de DNA desenvolvidas contra a dengue consistem na clonagem do DNA complementar (cDNA) da região que codifica os genes estruturais prM e E do vírus da dengue em vetores plasmídeos (APT et al., 2006; BLAIR et al., 2006; CHANG et al., 2001; DONNELLY et al., 1997; IMOTO; KONISHI, 2007; KONISHI et al., 2000a; KONISHI; KOSUGI; IMOTO, 2006; PUTNAK et al., 2003; RAVIPRAKASH et al., 2001; RAVIPRAKASH et al., 2006).

Kochel e colaboradores inocularam um plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína E de DENV-2 em ratos e observaram a produção de anticorpos neutralizantes contra este vírus (KOCHEL et al., 1997). Ocazione Jimenez e colaboradores descreveram a ausência de resposta por anticorpos e ausência de resposta mediada por IFN- γ ou IL-4 após três imunizações, via intramuscular, com 100 μ g de DNA codificante da proteína E do DENV-2 (OCAZIONEZ JIMENEZ; LOPES DA FONSECA, 2000). Konishi e colaboradores detectaram um título 10 de neutralização viral após três imunizações com 100 μ g de DNA codificante da fusão preM/E do DENV-2 (KONISHI et al., 2000a). Já Raviprakash e colaboradores descrevem um título de 40 de neutralização viral após três imunizações com 100 μ g de DNA codificante da fusão preM/E do DENV-1 (RAVIPRAKASH et al., 2001).

A técnica de triagem randômica de DNA é uma poderosa tecnologia que tem sido

utilizada para gerar antígenos quiméricos da dengue, nos quais se pode realizar a combinação de epítomos neutralizantes de todos os sorotipos da dengue. Com base nesta triagem, tem sido desenvolvida uma vacina quimérica tetravalente, onde epítomos localizados nos genes das proteínas prM e E dos quatro sorotipos foram clonados em vetor de expressão em células de mamífero. Testes realizados em macacos rhesus demonstraram que esta vacina foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos (RAVIPRAKASH et al., 2006).

A proteína não estrutural NS1 também tem sido utilizada no desenvolvimento de vacinas de DNA (LIN et al., 2008; TIMOFEEV; BUTENKO; STEPHENSON, 2004; WU et al., 2003; ZHANG et al., 1988). Ratos inoculados com uma vacina de DNA contendo o gene NS1 do DENV2 geraram resposta imune celular e humoral, e imunidade protetora após o desafio com o vírus DENV-2 isolado de Taiwan (WU S et al., 2003). Em uma outra vacina de DNA utilizando o gene da proteína NS1 do DENV-2 fusionado a uma sequência sinal secretória ativadora de plasminogênio tecidual humano (t-PA) demonstrou induzir altos níveis de anticorpos NS1 específicos. Esta candidata protegeu camundongos imunizados contra o desafio feito com DENV-2, indicando uma memória imunológica com rápida e forte resposta imune secundária (COSTA; FREIRE; ALVES, 2006). Lin e colaboradores demonstraram que a proteína NS1 do vírus da encefalite japonesa sintetizada em *E. coli* foi também capaz de induzir resposta imune protetora em ratos (LIN et al, 2008).

Apesar dos esforços supracitados, o desempenho das vacinas de DNA desenvolvidas até o momento não foram satisfatório para a indução de anticorpos neutralizantes suficientes para gerar uma resposta imune eficaz e duradoura contra os quatro sorotipos de dengue simultaneamente. A ineficiência destas estratégias de vacinação está muito provavelmente relacionada ao mecanismo de apresentação destes antígenos ao sistema imune dos hospedeiros. Isto se deve ao fato de que a maioria dos antígenos produzidos endogenamente, característicos das vacinas de DNA, serem sequestrados e apresentados ao sistema imune do hospedeiro por moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe I (Major Histocompatibility Complex class I, MHC I) (RAVIPRAKASH et al., 2001). A via MHC I de processamento e apresentação antigênica está mais associada à resposta celular citotóxica, não estimulando uma resposta humoral adequada para a geração de altos títulos de anticorpos neutralizantes, essenciais para uma resposta eficiente contra infecções virais (AKBARI et al., 1999; MORENO et al., 1991) (Figura 4).

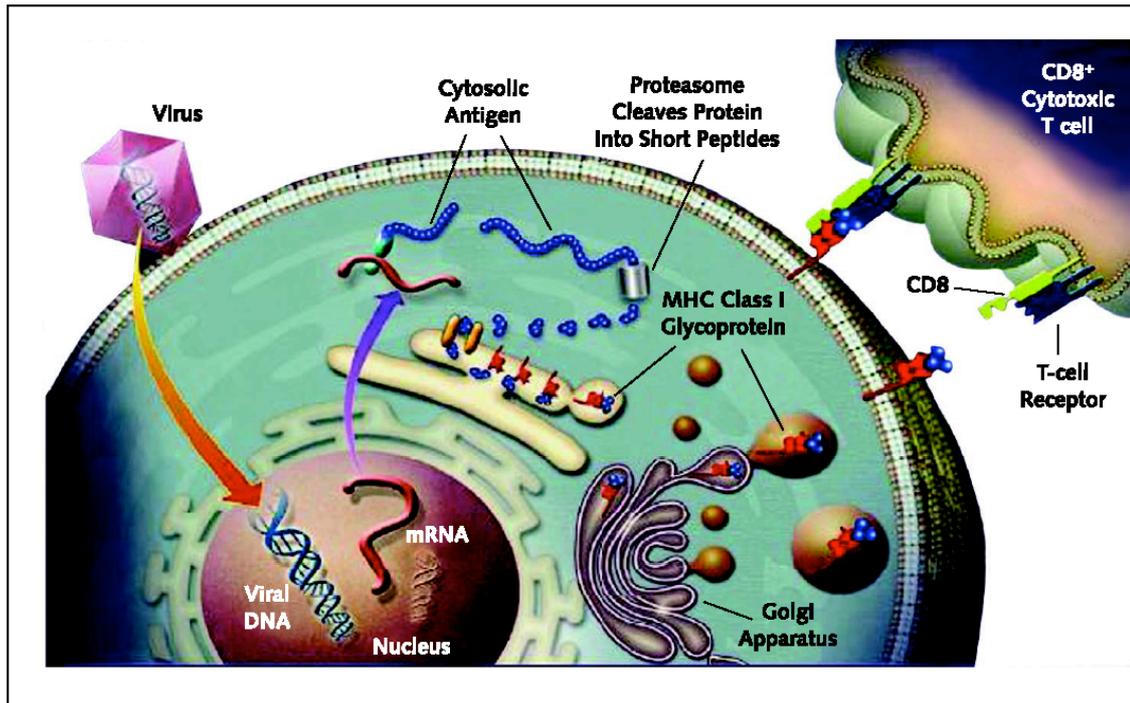


Figura 4- Resposta imune via MHC I.

Nota: Novas proteínas virais sintetizadas no citoplasma de uma célula infectada são degradadas em peptídeos que são transportados para o retículo endoplasmático e, em seguida, ao Golgi aparelho. Peptídeos recém-sintetizados se ligam a moléculas do MHC I, o complexo é então expresso na superfície da célula, onde, na presença de moléculas acessórias, ligam-se a receptores de células T CD8. Esta ligação resulta na ativação de linfócitos T citolíticos.

Fonte: SRIVASTAVA; LIU, 2003.

Para uma resposta imune vacinal satisfatória, com alta produção de anticorpos neutralizantes, é crítico que os antígenos sejam apresentados a células do tipo T helper CD4⁺ por moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe II (Major Histocompatibility Complex class II, MHC II). O processamento e apresentação de antígenos por moléculas MHC II, entretanto, é convencionalmente desencadeado por células apresentadoras de antígenos (Antigen-Presenting Cell – APCs) ativadas pela endocitose ou fagocitose de antígenos extracelulares. Esta via metabólica, por sua vez, pode não funcionar eficientemente em células transfectadas com vacinas de DNA, pois a síntese dos antígenos ocorre intracelularmente (RAVIPRAKASH et al., 2001). Para que estes antígenos sejam dirigidos a moléculas de classe II, ao invés de classe I, é necessário que estas proteínas sejam fusionadas a peptídeos sinais que as direcionem para o compartimento lisossomal da célula, visando sua degradação e apresentação via MHC II. Desta forma, apesar da expressão intracelular das vacinas de DNA, é possível desviar a apresentação do antígeno da via MHC I convencional para a via MHC II propiciando desde modo a resposta por células T auxiliar CD4⁺. A ativação de células T auxiliar CD4⁺, via MHC II, é vital para a função das vacinas genéticas como já foi demonstrado em estudos de deleção do MHC II (CHAN et al., 2001) ou

de células CD4⁺ em camundongos (MAECKER et al., 1998). A resposta mediada por MHC II inclui a ativação de CD8⁺, no qual requer células T auxiliar CD4⁺ para expansão secundária e desenvolvimento de memória (JANSSEN et al., 2003) (Figura 5).

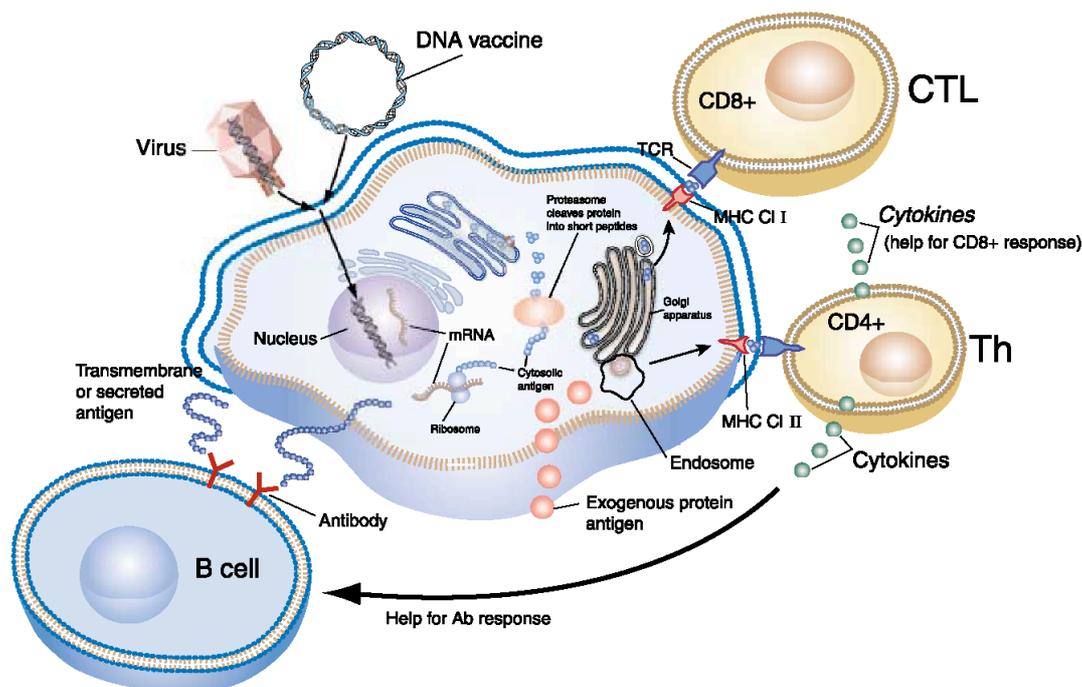


Figura 5- Descrição do mecanismo de geração de resposta celular e humoral.

Nota: Células apresentadoras de antígenos reconhecem um antígeno exógeno dentro de vesículas endossomais. A proteína é degradada em peptídeos que se associam ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II para então serem exibidas na superfície da célula. Células T CD4⁺ reconhecem esse complexo antígeno/MHC II e são ativadas para produzir citocinas. Essas citocinas têm inúmeras atividades, incluindo, dependendo das citocinas, contribuição na ativação de células B em células produtoras de anticorpo, e ajudando na resposta de linfócitos T CD8⁺. Ativação de CD8⁺ geralmente é dependente do mecanismo de processamento de antígeno reservado por proteínas intracitoplasmáticas que são degradadas em peptídeos que se associam com moléculas sintetizadas novamente do MCH de classe I. Este complexo, quando se apresenta na superfície da célula apresentadora de antígeno em conjunto com moléculas coestimulatórias, resultam na ativação de células T CD8⁺. Para resposta por anticorpo, células B reconhecem e repondem ao antígeno que são apresentados extracelularmente, ou exposto por ligação com proteínas transmembrana.

Fonte: LIU, 2003.

Processos como: mudança de classe de anticorpos, expansão clonal de células B antígeno específicos, expansão de células T e formação de células de memória, requerem principalmente sinais coestimulatórios e citocinas liberadas por células T auxiliar CD4⁺ antígeno-ativadas (KAECH; WHERRY; AHMED, 2002).

Alguns trabalhos demonstraram que a coexpressão de sequências imunoestimulatórias, adjuvantes e sequências direcionadoras de antígenos fusionada junto a sequências

codificadoras de antígenos ajudam no realce da resposta imunológica, tanto celular como humoral, gerada pelas vacinas de DNA (PORTER et al., 1998; RAVIPRAKASH et al., 2001).

1.5 Estratégias para Realçar da Resposta Imune

1.5.1 LAMP

A possibilidade de direcionamento de antígenos, produzidos endogenamente, para o processamento via MHC II foi firmemente reforçada após a descoberta de uma proteína transmembrana do tipo I denominada de “Lysosome-Associated Membrane Protein” – LAMP (CHEN et al., 1985a). LAMP é uma proteína que se liga a membrana externa do lisossomo através de sua sequência carboxi-terminal YXXØ, presente numa cauda citoplasmática de 11 aminoácidos (GUARNIERI et al., 1993; OBERMULLER et al., 2002; ROHRER et al., 1996). O tráfego intracelular de LAMP inclui compartimentos multilaminares especializados de APCs imaturas, chamados MIIC e CIIV, onde ocorre o processamento e formação dos complexos peptídeos antigênicos/MHC II (DRAKE et al., 1999; KLEIJMEER et al., 1997; TURLEY et al., 2000). A constatação da colocalização das moléculas LAMP e MHC II vem servindo como suporte para a utilização de antígenos quiméricos, contendo as sequências alvos de LAMP, visando o direcionamento do processamento antigênico para o compartimento MHC II. Diversos trabalhos vem demonstrando que os antígenos fusionados ao LAMP (antígeno/LAMP) são capazes de gerar uma maior atividade proliferativa de linfócitos antígeno específicos, altos títulos de anticorpos e intensa atividade T citotóxica em relação aos antígenos selvagens não fusionados ao LAMP em estudos com camundongos, macacos e estudos clínicos em humanos (ANWAR et al., 2005; LIN et al., 1996; LU et al., 2003; RAVIPRAKASH et al., 2001; ROWELL et al., 1995; RUFF et al., 1997; SU et al., 2002; WU et al., 1995).

Raviprakash e colaboradores construíram uma vacina expressando prM e E do DENV-2, onde a região transmembrana e citoplasmática da proteína E foi substituída pelo LAMP, mostrando que camundongos imunizados responderam com elevado nível de anticorpos neutralizantes quando comparados com os ratos imunizados com uma construção sem a proteína LAMP e a coimunização com um plasmídeo expressando GM-CSF (Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor) realçou a resposta humoral (RAVIPRAKASH et al.,

2001). Lu e colaboradores demonstraram que 50 μ g de DNA (prM/E quimerizado com proteína LAMP) foi capaz de induzir 100% de neutralização na diluição 1:20 e depois de 8 meses da imunização com pD2/LAMP, aumentando os títulos de anticorpos neutralizantes para mais de 640 (LU et al., 2003).

1.5.2 Otimização Gênica

Uma outra estratégia utilizada para realçar a expressão de antígenos pelas vacinas de DNA tem sido a otimização de sequências de proteínas. Esta tecnologia envolve a modificação de uma dada sequência antigênica, através da substituição de códons que são raramente reconhecidos pela maquinaria de síntese de proteínas celulares por códons que são mais comumente reconhecidos (TSEN et al., 2007). O chamado “codon usage”, refere-se à escolha de códons mais comuns ao organismo produtor da proteína heteróloga. Neste caso, se um gene for expresso significativamente diferente do normal para este organismo, a concentração de RNA transportador para o códon menos usado se torna insuficiente para uma tradução adequada do RNA heterólogo. Por exemplo, o códon arginina AGA é um códon comum em eucarióticas, mas extremamente raro em *E. coli* (DE BÔER; KASTELEIN, 1986; ZHANG; ZUBAY; GOLDMAN, 1991). Por esta razão, quando um gene eucariótico é expresso em *E. coli* sem uma melhora no “codon usage”, a ocorrência de códons AGA é rapidamente esgotado. A competição pelo RNA transportador raro também pode ter um efeito adverso na expressão de genes do hospedeiro ou provocar uma resposta insatisfatória (CALDERONE; STEVENS; OAS, 1996). Erros de tradução durante a síntese protéica são fenômenos bem comuns (PARKER, 1989), eles podem ter diversos efeitos diferentes incluindo mudança na matriz de leitura (SPANJAARD et al, 1990), proteína truncada prematuramente, baixa expressão (BRINKMANN; MATTES; BURKEL, 1989; ROSENBERG, 1993), fracasso, finalização e substituição de aminoácidos (KANE, 1995). Além do “codon usage”, a otimização também leva em consideração outros parâmetros como sequências repetitivas, estrutura do RNA mensageiro, conteúdo de GC, presença e/ou ausência de sítios de restrição, sítios de splicing, otimização da origem de leitura (ORF), etc. A utilização de sequências otimizadas em vacinas de DNA resultam na maior expressão do antígeno, melhor interação de APCs com células T e conseqüentemente resposta imune mais robusta (TSEN et al., 2007). Trabalhos que utilizam a otimização de genes têm demonstrado uma melhor expressão dos genes que foram submetidos à otimização (BURGESS-BROWN et al., 2008; CHUAN; HMIDDELBERG, 2008).

O avanço tecnológico tem possibilitado o desenvolvimento de software capazes de realizar cálculos baseados em algoritmos que combinam os parâmetros citados acima para desenvolver uma sequência otimizada com custo efetivo e em um curto espaço de tempo (BURGESS-BROWN et al., 2008). Através desses programas, está sendo possível desenhar sequências sintéticas de DNA, de acordo com o organismo no qual será produzido, gerando um equilibrado e elevado nível de expressão protéica (BURGESS-BROWN et al., 2008).

Enfim, apesar das vacinas de DNA serem pouco imunogênicas, as vacinas de DNA para flavivírus quimerizadas com a proteína LAMP têm se mostrado altamente promissoras em estudos pré-clínicos (ANWAR, 2005; LU, 2003; RAVIPRAKASH, 2001). O direcionamento do processamento antigênico para o compartimento MHC II auxilia na potencialização da resposta deste tipo de vacina. Aliado a esta estratégia, contamos ainda com a otimização gênica, que se baseia na troca de códons, sem alterar a sequência de aminoácidos, isto resulta num aumento na expressão do antígeno, colaborando na melhora da imunogenicidade da vacina de DNA. Deste modo, o presente projeto visa desenvolver uma vacina de DNA contra o sorotipo 3 do vírus da dengue através da otimização gênica e fusionamento dos genes prM/E de um isolado brasileiro do DENV3 ao LAMP, na busca de obter uma melhor resposta imunológica contra este vírus e no futuro colaborar no desenvolvimento de uma vacina tetravalente eficaz e segura contra a dengue.

2 JUSTIFICATIVA

A dengue é hoje um problema de saúde pública de grande importância mundial. Estima-se entre 50 a 100 milhões de pessoas sejam infectadas com o vírus da dengue a cada ano. A forma mais utilizada para o controle da dengue atualmente, é através do combate aos mosquitos transmissores. Contudo, o controle e a erradicação do dengue através do combate ao vetor tem se tornado cada vez mais difícil devido à superpopulação, ao crescimento urbano e ao grande aumento das viagens domésticas e internacionais. Diante deste contexto, a estratégia ideal para o controle do vírus da dengue é o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra este vírus.

No Departamento de Virologia e Terapia Experimental localizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM-Fiocruz, tem-se trabalhado no desenvolvimento de vacinas quiméricas de DNA, através da utilização da proteína LAMP (Lysosome-Associated Membrane Protein), que direciona o antígeno para o lisossomo, resultando num aumento do nível de expressão de antígenos de classe II e conseqüentemente maior ativação de células CD4+. Esta tecnologia de direcionamento de antígenos tem mostrado excelentes resultados com antígenos do DENV2, Febre do Oeste do Nilo, Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus – HIV), Síndrome Respiratória Aguda Grave (Severe Acute Respiratory Syndrome – SARS) entre outros.

Assim, devido: i. a alta eficiência da vacina quimérica de DNA contendo a proteína LAMP; ii. a utilização de genes sintéticos otimizados; iii. a experiência do grupo nessa área de pesquisa; iv. a necessidade do desenvolvimento de uma vacina tetravalente eficaz e segura contra o vírus da dengue; v. ausência de dados utilizando-se esta tecnologia para o vírus da dengue tipo 3, nos propomos neste estudo, encontrar a melhor forma de expressão protéica para auxiliar, futuramente, no desenvolvimento de uma vacina de DNA quimérica contra o vírus da dengue tipo 3.

3 PERGUNTA CONDUTORA

É possível direcionar e melhorar a resposta imune contra o vírus da dengue através da otimização gênica e fusão dos genes das proteínas prM/E ao LAMP?

4 HIPÓTESE

A utilização da otimização genética e o fusionamento das proteínas prM/E do sorotipo 3 da dengue ao LAMP (antígeno/LAMP) são capazes de gerar uma maior produção de antígeno e uma melhor resposta imunológica, respectivamente, e conseqüentemente uma resposta humoral e celular mais robusta. Auxiliando no desenvolvimento de uma vacina de DNA quimérica contra o DENV-3.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Construir e analisar a expressão dos genes que codifiquem as proteínas prM/E do vírus da dengue do sorotipo 3, clonados em vetores plasmidiais capazes de direcionar a expressão do antígeno para o compartimento lisossomal celular.

5.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar os códons das proteínas prM/E do DENV-3 utilizando o programa LETO 1.0;
- b) Clonar os genes que codificam as proteínas prM/E do DENV-3, selvagem e otimizados, num vetor que contém a região c-terminal da proteína LAMP, para a obtenção das respectivas proteínas quiméricas;
- c) Avaliar o nível de expressão das proteínas prM/E selvagem e prM/E otimizada, fusionada ao LAMP, em células eucariontes;
- d) Analisar o tráfego celular das proteínas prM/E fusionadas ao gene da proteína LAMP através da microscopia confocal.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cultivo de células e vírus

Células HEK-293 (Human Embryonic Kidney cells) foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% de 2 mM L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 1% de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina, Gibco), em estufa 37°C com 5% de CO₂.

Como controle positivo de expressão das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 3, nos ensaios de imunofluorescência, confocal e Western Blot, foram utilizadas células HEK-293 infectadas com quimera de febre amarela e dengue sorotipo 3 (YFV-DENV3, Clone #3) (GIL et al., dados não publicados), no qual a região dos genes que expressam as proteínas prM/E do vírus da febre amarela foram substituídas pela região prM/E do vírus da dengue sorotipo 3.

6.2 Construção dos plasmídeos

6.2.1 Plasmídeos contendo os genes que codificam as proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 3 não fusionados (p43-DENV3-prM/E) e fusionados ao LAMP (p43-DENV3-prM/E-LAMP)

6.2.1.1 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E

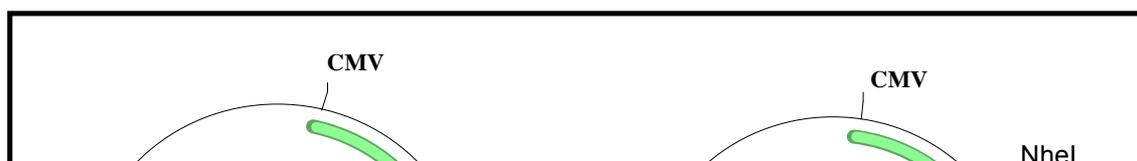
A sequência de DNA entre os nucleotídeos 369 e 2413 do sorotipo 3 do vírus da dengue foi amplificada por PCR utilizando como molde o plasmídeo pBSC-DENV3, que contém o genoma completo do sorotipo 3 do vírus da dengue isolado no Brasil (GIL et al., dados não publicados). Esta região amplificada compreende a sequência carboxi-terminal do capsídeo, responsável pela translocação da proteína prM para dentro do lúmen do retículo endoplasmático, o gene das proteínas pré-membrana e envelope do DENV-3. Para 50µl de reação de PCR são utilizados 1X do tampão de PCR, 200 µM de cada dNTP, 1U da enzima TGO Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 pmol de primers específicos

(DENV3-369F – 5'ACCGCCTAGGGCCACCATGGTGA GCATAATCAACAAACG 3' e DENV3-ER – 5'ACCGGAATTCTCAAGCTTGCAC CACAGTCCCA 3') e 50 ng de DNA molde (plasmídeo pBSC-DENV3). Os oligonucleotídeos sense utilizados continham, além da sequência para a amplificação do gene, um sítio de restrição específico para a clonagem do gene ao vetor e a sequência Kozak (5'-GCCACC-3') seguida do códon ATG de inicialização. Os oligonucleotídeos antisense eram compostos da sequência para a amplificação do gene seguidos por um códon de finalização (Stop codon) e de um sítio de restrição enzimática específico. As condições de PCR foram: 5 min. à 94°C para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos, cada ciclo composto de 30 seg de desnaturação à 94°C, 30 seg de anelamento à 55°C e 2 min de extensão a 72°C, seguidos de 10 min finais de extensão a 72°C.

Posteriormente, o produto de PCR foi purificado através do kit MinElute™ PCR Purification (Qiagen, Valencia, CA), e clonado ao vetor pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI) para facilitar a clonagem ao vetor de expressão p43.2 (Figura 6A). O plasmídeo gerado com a clonagem ao pGEM-T easy foi digerido com as enzimas AvrII e NotI (*New England BioLab*_{in.}, Ipswich, MA) e posteriormente o produto da digestão foi inserido no plasmídeo p43.2 entre os sítios de clivagem NheI e NotI (*New England BioLab*_{in.}, Ipswich, MA), gerando o plasmídeo p43-DENV3-prM/E (Figura 9A).

6.2.1.2 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP

A sequência de DNA entre os nucleotídeos 369 e 2284 do sorotipo 3 do vírus da dengue foi amplificada por PCR utilizando os primers DENV3-369F (descrito acima) como primer sense, e como primer antisense DENV3-2284R (5'CCGGAATTCAGAGACTCCACTGAA TAGGGCTG). O primer antisense utilizado nesta construção era composto da sequência para a amplificação do gene e de um sítio de restrição específico. As condições de PCR foram as mesmas utilizadas acima. Nesta construção o domínio transmembrana da porção carboxi-terminal da proteína E (129 pares de base finais) foi substituído pelo domínio transmembrana c-terminal da proteína LAMP-1 (35 aminoácidos) contida no plasmídeo p43 HIVhumanLAMP/Gag (CHIKHLIKAR et al., 2004) (Figura 6B).



A

B

Figura 6- Mapas dos plasmídeos utilizados nas clonagens.

Nota: **A.** Plasmídeo p43.2, **B.** Plasmídeo p43HIVhumanLAMP/Gag. CMV- promotor ; n-LAMP- região N-terminal de LAMP; c-LAMP- região c-terminal de LAMP; AmpR- marca de resistência a ampicilina; NheI, NotI e EcoRI- enzimas de restrição.

Fonte: Adaptado pela autora.

Posteriormente o produto de PCR amplificado foi purificado e digerido com as enzimas AvrII e EcoRI (*New England BioLab_{inc.}*, Ipswich, MA) e inserido no plasmídeo p43 HIVhumanLAMP/Gag entre os sítios de clivagem NheI e EcoRI (*New England BioLab_{inc.}*, Ipswich, MA). Resultando no fusão do produto de PCR (contendo a região entre os nucleotídeos 369 e 2284) com a região c-terminal da proteína LAMP. O presente plasmídeo construído foi denominado de p43-DENV3-prM/E-LAMP (Figura 9B).

6.2.2 Plasmídeos contendo os genes otimizados das proteínas prM/E do sorotipo 3 do vírus da dengue não fusionados (p43-DENV3-prM/E-opt) e fusionados ao LAMP (p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP)

6.2.2.1 Otimização das sequências dos genes prM/E do vírus da dengue sorotipo 3

A otimização das sequências entre os nucleotídeos 369 e 2284, que compreendem a porção carboxi-terminal do capsídeo e os genes estruturais prM e E (sem a porção C-terminal, como referido acima) do sorotipo 3 do vírus da dengue isolado no Brasil (GenBank AY038605) foi realizada através do programa LETO 1.0 (Entelechon GmbH, versão 1.0.11), este programa combina a troca de códons de uma dada sequência de DNA sem alterar a sequência original de aminoácidos. O programa realiza um conjunto de cálculos complexos

sobre a estrutura do RNA, resultando na modificação de sequências de nucleotídeos através da substituição de códons que são raramente reconhecidos pela maquinaria de síntese de proteína celular por códons que são mais comumente reconhecidos, este tipo de substituição resulta no realce da expressão do antígeno. As sequências otimizadas são adaptadas à expressão em um organismo alvo (por exemplo, *humanos*), levando em consideração diversos parâmetros biológicos, como minimização dos “codons usage” entre vírus e humanos, que através de mutações silenciosas pontuais, são capazes de alterar os códons sem alterar a sequência final do aminoácido. Outros parâmetros como o número de sequências repetitivas, a estrutura do mRNA, o conteúdo de GC, a presença e/ou ausência de sítios de restrição, sítios de splicing e otimização da origem de leitura (ORF) também podem ser avaliados através do Leto 1.0.

Para as estratégias de clonagens, foram adicionadas à sequência otimizada sítios para enzimas de restrição (para sua clonagem à plasmídeos), fragmento de Kozac, códon de iniciação (ATG), e códon de finalização (stop codon, TGA) (Figura 7).

A sequência otimizada gerada pelo programa Leto 1.0 (ANEXO A), foi enviada para síntese comercial (GENEART Inc, Regensburg, Deutschland). Os genes otimizados foram sintetizados e clonados no vetor pGA15, gerando o plasmídeo sintético pGA15-DENV3-prM/E-opt (Figura 8). Após o recebimento, o pGA15-DENV3-prM/E-opt foi transformado em bactérias *E. coli* cepa K12TB1 por choque térmico, e crescido em meio LB (Luria Bertani) com canamicina 50 mg/mL. A extração do DNA plasmídeo foi realizada através do kit Midi prep QIAGEN (QIAGEN, Valencia, CA).

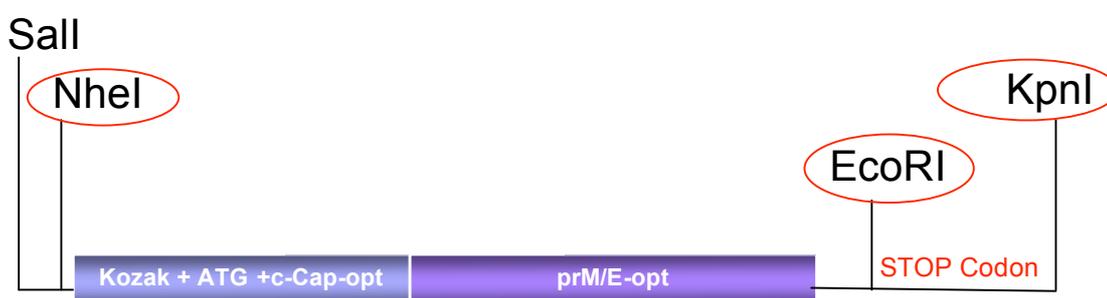


Figura 7- Sequência da proteína otimizada.

Nota: Kozac – Fragmento de Kozac; ATG – códon iniciador; c-Cap-opt – porção c-terminal do capsídeo; prM/E-opt – proteínas prM e E (sem a porção c-terminal) otimizadas; Stop Codon – códon de finalização; Sall, NheI, EcoRI, KpnI – enzimas de restrição.

Fonte: Adaptado pela autora.

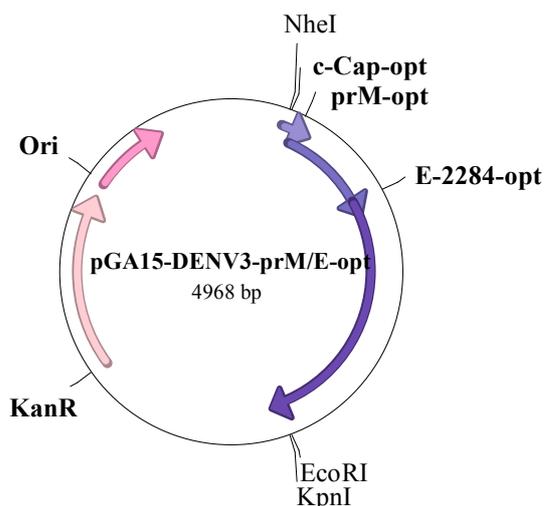


Figura 8- Mapa do plasmídeo sintético pGA15D-DENV3-prM/E-opt.

Nota: Ori – origem; c-Cap-opt – porção c-terminal do capsídeo otimizado; prM-opt – gene da proteína M otimizados ; E-2284-opt – proteína E otimizada (sem a porção c-terminal); NheI, EcoRI, KpnI – enzimas de restrição; KanR - marca de resistência a canamicina.

Fonte: Adaptado pela autora.

6.2.2.2 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt

Para a construção do plasmídeo p43-DENV3-prME-opt (Fig 9C), o plasmídeo sintético pGA15D-DENV3-prM/E-opt foi digerido com as enzimas de restrição NheI e KpnI (*New England BioLab_{inc.}*, Ipswich, MA) e posteriormente clonado no plasmídeo p43 HIVhumanLAMP/Gag (CHIKHLIKAR *et al.*, 2004) entre os sítios NheI e KpnI (*New England BioLab_{inc.}*, Ipswich, MA). O fragmento clonado compreende as sequências otimizadas, entre os nucleotídeos 369 e 2284 do vírus da DENV3, seguido de um codon de finalização. Esta sequência codifica a porção C-terminal do capsídeo, e as proteínas estruturais prM e E (sem a porção carboxi-terminal).

6.2.2.3 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP

Para a construção do plasmídeo p43-DENV3-prME-opt-LAMP (Figura 9D), o plasmídeo sintético pGA15D-DENV3-prM/E-opt foi digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI (*New England BioLab_{inc.}*, Ipswich, MA), referente a sequência de nucleotídeos entre 369 e 2284 do DENV-3 e subclonado no plasmídeo p43 HIVhumanLAMP/Gag entre os sítios NheI e EcoRI (*New England BioLab_{inc.}*, Ipswich, MA). O fragmento clonado compreende as sequências otimizadas, entre os nucleotídeos 369 e 2284 do vírus da DENV3, sem o códon de finalização. Com isto, o gene das proteínas DENV3-prM/E-opt se liga *in*

frame com a sequência c-terminal da proteína LAMP, resultando deste modo no fusão dos genes prM/E otimizados a sequência c-terminal da proteína LAMP.

6.2.3 Sequenciamento

Todas as construções realizadas foram, posteriormente, sequenciadas para a confirmação da qualidade/identidade dos genes clonados e fusionados. As reações de sequenciamento foram realizadas através da utilização do kit ABI BigDye terminator cycle sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA) e os produtos desta reação foram resolvidos em um sequenciador ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). A análise das sequências adquiridas foi realizada através do programa Lasergene (DNA Star, Inc, Madison, WI). Os mapas das sequências dos plasmídeos construídos foram adquiridos através da utilização do programa ApE-A plasmid Editor v1.10.4 (Figura 9).

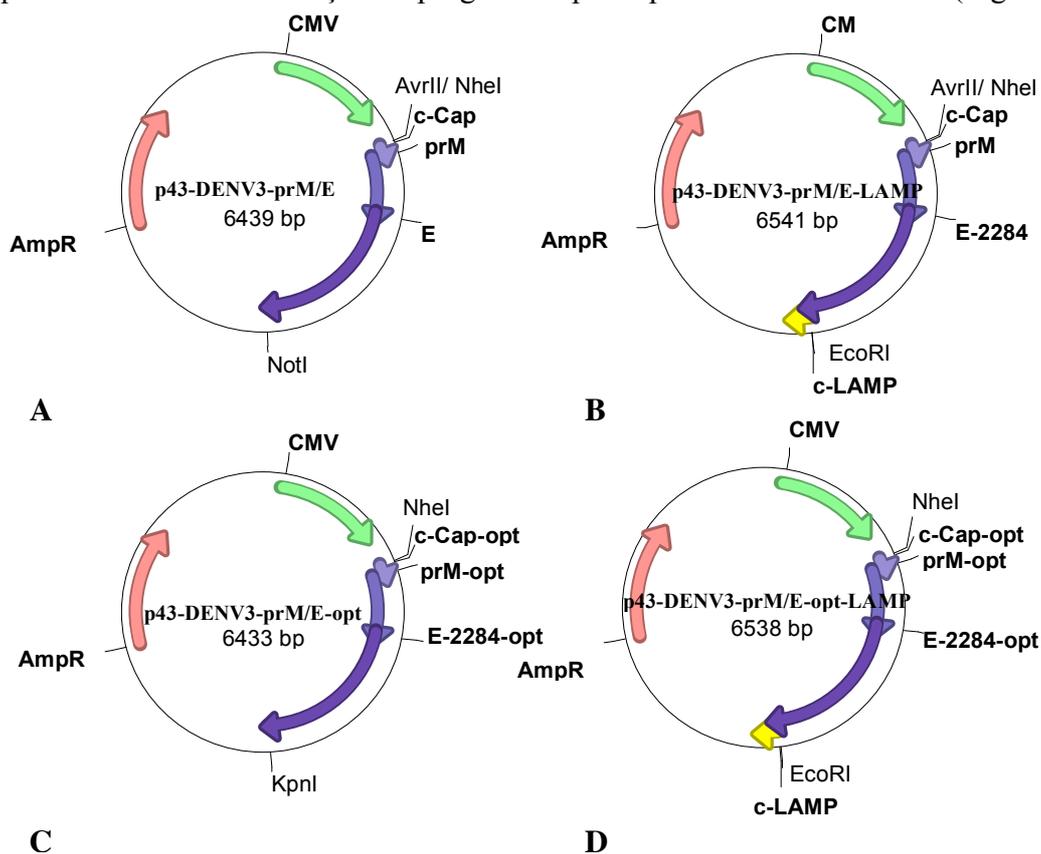


Figura 9. Mapas dos plasmídeos construídos.

Nota: A. Plasmídeo p43-DENV3-prM/E, B. Plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP. C. Plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt, D. Plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP. CMV- promotor; C-LAMP- região c-terminal de LAMP; c-Cap- porção c-terminal do capsídeo; prM- proteína prM; E- proteína E. E-2284- proteína E sem a porção c-terminal; c-Cap-opt, prM-opt, E-2284 -opt- proteínas otimizadas; AmpR- marca de resistência a ampicilina; AvrII, NheI, NotI, EcoRI, KpnI- sítios para enzimas de restrição.

Fonte: Adaptado pela autora.

6.3 Transfecção

Células HEK-293 foram transfectadas com os plasmídeos p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP, utilizando o kit PolyFect® Transfection Reagent (QIAGEN, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante. Para os ensaios de imunofluorescência e Western Blot, placas de 6 poços contendo quatro lamínulas/poço de 15 mm de diâmetro foram cultivadas com 6×10^5 células por 24 horas, e posteriormente incubadas com uma solução contendo, meio de cultivo com 10% de soro fetal bovino, 2 μg de DNA para cada plasmídeo e 20 μl de PolyFect Transfection Reagent. Após 48 horas, as lamínulas contendo as células transfectadas foram fixadas para os ensaios imunofluorescência, e o restante das células transfectadas nas placas foram lisadas para realização do “Western-blot”. Para os ensaios de microscopia confocal as células HEK-293 foram semeadas em lâminas com 8 câmaras individuais, denominadas de Lab-Tek® Chamber Slide (Campbell, CA) (Figura 10), essas lâminas especiais foram utilizadas tanto para os processo de cultivo celular, como para a transfecção e incubação com os anticorpos. Para isto, foram semeadas 8×10^4 células por poço ($0,8 \text{ cm}^2$) por 24 horas e posteriormente incubadas com uma solução contendo, meio de cultivo com 10% de soro fetal bovino, 200 ng de DNA para cada plasmídeo e 2 μl de PolyFect Reagent. Após 48 horas, as lâminas contendo as células transfectadas foram fixadas para os ensaios microscopia confocal.



Figura 10. Sistema Lab-Tek® Chamber Slide com 8 poços.
Fonte: NUNC™

Como controle de eficiência da transfecção, células HEK-293 foram transfectadas com a mesma quantidade de DNA do plasmídeo repórter pCMV- βgal (cedido gentilmente pelo Dr.

Ruben O. Donis, Center for Diseases Control and Prevention, CDC – Atlanta, EUA). Após 48 horas de transfecção as células foram lavadas com PBS 1X (Tampão Salina Fosfato – Phosphate Buffered Saline), fixadas com uma solução de 0,2% de glutaraldeído em PBS 1X, e em seguida incubadas com uma solução contendo o substrato X-gal (20mg de X-gal, 5M de ferriciana de potássio, 5M de ferrociana de potássio, 2M de MgCl₂ em PBS), para a revelação da atividade da enzima β-galactosidase.

6.4 Análise da expressão das proteínas clonadas em células HEK-293

6.4.1 Ensaio de imunofluorescência

As células HEK-293 transfectadas com os plasmídeos construídos foram analisadas através do ensaio de imunofluorescência para a detecção da expressão das proteínas prM/E do vírus da dengue tipo 3. Em resumo, 48 horas após a transfecção (descrito acima) as lamínulas contendo as células transfectadas foram retiradas das placas, lavadas com tampão PBS 1X e fixadas em solução gelada de metanol 100%. As lamínulas foram então fixadas com esmalte em uma lâmina de microscópio e posteriormente incubadas com o anticorpo primário (fluido ascítico hiperimune para *flavivírus*, cedido pelo Dr. Pedro Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas), diluído 1:100, por uma hora. Posteriormente a lâmina foi lavada com PBS 1X e incubada com o anticorpo secundário anti-camundongo IgG, produzido em caprino e conjugado a marca de fluorescência FITC -1mg/ml (Sigma, St. Louis, MO), diluído 1:100 por uma hora. Para finalizar, a lâmina foi lavada com PBS 1X e então contra-corada com o corante Azul de Evans (0,01%) por 1 minuto, montada com glicerol tamponado e selada por outra lamínula com esmalte. A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o microscópio Leica DMI 4000B. Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células.

6.4.2 Imunoprecipitação

Para melhorar a eficiência de detecção das proteínas prM/E pelo “Western-blot”, foi utilizado a técnica de imunoprecipitação, onde as células HEK-293 foram infectadas com a quimera de febre amarela e dengue sorotipo 3 (YFV-DENV3, Clone #3) (GIL et al. dados não publicados) e após o aparecimento de efeito citopático, foram lisadas com 1 mL de tampão de

lise (Tris-HCL, pH8.0, EDTA, pH8.0, Glicerol, Triton X, NaCl) e incubadas por 30 minutos com este tampão a 4°C sob agitação orbital. O lisado de células foi primeiramente incubado por uma hora no gelo, com um anticorpo irrelevante (neste caso, utilizamos o anticorpo monoclonal mouse anti- β -actina – fluido ascítico), e precipitado através de esferas de sefarose (rec-Protein G Sepharose 4B, Invitrogen, Carlsbad, CA) por 30 minutos a 4°C sob agitação. Após a incubação, o conjugado foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Este passo é chamado de clareamento, e elimina possíveis reações inespecíficas. Posteriormente, o sobrenadante resultante foi separado e incubado com um anticorpo de interesse (utilizamos para a imunoprecipitação um “pool” de soros de pacientes com altos títulos de IgG para dengue 3) por uma hora a 4°C sob agitação orbital, em seguida foram adicionados as esferas de sefarose e incubado por 4 horas a 4°C. A reação foi então centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o conjugado formado pela interação entre as proteínas prM/E, anticorpo anti-dengue e a sefarose foi lavado como descrito acima, e posteriormente aquecido a 100° C por 5 minutos com a finalidade de separar as proteínas imunoprecipitadas da sefarose. As esferas de sefarose foram descartadas e o complexo proteínas virais e anticorpos resultante da imunoprecipitação foi utilizado seguindo o protocolo para “Western-blot”, descrito a seguir.

6.4.3 “Western-blot”

A expressão das proteínas prM/E do dengue sorotipo 3 selvagem ou otimizada, e fusionadas ou não ao LAMP foram analisadas por gel de acrilamida seguido de “Western Blot”. Células transfectadas (descrito acima) foram lisadas com Laemmli Buffer (Tris-HCl/SDS, glicerol, SDS, ditioneitol – DTT, e azul de bromofenol), passadas em seringa de insulina para fragmentação do DNA, e posteriormente aquecidas por 5 minutos a 100°C. As amostras protéicas foram então fracionadas em gel SDS-PAGE 10% e posteriormente transferidas para membranas Hybond™ECL™ Nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK), através do sistema semi-seco de transferência (Bio-Rad, Hercules, CA). Após a transferência as membranas foram bloqueadas com uma solução de PBS 1X e 5% de leite desnatado por 1 hora a 4°C. Diversos experimentos foram realizados com vários anticorpos (Ac) primários, em diferentes diluições, para detecção da expressão das proteínas virais em células infectadas ou transfectadas com os plasmídeos construídos. Dentre eles, o fluido ascítico hiperimune para *flavivírus* (cedido pelo Dr. Pedro Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas); Ac monoclonal **D1-11(3)** para DENV-1, -2, -3, -4 (Abcam,

Cambridge, MA); Ac monoclonal D1-4G2-4-15 contra *flavivírus* (**HB-112**, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA); Ac monoclonal D3-2H2-9-21, para todos os sorotipos da dengue (**HB-114**, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA), Ac monoclonal 5D4-11, contra DENV-3 (**HB-49**, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA), Ac monoclonal **4G2**, específico para proteína E dos flavivírus (Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP, Curitiba – PR) e “pool” de soros de pacientes com altos títulos de IgG para dengue 3. Para controle e detecção de proteína celular utilizou-se o Ac monoclonal fluido ascítico **anti- β -actina**, clone AC-15 (Sigma, St. Louis, MO) (Quadro 1).

Os anticorpos primários foram diluídos em solução bloqueadora (Tabela 1) e incubadas durante uma noite a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes com PBS 1X/0.05%Tween-20 (15 min cada) e, então incubadas com o determinado anticorpo secundário (Tabela 1), também diluído em solução bloqueadora, por 1 hora a 4°C. Após novas lavagens, as membranas foram incubadas com substrato luminol Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA) por 1 minuto. A luminescência química, resultado da atividade da peroxidase sobre o substrato, foi captada pela exposição da membrana ao filme radiográfico Kodak BioMax MR Film (Kodak, Rochester, NY).

Quadro 1. Lista de anticorpos (primários e secundários) com as diluições testadas

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Diluição
Fluido ascítico hiperimune para <i>flavivírus</i>	1:100	anti-camundongo IgG+peroxidase	1:5000
Mouse mAbD1-11(3)	1:20	anti-camundongo IgG+peroxidase	1:5000
Mouse mAb HB-112	1:10, 1:20	anti-camundongo IgG+peroxidase	1:5000
Mouse mAb HB-114	1:20	anti-camundongo IgG+peroxidase	1:5000
Mouse mAb HB-49	1:20, 1:50	anti-camundongo IgG+peroxidase	1:5000
Mouse mAb 4G2	1:100	anti-camundongo IgG+ peroxidase	1:5000
soro de paciente	1:25, 1:40	anti-humano IgG+peroxidase	1:500
Fluido ascítico mouse mAb anti-b-actin	1:5000	anti-camundongo IgG+peroxidase	1:5000

6.5 Estudo do tráfego celular

6.5.1 Microscopia de confocal

Para microscopia de confocal, 8×10^4 células por poço, foram semeadas em lâminas Lab-Tek® Chamber Slide (Campbell, CA), como descrito acima. Após 48 horas da transfecção, as câmaras foram retiradas e as lâminas lavadas com tampão PBS 1X, fixadas com metanol 100% e posteriormente bloqueada com uma solução de PBS 1X/ BSA 1% por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação orbital. As lâminas então foram incubadas com o anticorpo primário (fluido ascítico hiperimune para *flavivírus*, cedido pelo Dr. Pedro Vasconcelos do Instituto Evandro Chagas), diluído 1:100, por uma hora em temperatura ambiente sob agitação orbital. Em seguida as lâminas foram lavadas rapidamente três vezes com PBS 1X e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo IgG, produzido em caprino e conjugado a marca de fluorescência FITC (isotiocianato de fluoresceína) - 1mg/ml (Sigma, St. Louis, MO), diluído 1:100, por 1 hora, temperatura ambiente, sob agitação orbital. Após a incubação com anticorpo secundário, as lâminas foram rapidamente lavadas com PBS 1X, e montadas com ProLong® Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA) e lamínula, tendo sempre o cuidado para que as lâminas não secasse. A localização celular das proteínas foi confirmada por microscopia confocal utilizando o microscópio Leica TCS SP2 OABS. Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células.

6.6 Aspectos Éticos

O projeto faz parte de um projeto maior denominado “Vacinas de dengue baseada em epítomos, tetravalente e direcionada ao compartimento MHC II”, registrado no CEP/CPqAM 68/02 e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com o número 4909. O projeto de dissertação proposto atende as condições de subprojeto o que o habilita a utilizar o parecer do projeto principal.

7 RESULTADOS

7.1 Construção dos plasmídeos

7.1.1 Plasmídeos contendo os genes das proteínas prM/E do DENV-3 não fusionados (p43-DENV3-prM/E) e fusionados ao LAMP (p43-DENV3-prM/E-LAMP)

7.1.1.1 Amplificação por PCR

A sequência de DNA que compreende a porção carboxi-terminal do capsídeo e os genes das proteínas prM e E do vírus da dengue sorotipo 3 foi amplificada através da técnica de Reação em Cadeia Polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR). Utilizando como molde o plasmídeo pBSC-DEN3 e os primers desenhados (Figura 11), as amplificações permitiram a obtenção de segmentos de DNA com os respectivos pesos moleculares desejados. Os fragmentos amplificados continham a porção c-terminal do capsídeo, os genes da prM e do E, sendo que para a construção do plasmídeo contendo LAMP a região c-terminal do gene E não foi amplificada, visando a substituição desta região pelo domínio c-terminal de LAMP.

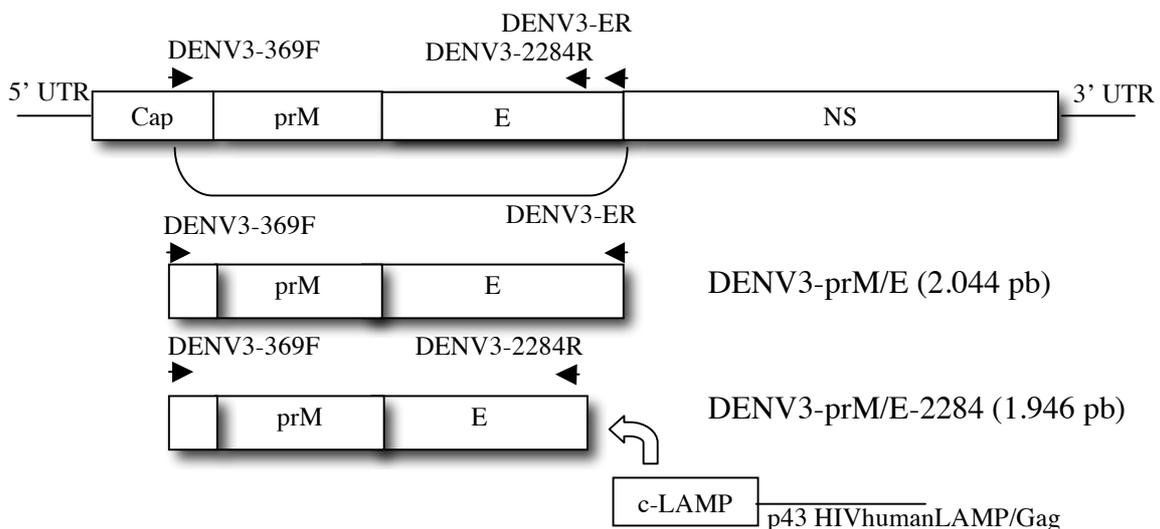


Figura 11- Esquema das regiões de anelamento dos primers DENV3-369F, DENV3-ER e DENV3-2284R, para reação de PCR na construção dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E e p43-DENV3-prM/E-LAMP.

Nota: O esquema mostra o genoma do vírus da dengue composto pelas proteínas estruturais (Cap- Capsídeo, prM- pré-Membrana, e E- Envelope) e pelas NS- proteínas não estruturais. As setas indicam os primers utilizados para amplificação (DENV-369F, DENV3-ER e DENV3-2284R). p43 HIVhumanLAMP/Gag- vetor utilizado nas construções, possibilitando a fusão, *in frame*, das proteínas prM/E com a porção c-terminal de LAMP, este mesmo vetor pode servir de base para construção sem LAMP.

Fonte: Adaptado pela autora.

O fragmento resultante da amplificação por PCR com os primers DENV3-369F e DENV3-ER, denominado de fragmento DENV3-prM/E e o fragmento amplificado pelos primers DENV369F e DENV3-2284R, denominado de fragmento DENV3-prM/E-2284 (Figura 11), foram detectados em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídio, podendo ser observado uma banda de 2.044 e 1.946 pares de base (pb), respectivamente (Figura 12).

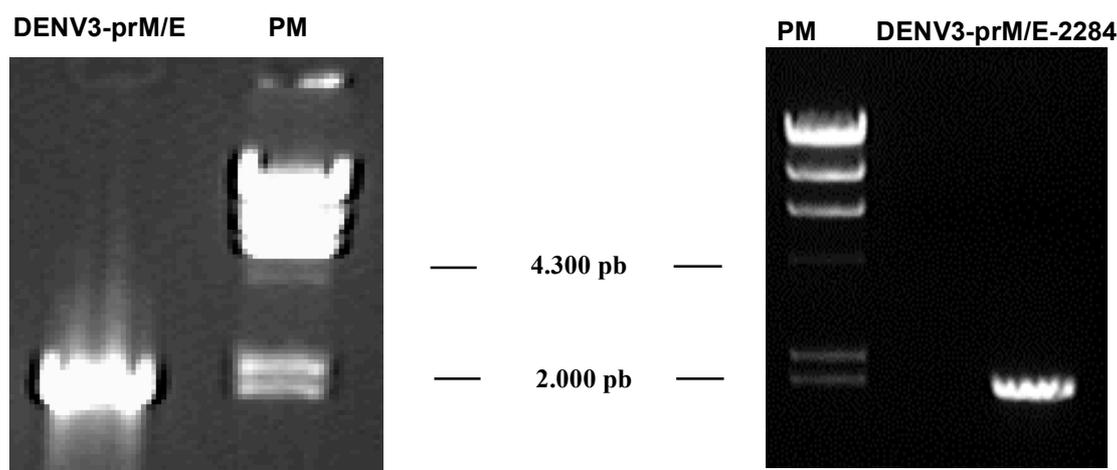


Figura 12- Produtos de PCR prM/E e prM/E-2284 do DENV3.

Nota: Após a amplificação por PCR, utilizando os primers desenhados DENV3-369F e DENV3-ER para as seqüências DENV3-prM/E e os primers DENV3-369F e DENV3-2284R para DENV3-prM/E-2284, foi obtido um fragmento de 2.044 e 1.946 pb, respectivamente. Os referidos produtos de PCR migraram através de gel de agarose 1% e foi visualizado em luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) utilizou-se o Lambda DNA-Hind III (Invitrogen, Carlsbad, CA), sendo indicadas como referência as bandas de 4300 e 2000 pares de base.

Fonte: Dados da autora.

7.1.1.2 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E

O fragmento que codifica a região referente a porção c-terminal do capsídeo e os genes pré-membrana e envelope (entre os nucleotídeos 369 e 2413 do DENV3) foi amplificada por PCR, clonada ao vetor pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, WI), para posteriormente ser digerida com as enzimas AvrII e NotI (*New England BioLab*_{in.}, Ipswich, MA) e clonada no plasmídeo p43.2, entre os sítios de restrição NheI e NotI (*New England BioLab*_{in.}, Ipswich, MA). Esta clonagem originou o plasmídeo p43-DENV3-prM/E (Oliveira, et al., dados não publicados). A qualidade/identidade desta clonagem foi confirmada através da digestão enzimática e sequenciamento, demonstrando sucesso na realização da construção.

7.1.1.3 Construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP

O produto de PCR, resultante da reação utilizando os primer's DENV3-369R e DENV3-2284R, denominado de fragmento DENV3-prM/E-2284 (Figura 11), foi purificado e em seguida digerido com as enzimas de restrição *AvrII* e *EcoRI* (New England BioLabs, Ipswich, MA), enquanto que o vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag foi digerido com as enzimas *NheI* e *EcoRI* (New England BioLabs, Ipswich, MA) (Figura 13), liberando duas bandas correspondentes a 4.609 e 2.652 pb. A partir da digestão, as bandas correspondentes a 1.932 pb para o produto de PCR DENV3-prME e 4.609 pb para o vetor p43HIVhumanLAMP/Gag digeridos, foram purificadas e, então utilizadas para realização da clonagem do fragmento DENV3-prM/E-2284 à sequência c-terminal de LAMP presente no vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag (Figura 14).

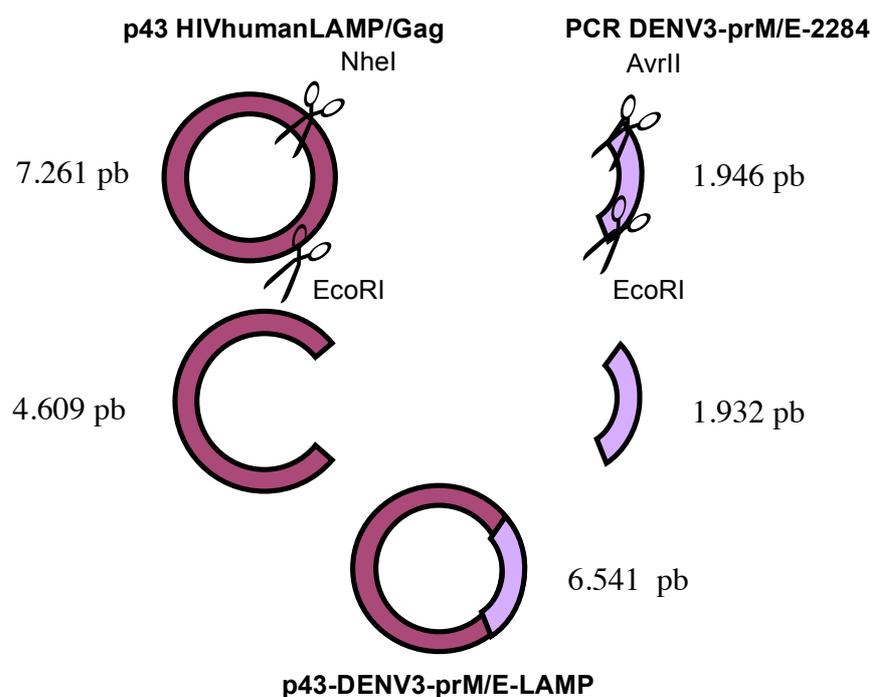


Figura 13- Esquema da clonagem dos fragmentos DENV3-prM/E-2284 para a fusão com c-LAMP.

Nota: Para construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP, o produto de PCR, foi digerido com as enzimas de restrição *AvrII* e *EcoRI* (New England BioLabs, Ipswich, MA) e ligado com o fragmento gerado pela digestão do vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag com as enzimas *NheI* e *EcoRI* (New England BioLabs, Ipswich, MA), contendo a porção c-terminal de LAMP.

Fonte: Adaptado pela autora.

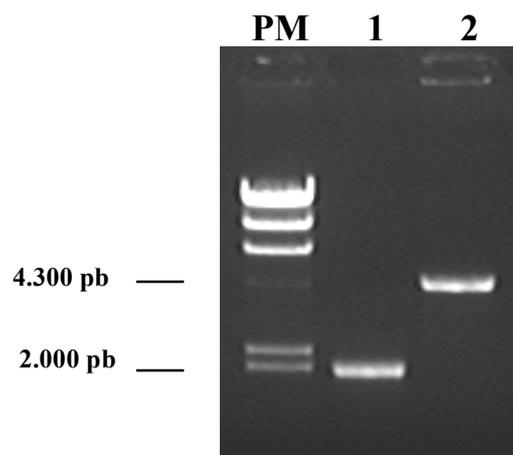


Figura 14- Purificação dos fragmentos DENV3-prM/E-2284 e p43-HIVhumanLAMP/Gag digeridos.

Nota: Após a digestão, os fragmentos gerados foram purificados. Linha 1- produto de PCR, DENV3-prM/E-2284, digerido com as enzimas de restrição AvrII e EcoRI (New England BioLabs, Ipswich, MA), liberando uma banda de aproximadamente 1.932 pb, linha 2- banda purificada referente a 4.609pb liberada pela digestão enzimática do vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag com enzimas de restrição NheI e EcoRI (New England BioLabs, Ipswich, MA). Os referidos produtos foram migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) o Lambda DNA-Hind III (Invitrogen, Carlsbad, CA), sendo indicadas como referência as bandas de 4.300 e 2.000 pares de base.

Fonte: Dados da autora.

Uma concentração 6 vezes maior de inserto foi utilizado para realização da ligação com o vetor. Após a transformação de bactérias com a reação de ligação foram selecionados 5 clones para o crescimento em meio líquido e extração do DNA plasmídeo para posterior confirmação da clonagem através de PCR e digestão enzimática. Dos cinco clones selecionados, todos amplificaram uma região compreendida entre o vetor e o inserto, liberando uma banda de aproximadamente 800 pb (Fig 15). A digestão enzimática destes clones com a enzima de restrição Hind III (New England BioLabs, Ipswich, MA), resultaram na liberação de dois fragmentos esperados, um de 5.323 pb e outro de 1.218 pb, para o plasmídeo clonado p43-DENV3-prM/E-LAMP, confirmando deste modo o sucesso da clonagem. Como controle foi realizado a digestão enzimática com a mesma enzima do vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag, resultando no aparecimento dos fragmentos de 4.883, 1.751 e 627 pb (Figura16).

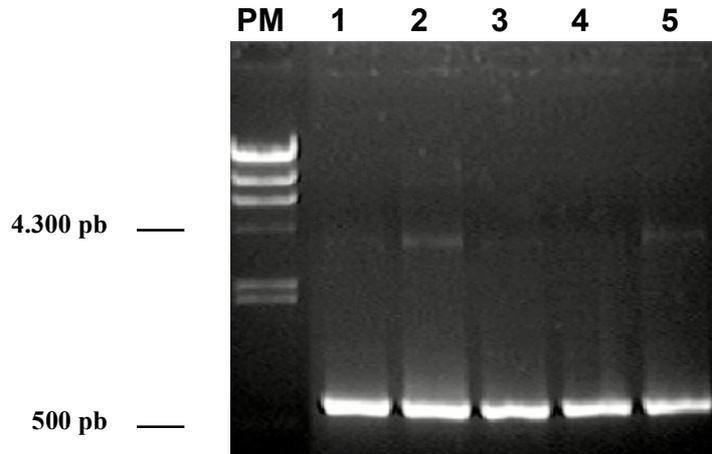


Figura 15- PCR para confirmação da construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP.

Nota: Após a transformação com a ligação p43 HIVhumanLAMP/Gag + DENV3-prM/E-2284, 5 clones bacterianos foram inoculados em meio líquido para posterior extração de DNA plasmideal. Os DNAs obtidos foram em seguida utilizados para realização de uma reação de PCR para confirmação da clonagem do fragmento DENV3-prM/E-2284 no vetor p43.2HIVLAMP/Gag (p43-DENV3-prM/E-LAMP). Foi observado uma banda de aproximadamente 800pb (linhas 1-5), como esperado. Os produtos foram migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado Lambda DNA-Hind III (Invitrogen, Carlsbad, CA), sendo indicadas como referência as bandas de 4.300 e 500pb.

Fonte: Dados da autora.

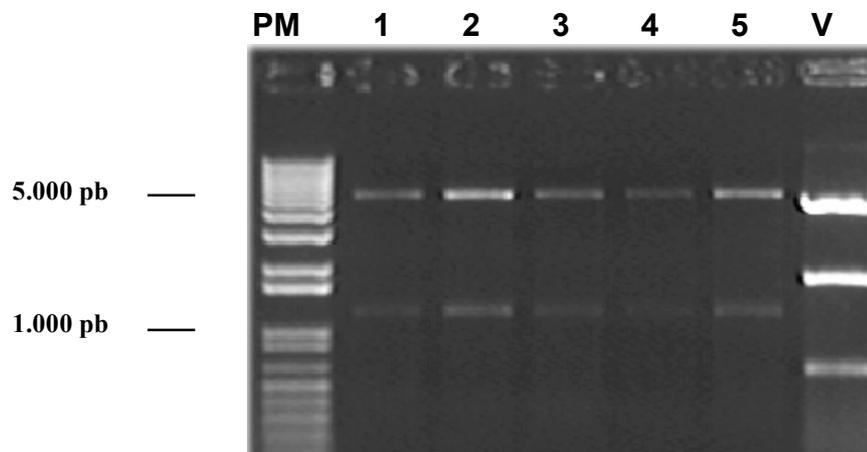


Figura 16- Digestão dos DNAs plasmidiais para confirmação da construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP.

Nota: Após a transformação com a ligação p43 HIVhumanLAMP/Gag + DENV3-prM/E-2284, 5 clones bacterianos foram inoculados em meio líquido para posterior extração de DNA plasmideal. Os DNAs obtidos foram em seguida digeridos com a enzima HindIII (New England BioLabs, Ipswich, MA) para confirmação da clonagem do fragmento DENV3-prM/E-2284 no vetor p43.2HIVLAMP/Gag (p43-DENV3-prM/E). Todos os clones liberaram as bandas esperadas (5.323 pb e 1.218 pb, para o plasmídeo clonado p43-DENV3-prM/E (linhas 1-5), e de 4.883, 1.751 e 627 pb do vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag (V)). Os produtos das digestões foram migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado 1 kb Plus DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA), sendo indicadas como referência as bandas de 5.000 e 1.000 pb.

Fonte: Dados da autora.

7.1.2 Plasmídeos contendo os genes otimizados das proteínas prM/E do DENV-3 não fusionados (p43-DENV3-prM/E-opt) e fusionados ao LAMP (p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP)

7.1.2.1 Otimização dos genes

A sequência de DNA que codifica a porção carboxi-terminal do capsídeo e os genes das proteínas prM e E (sem porção c-terminal) do sorotipo 3 do vírus da dengue isolado no Brasil (GenBank AY038605) foram otimizadas utilizando o programa LETO 1.0 (Entelechon GmbH, versão 1.0.11) (Figura 17). Este programa permite a análise das sequências em relação a diversos parâmetros biológicos, como “codon usage”, sequências repetitivas, a estrutura do mRNA, o conteúdo de GC, a presença e/ou ausência de sítios de restrição, sítios de splicing, otimização da origem de leitura (ORF), dentre outros. Com isso, é possível aumentar a eficiência de expressão da sequência otimizada.

A sequência otimizada foi, então, sintetizada e clonada comercialmente no plasmídeo pGA15 (plasmídeo pGA15-DENV3-prM/E-opt) (GENEART Inc, Regensburg, Deutschland).



Figura 17- Sequência de DNA referente a região dos genes prM/E do sorotipo 3 do vírus da dengue otimizada.

Nota: A sequência de DNA que codifica a porção carboxi-terminal do capsídeo (c-Cap) e os genes das proteínas prM e E (sem porção c-terminal) (prM/E-2284) do sorotipo 3 do vírus da dengue isolado no Brasil (GenBank AY038605) foram otimizadas utilizando o programa LETO 1.0 (Entelechon GmbH, versão 1.0.11). Diferentes sítios de restrição para as enzimas Sall, NheI, EcoRI e KpnI (New England BioLabs, Ipswich, MA) foram adicionadas para possibilitar outras estratégias de clonagens e um stop codon foi colocado.

Fonte: Adaptado pela autora.

7.1.2.2 Clonagem dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP

Para a construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt realizou-se a digestão enzimática dos plasmídeos pGA15-DENV3-prM/E-opt e p43HIVhumanLAMP/Gag com as enzimas de restrição NheI e KpnI (*New England BioLab_{inc.}*, Ipswich, MA) (Figura 18). Após a digestão, os fragmentos foram purificados e uma pequena aliquota avaliada em gel de agarose antes de se realizar a ligação (Fig 19). Para a clonagem do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP, o qual contém a região que compreendem a porção c-terminal do capsídeo, e os genes pré-membrana e envelope (sem a região c-terminal) otimizados e fusionados ao LAMP, foram realizadas a digestão enzimática dos plasmídeos pGA15-DENV3-prM/E-opt e p43HIVhumanLAMP/Gag com as enzimas de restrição NheI e EcoRI (*New England BioLab_{inc.}*, Ipswich, MA) (Figura 18) e posteriormente a purificação e avaliação em gel de agarose (Figura 19).

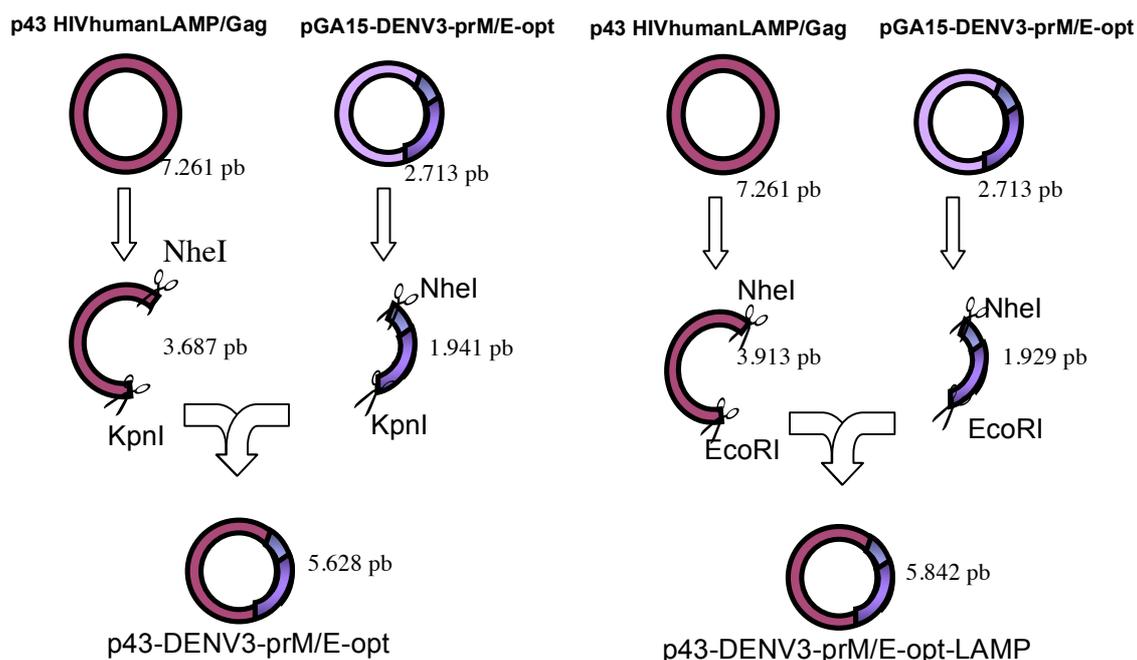


Figura 18- Estratégia de clonagem para construção dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP.

Nota: Para construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt, o vetor pGA15-DENV3-prM/E-opt e o vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag foram digeridos com NheI e KpnI (New England BioLabs, Ipswich, MA). Para construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP, o vetor pGA15-DENV3-prM/E-opt e o vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag foram digeridos com NheI e EcoRI (New England BioLabs, Ipswich, MA).

Fonte: Adaptado pela autora.

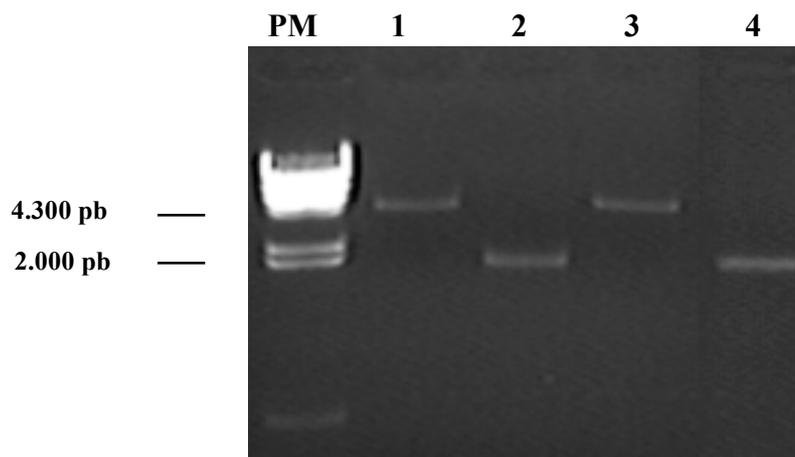


Figura 19- Análise da purificação dos fragmentos DENV3-prM/E-opt e vetor p43HIVhumanLAMP/Gag digeridos.

Nota: Após a digestão, os fragmentos gerados foram purificados. A banda purificada resultante da digestão do plasmídeo p43 HIVhumanLAMP/Gag (linha 1) com NheI e KpnI (New England BioLabs, Ipswich, MA), foi de 4.492 pb. Para o plasmídeo pGA15-DENV3-prM/E-opt (linha 2) digerido com NheI e KpnI (New England BioLabs, Ipswich, MA), foi de 1.941 pb. A ligação destes dois fragmentos deram origem ao plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt. Para construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP, foram utilizadas as bandas purificadas das digestões do plasmídeo p43 HIVhumanLAMP/Gag (linha 3) e do plasmídeo pGA15-DENV3-prM/E-opt (linha 4) com as enzimas de restrição NheI e EcoRI (New England BioLabs, Ipswich, MA), originando os fragmento de 4.609 e 1.929 pb, respectivamente. Os referidos produtos purificados foram migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transiluminador de luz ultravioleta. A ligação destes dois fragmentos deram origem ao plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP. Como marcador de peso molecular (PM) o Lambda DNA-Hind III (Invitrogen, Carlsbad, CA), sendo indicadas como referência as bandas de 4300 e 2000 pares de base.

Fonte: Dados da autora.

Para ligação do vetor à seus respectivos insertos, foram utilizados uma concentração 6 vezes maior de inserto do que ao do vetor. Após a ligação foram selecionados 5 clones de cada construção (p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP), estes foram inoculados em meio líquido de crescimento, para posterior extração do DNA plasmidial e confirmação das clonagens.

Para confirmação do sucesso da clonagem, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição PvuII e HindIII (New England BioLabs, Ipswich, MA). Todos os cinco clones selecionados, tanto para construção p43-DENV3-prM/E-opt, como para a p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP, liberaram as bandas com os tamanhos esperados de 5.397 pb e 1.036 pb para p43-DENV3-prM/E-opt, e 5.502 pb e 1.036 pb para a construção p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP. Como controle da digestão enzimática foi utilizado o vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag, o qual originou os fragmentos de 4.883, 1.021, 730, 560, 60 pb (Figura 20).

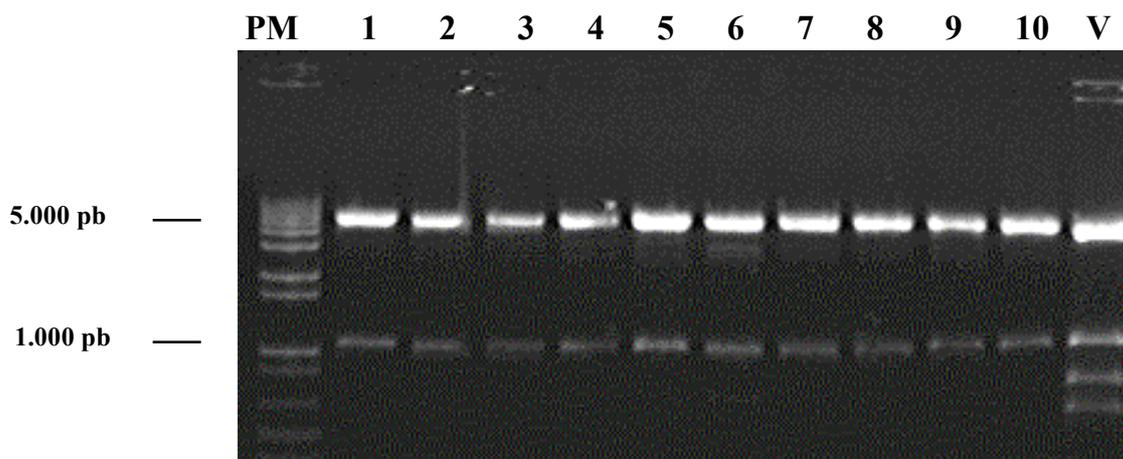


Figura 20. Digestão dos DNAs plasmidiais para confirmação da clonagens dos plamídeos p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP.

Nota: Após a transformação com a ligação das construções p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP, 5 clones bacterianos de cada clonagem foram inoculados em meio líquido para posterior extração de DNA plasmideal. Os DNAs obtidos foram, em seguida, digeridos com a enzima de restrição PvuII e HindIII (New England BioLabs, Ipswich, MA) para confirmação das clonagens. Todos os clones liberaram as bandas esperadas de 5.397 pb e 1.036 pb para o plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt (linhas 1-5), de 5.502 pb e 1.036 pb para plasmídeo p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP (linhas 6-10) e de 4.883, 1.021, 730, 560, 60 pb do vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag (V). Os produtos da digestão foram migrados em gel de agarose 1% e visualizados ao transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado 1 kb Plus DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA), sendo indicadas como referência as bandas de 5.000 e 1.000 pb.

Fonte: Dados da autora.

Foi selecionado um clone de cada construção para realizações dos próximos estudos.

7.1.3 Sequenciamento das construções p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt, e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP

Todas as construções foram submetidas ao sequenciamento para confirmar a qualidade/identidade dos genes clonados e fusionados ao LAMP. O sequenciamento foi realizado utilizando primers internos desenhados para anelarem a cada 400 pb dos insertos clonados. Os produtos da reação foram resolvidos por um sequenciador ABI 3100 Genetica Analyzer (Applied Biosystems). E as análises dos alinhamentos dos produtos sequenciados foram realizadas através do programa Lasergene (DNA Star, Inc, Madison, WI), no qual não foi observado nenhuma mutação em nenhum dos plasmídeos construídos. Após a aquisição das sequências através do sequenciamento foram construídos os mapas virtuais para cada plasmídeo utilizando o programa ApE-A plasmid Editor v1.10.4, como demonstrado em Materiais e Métodos.

7.2 Transfecção de células HEK-293 e análise da expressão dos plasmídeos construídos em células transfectadas

Uma vez confirmada a identidade dos plasmídeos clonados, os mesmos foram utilizados para transfectar células HEK-293, visando avaliar o tráfego e a expressão transiente das proteínas geradas em células de mamíferos. A eficiência da transfecção das células utilizadas foi primeiramente avaliada através da transfecção celular com o plasmídeo reporter pCMV- β gal, o qual demonstrou uma eficiência de transfecção de aproximadamente 80%. Após a padronização do processo de transfecção celular as células HEK-293 foram transfectadas com os plasmídeos construídos, e a expressão das proteínas virais expressas por estes plasmídeos foi avaliada através dos ensaios de imunofluorescência e Western Blot.

7.2.1 Microscopia de Imunofluorescência

Para avaliação da expressão das proteínas prM/E do DENV3 dos plasmídeos clonados em células HEK-293 transfectadas utilizou-se a técnica de imunofluorescência. Através deste ensaio foi possível detectar com sucesso a expressão das proteínas prM/E, prM/E-LAMP, prM/E-opt e prM/E-opt-LAMP dos plasmídeos construídos, através da emissão de fluorescência das células transfectadas com cada plasmídeo (Figura 21).

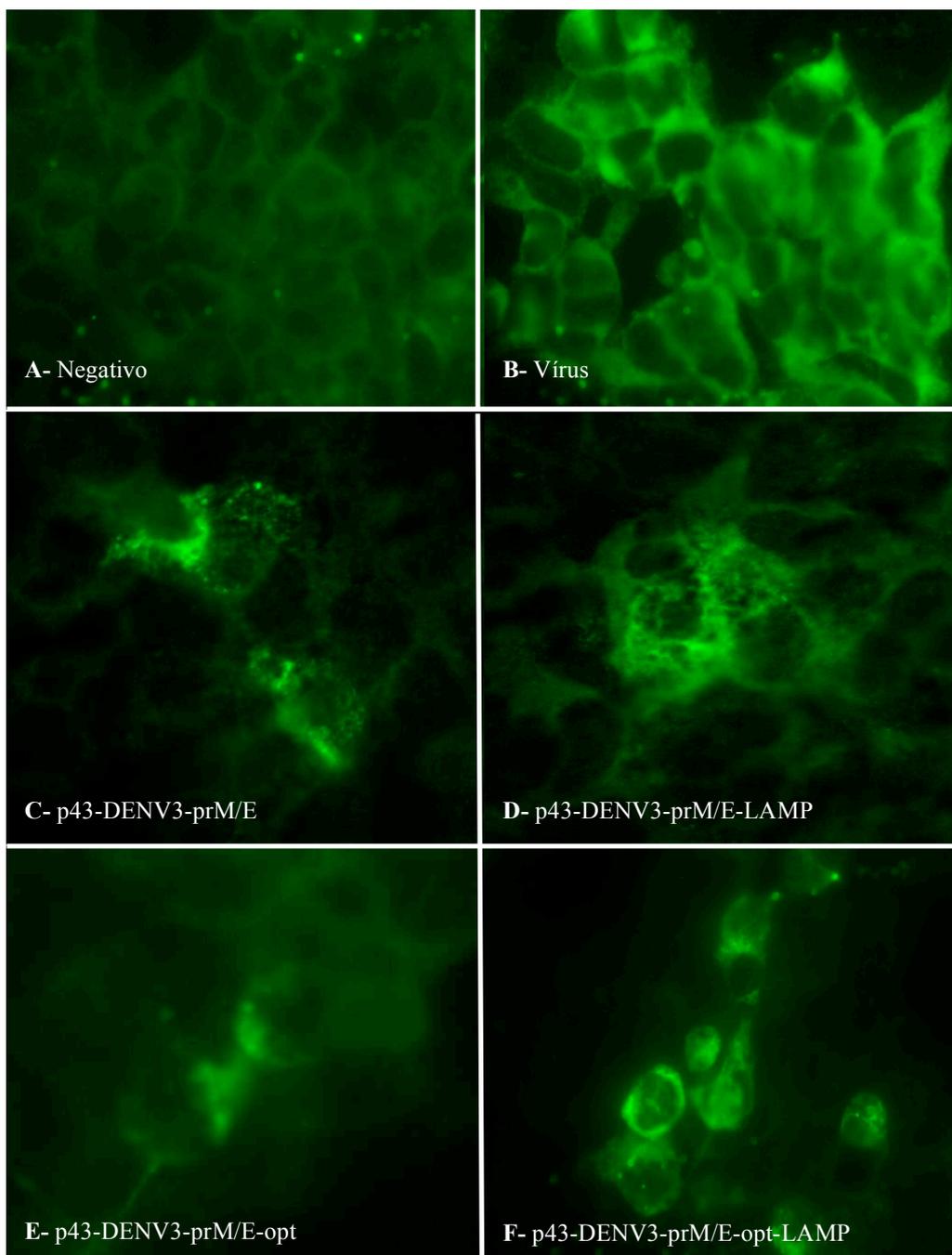


Figura 21. Células HEK-293 transfectadas com os plasmídeos p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP.

Nota: A validação da expressão das proteínas prM/E codificadas pelos plasmídeos p43-DENV3-prM/E (C), p43-DENV3-prM/E-LAMP (D); p43-DENV3-prM/E-opt (E) e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP (F) foi realizado através de ensaio de imunofluorescência. Células HEK-293 serviram como controle negativo (A) e como controle positivo foram utilizadas células HEK-293 infectadas com a quimera YFV-DENV3 (B). As proteínas prM/E foram detectadas através da utilização do anticorpo fluido ascítico hiperimune para *flavivirus*.

Fonte: Dados da autora.

7.2.2 “Western-blot”

Para determinar se as construções p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP são capazes de expressar níveis detectáveis das proteínas prM/E por “Western-blot”, extratos celulares foram preparados após 48 horas de transfecção. Estes extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Na tentativa de aumentar a concentração das proteínas virais no extrato celular foi realizado primeiramente o ensaio de imunoprecipitação. Infelizmente, o inconveniente deste ensaio foi a possibilidade de detecção das cadeias leve e pesada do anticorpo utilizado para imunoprecipitação pelo anticorpo secundário utilizado durante a revelação do “Western-blot”, as bandas detectadas apresentam tamanhos muito próximos aos das proteínas prM/E do vírus da dengue. Para contornar este problema, utilizamos para a imunoprecipitação um “pool” de soro de pacientes positivos para DENV3 e para o “Western-blot” um anticorpo policlonal feito em camundongos (fluido ascítico hiperimune para flavivírus) como anticorpo primário, seguido de um anticorpo anti-camundongo IgG conjugado a peroxidase. Deste modo o anticorpo secundário não seria capaz de detectar as cadeias leves e pesadas liberadas pelo anticorpo usado na imunoprecipitação, pois são espécies diferentes, porém não houve detecção de nenhuma banda.

Com o intuito de avaliar a eficiência da técnica de “Western-blot” em detectar produtos protéicos celulares foi inicialmente utilizado o anticorpo monoclonal mouse anti- β -actina. A detecção de uma banda correspondente a aproximadamente 42 kDa (Figura 22) nos lisados celulares utilizados (célula HEK-293, como controle negativo e célula HEK-293 infectada com o vírus quimérico YFV-DENV3, como controle positivo) confirmam a padronização e eficiência do protocolo utilizado.

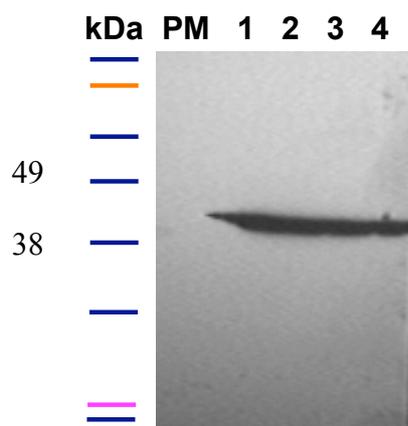


Figura 22. Detecção da proteína celular actina pela técnica de “Western-blot”.

Nota: Foram utilizadas células HEK-293 (1 e 2) e células HEK-293 infectadas com o vírus quimérico YFV-DENV3 (3 e 4). Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado SeeBlue® Plus2 (Invitrogen, Carlsbad, CA), a coluna da esquerda refere-se a representação esquemática do peso molecular utilizado, e as bandas indicadas representam os pesos moleculares de 49 e 38 kDa.

Fonte: Dados da autora.

Para a detecção das proteínas virais em células transfectadas por Western-blot foram testados diversos anticorpos com diferentes diluições (Tabela 1), inclusive soro hiperimune de pacientes de Recife - Pernambuco, da coorte de Dengue (CORDEIRO et al., 2007), e anticorpos policlonais e monoclonais específicos para DENV3, mas sem sucesso.

Testes utilizando células infectadas com o vírus DENV3 selvagem (DENV3#95016, isolado por CORDEIRO et al., 2007) e o vírus quimérico YFV-DENV3 (construído por GIL et al, dados não publicados) mostraram que foi possível detectar a expressão das proteínas prM e E, em células HEK-293 infectada com o vírus selvagem, mas não com o vírus quimérico. Já em células C6/36, infectadas com estes vírus, foi possível detectar as proteínas prM e E tanto em células infectadas com o vírus selvagem como para o vírus quimérico YFV-DENV3, embora que nas células infectadas com o vírus quimérico, a expressão tenha sido reduzida. As bandas detectadas foram de aproximadamente 53 kDa para a proteína E, e 26 kDa para a proteína prM (Figura 23).

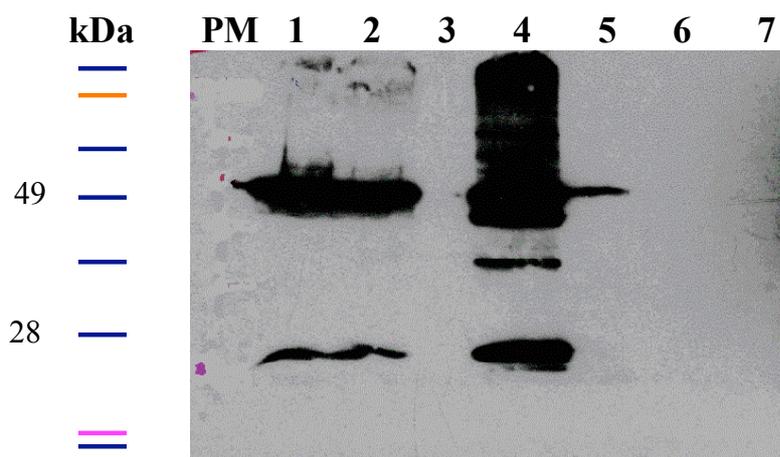


Figura 23. Análise de “Western-blot” de células HEK-293 e C6/36 infectadas com os vírus DENV3 e a quimera YFV-DENV3 utilizando o anticorpo monoclonal 4G2.

Nota: As linhas 1 e 2 representam as células HEK-293 infectadas com o vírus selvagem DENV3#95016, demonstrando a expressão das proteínas prM e E do DENV-3, a linha 3 representa células HEK-293 infectadas com o vírus quimérico YFV-DENV3, não sendo detectado a expressão das proteínas prM e E do DENV3. As linhas 4 e 5 representam as células C6/36 infectadas com o vírus selvagem e quimérico YFV-DENV3, respectivamente, demonstrando a expressão das proteínas prM e E do DENV3 e outras bandas inespecíficas para o vírus selvagem, e apenas a proteínas E para o vírus quimérico YFV-DENV3. As linhas 6 e 7 representam o controle negativo contendo apenas células HEK-293 e C6/36, respectivamente. Como marcador de peso molecular (PM) foi utilizado SeeBlue® Plus2 (Invitrogen), a coluna da esquerda refere-se a representação esquemática do peso molecular utilizado, e as bandas referidas são de 49 e 28 kDa.

Fonte: Dados da autora.

7.3 Estudo do tráfego celular em células transfectadas com os plasmídeos p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP por microscopia confocal

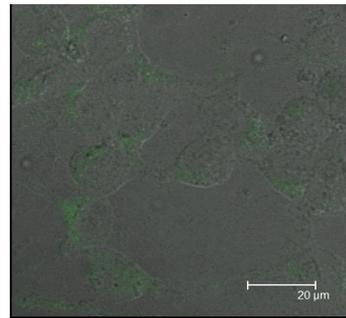
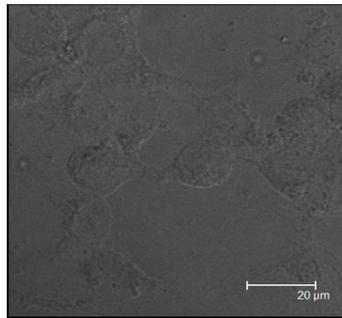
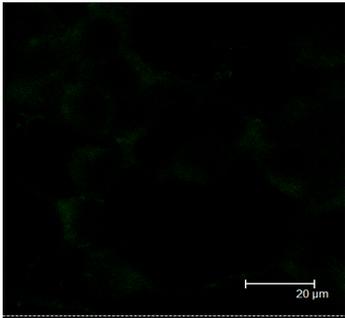
Para avaliação da localização celular das proteínas fusionadas ou não ao LAMP, as células HEK-293 transfectadas com os plasmídeos construídos foram submetidas a microscopia confocal. Ambas as proteínas, prM/E e LAMP, foram detectadas nos compartimentos celulares adequados. Sendo as proteínas prM/E selvagem e otimizada detectadas na região perinuclear e nos compartimentos reticulares, já as proteínas prM/E quimerizadas com LAMP, selvagem e otimizada, foram detectadas associadas a localização lisossomal (Figura 24).

Anti-flavivírus

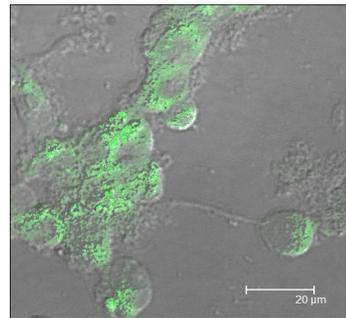
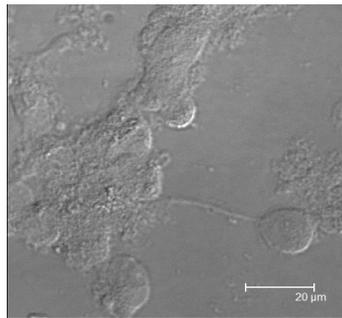
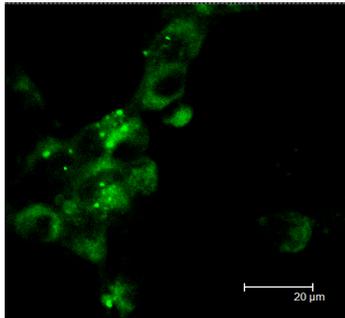
Transducência

Sobreposição

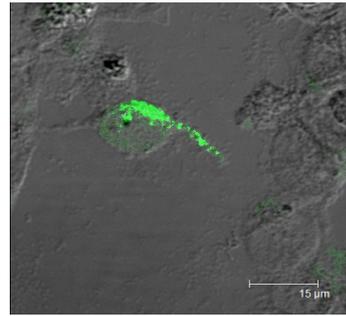
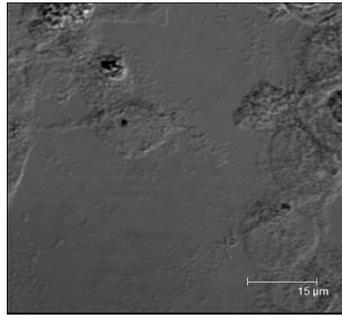
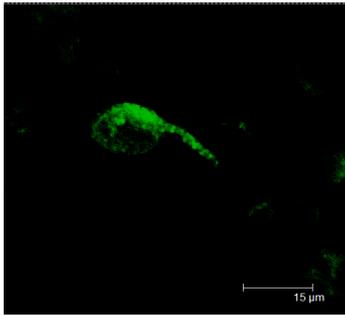
A



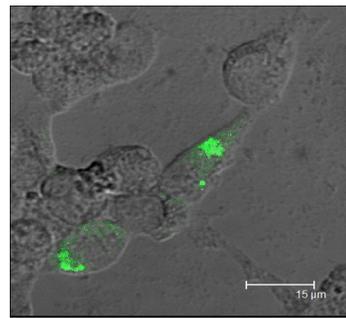
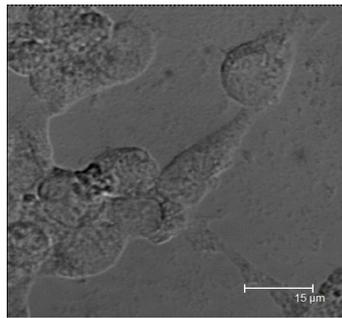
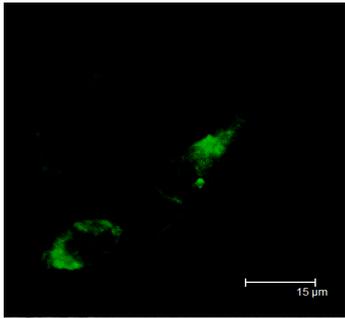
B



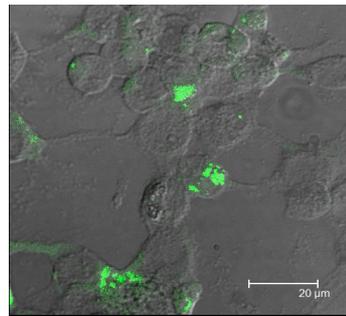
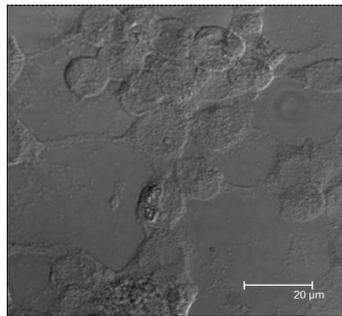
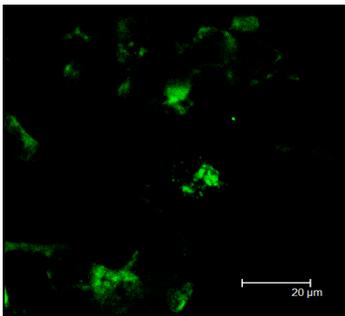
C



D



E



F

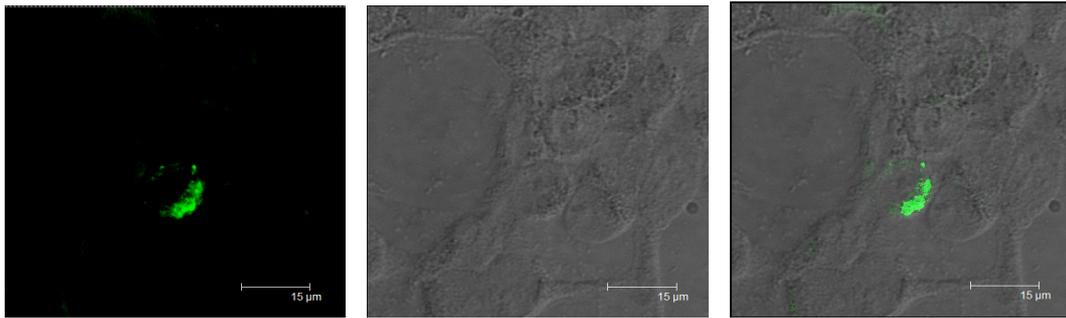


Figura 24- Localização das proteínas geradas pelas construções p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP; p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP em células HEK-293 transfectadas através da microscopia confocal.

Nota: A distribuição das proteínas expressas nas células transfectadas ocorreram como esperado, os plasmídeos p43-DENV3-prM/E (C) e p43-DENV3-prM/E-opt (E) expressando as proteínas prM/E selvagem e prM/E otimizada, apresentaram-se distribuídas em compartimentos reticulares, enquanto que em células transfectadas com os plasmídeos p43-DENV3-prM/E-LAMP (D) e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP (F) as proteínas prM/E selvagem e prM/E otimizada, fusionadas a LAMP, apresentaram-se distribuídas em compartimentos lisossomais. Células HEK-293 foram usadas como controle negativo (A), e células HEK-293 infectadas com vírus selvagem DENV3#95016, como controle positivo (B). As células foram marcadas com anticorpos policlonal anti-flavivírus, essas imagens foram sobrepostas contra a transducência celular.

Fonte: Dados da autora.

8 DISCUSSÃO

A dengue continua sendo um sério problema em saúde pública, e tem se tornado impossível de erradicar e de difícil controle. Até os dias atuais, o controle do dengue é feito, em todo o mundo, seguindo as normas gerais de combate aos mosquitos vetores preconizadas pelos médicos sanitaristas do começo do século (FIGUEIREDO, 1999). O controle e a erradicação do mosquito *Aedes aegypti*, vetor do dengue, é um procedimento bastante difícil, que necessita de grandes investimentos com funcionários, máquinas, inseticidas e campanhas educacionais permanentes, que mobilizem toda a comunidade (GUBLER; CLARK, 1994). A alternativa ideal para o controle do dengue seria através do uso de vacinas. Porém para a obtenção de uma vacina contra dengue é necessário se identificar antígenos que produzam uma imunidade protetora contra os quatro sorotipos do vírus. Apesar de ainda não haver uma vacina disponível que possa prevenir a infecção com o vírus dengue, já existem vários estudos em desenvolvimento, utilizando tanto a tecnologia convencional compostas de vacinas como vírus atenuados, assim como novas tecnologias de manipulação genética (JACOBS; YOUNG, 2003; KONISHI; KOSUGI; IMOTO, 2006). No presente estudo foram clonados em vetores plasmidiais os genes que codificam as proteínas estruturais prM e E do vírus da dengue sorotipo 3, a escolha desses genes virais se deve ao fato da importância dos genes estruturais ao reconhecimento viral pelo sistema imunológico do hospedeiro durante a infecção, e devido a predominância deste sorotipo no Brasil atualmente. A presença da proteína prM é necessária para o correto dobramento da proteína E, e a proteína estrutural E é conhecida por conter importantes determinantes antigênicos virais (CHANG, 1997; LORENZ et al., 2002). Devido a características imunogênicas destas proteínas estruturais do vírus da dengue, diversos grupos de pesquisa têm estudado estas proteínas como um possível antígeno para o desenvolvimento de vacinas genéticas eficazes contra dengue (FONSECA et al., 1994).

É de conhecimento que o principal inconveniente das vacinas de DNA é que elas induzem uma resposta humoral inadequada (AKBARI et al., 1999), e uma das prováveis causas para isto seria a forma de apresentação do antígeno, o qual é predominantemente através da via do MHC-I. Para contornar este problema e realçar a apresentação de antígenos contidos em vacinas de DNA pela via do MHC II, nós realizamos em nossas construções o fusionamento da região do antígeno (proteínas prM/E do DENV3) a porção c-terminal da proteína LAMP, esta proteína como já citado tem a capacidade de direcionar as moléculas antigênicas para a via endossomo/lisossomo, resultando assim em uma melhor apresentação antigênica via MHC II, e conseqüentemente uma melhor resposta humoral e celular (DRAKE

et al., 1999; GEUZE, 1998; KLEIJMEER et al., 1997; PETERS et al., 1991; TURLEY et al., 2000). Diversas vacinas de DNA quiméricas contendo o antígeno fusionado ao LAMP já foram desenvolvidas para diversos vírus, incluindo os vírus da febre do Nilo (WNV), dengue sorotipo 2, síndrome respiratória aguda grave (SARS CoV), vírus do papiloma humano (HPV) e HIV-1, nos quais demonstram em estudo de tráfego celular a colocalização *in vitro* do antígeno com as proteínas do MHC II, LAMP-1, LAMP-2, e H-2M (ANWAR et al., 2005; ARRUDA et al., 2006; CHIKHLIKAR et al., 2004; DE ARRUDA et al., 2004; LU et al., 2003; MARQUES et al., 2003; WU et al., 1995). Wu e colaboradores demonstraram que a fusão da proteína E7 do tipo 16 do papiloma vírus humano (Human Papilloma Vírus, HPV-16) a proteína LAMP pode direcionar o antígeno E7 para o compartimento lisossomal e facilitar a apresentação desta proteína ao MHC II (WU et al., 1995), e quando testado em forma de vacina de DNA, gerou um elevado número de células T CD4 específicas, bem como atividade citotóxica em camundongos (JI et al., 1999). Construções contendo a região que codifica os genes das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 2 fusionada a porção carboxi-terminal do LAMP, ou seja o mesmo tipo de estratégias que realizamos para o sorotipo 3 neste estudo, demonstraram em células NIH3T3 transfectadas uma colocalização dos antígenos prM/E-LAMP com a membrana lisossomal, e em camundongos imunizados foram detectados uma soroconversão 30 dias pós-imunização (RAVIPRAKASH et al., 2001). Em um outro estudo realizado pelo mesmo grupo também foram confirmados a colocalização das proteínas prM/E do DENV2 fusionada ao LAMP com moléculas do MHC II e como a proteína LAMP celular (endógena), através de microscopia de imunofluorescência e de confocal. Além disso, os camundongos imunizados com esta construção também foram capazes de soroconverter, com intensa capacidade de neutralização viral (LU et al., 2003). Este mesmo tipo de resposta também foi observado em vacina quimérica do vírus da febre do Oeste do Nilo expressando as proteínas prM/E fusionadas ao LAMP (ANWAR et al., 2005). Em uma vacina de DNA contra o HIV foram demonstrados que o domínio luminal de LAMP é requerido para o direcionamento endossomo/lisossomo da proteína Gag do HIV. Neste estudo, camundongos vacinados com plasmídeos que expressavam a proteína Gag quimerizada com a proteína LAMP com o domínio luminal, apresentaram uma resposta imune humoral e celular mais robustas quando comparada a vacina sem o fusionamento com o LAMP (MARQUES et al., 2003).

Além da estratégia de fusionamento dos genes que codificam as proteínas prM/E do dengue sorotipo 3 ao LAMP, nos também realizamos a otimização genética destes genes com o intuito de melhorar a expressão das proteínas e gerar uma resposta imune ainda mais

robusta. Trabalhos que utilizam a otimização de genes têm demonstrado uma melhor expressão dos genes submetidos à otimização (BURGESS-BROWN et al., 2008; CHUAN et al., 2008).

Todos os plasmídeos construídos, incluindo os com os genes sintetizados, foram confirmados por sequenciamento e digestão enzimática antes dos ensaios de expressão. Para a análise de expressão dos genes construídos foram realizadas transfecções em células HEK-293, as quais apresentaram uma eficiência transfecção de em torno de 80%, quando avaliada a expressão do gene repórter β -lactosidase pelo plasmídeo pCMV- β gal. A expressão dos genes prM/E (otimizado ou não) clonados foram detectados através de ensaios de imunofluorescência (Figura 21), utilizando-se um anticorpo policlonal feito em camundongos (fluido ascítico hiperimune para *flavivírus*, Quadro 1). Porém, apesar de terem sido detectados por imunofluorescência, as proteínas prM/E do DENV3 clonadas não puderam ser detectadas por “Western blot”, talvez devido à baixa concentração das proteínas após a transfecção, inespecificidade dos anticorpos utilizados. Devido a falta de um anticorpo que detectasse as proteínas prM/E em células transfectadas através da técnica de “Western blot”, não pudemos analisar a eficiência de expressão dos genes otimizados quantitativamente, visto que os ensaios de imunofluorescência são apenas qualitativos. Para contornar este problema estamos atualmente desenvolvendo anticorpos específicos para cada sorotipo do vírus da dengue, como também um anticorpo em combinação tetravalente, através da expressão da região que compõe o domínio III da proteína E destes vírus.

No estudo do tráfego celular em células transfectadas com os construídos nos observamos que as proteínas prM/E contendo a sequência sinal de translocação para o lúmen do retículo endoplasmático (porção c-terminal do capsídeo), puderam ser encontradas em compartimentos secretórios do retículo, complexo de Golgi e possivelmente na membrana plasmática, como mostra a figura 24 (C e E), observando uma localização perinuclear compatível com a localização reticular. Contrastando com isto, quando as proteínas prM/E estão fusionadas à LAMP, observou-se uma distribuição vesicular (em lisossomos) nas células transfectadas (Figura 24 D e F), confirmando, deste modo, o fusional dos genes prM/E ao LAMP, visto que a localização da proteína LAMP mostra-se constantemente relacionada a membrana lisossomal (CHEN et al., 1985a; CHEN et al., 1985b; CHEN et al., 1986). Para confirmação da verdadeira localização das quimeras antígeno/LAMP nos compartimentos lisossomais, seria preciso uma marcação para o LAMP endógeno, o qual não foi possível devido a reação cruzada existente entre o anticorpo primário anti-LAMP utilizado

(produzido em rato), e o anticorpo secundário anti-camundongo destinado a marcação secundária contra o anticorpo policlonal anti-flavívirus produzido em camundongos, o qual era necessário para a detecção da expressão das proteínas prM/E do DENV3. A ausência em nosso laboratório de outros anticorpos contra o LAMP feitos em espécies diferentes aos camundongos, nos impossibilitou de realizar outros ensaios. Acreditamos que os anticorpos policlonais contra a dengue que estão sendo desenvolvidos possam também auxiliar no futuro nos ensaios de tráfego celular, pois deste modo poderemos utilizar anticorpos contra o LAMP produzidos em camundongos já existentes em nosso laboratório.

Infelizmente devido ao curto prazo de tempo não foi incluído neste estudo os ensaios para a avaliação da imunogenicidade dos plasmídeos construídos em animais de laboratório, mas devido a continuidade destes estudos, experimentos em camundongos Balb/C (SPF, Specific Pathogen Free) estão agendados ainda para este ano. As respostas vacinais destes ensaios serão analisadas quanto aos títulos de anticorpos neutralizantes produzidos para cada plasmídeo e quanto a sua capacidade de proteção contra o vírus da dengue sorotipo 3.

Esperamos que a otimização gênica aliado ao direcionamento antigênico via MHC II produza uma resposta imunológica humoral e celular mais robusta nos animais vacinados e que sirva de base futuramente para construção de uma vacina de DNA tetravalente contra o vírus da dengue.

9 CONCLUSÕES

- a) Demonstramos com sucesso a clonagem dos genes das proteínas prM/E do DENV3 otimizados ou não, e fusionados ou não a porção carboxi-terminal da proteína LAMP;
- b) A expressão dos genes clonados puderam ser detectadas através da imunofluorescência das células HEK-293 transfectadas com os plasmídeos otimizados e não-otimizados, fusionados ou não a proteína LAMP;
- c) Não foi possível quantificar a expressão das proteínas construídas através do ensaio de “Western-blot”;
- d) Ensaio de microscopia de confocal demonstraram o fusionamento das proteínas prM/E do DENV3 otimizadas ou não a porção carboxi-terminal do LAMP;
- e) Não foi possível ver a diferença entre as proteínas otimizadas e não-otimizadas nas construções.

10 PESPECTIVAS

A próxima etapa deste estudo será a avaliação da imunogenicidade dos produtos construídos em camundongos. Nestes experimentos poderemos avaliar a influência da otimização gênica e do fusionamento das proteínas prM/E do DENV3 ao LAMP na resposta humoral e celular dos animais vacinados. Vale a pena salientar, que atualmente nenhuma instituição brasileira possui este tipo de tecnologia, e que possa ser aplicado no desenvolvimento de uma vacina de DNA contra o dengue.

Posteriormente pretendemos abranger este estudo para os outros sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, -2 e -4) isolados no Brasil, através da construção de plasmídeos contendo as regiões prM/E otimizadas e fusionadas ao LAMP para cada um destes sorotipo, e deste modo desenvolver uma vacina de DNA tetravalente. Acreditamos que os resultados deste estudo e a continuação deste trabalho nos fornecerá subsídios tecnológicos para aprofundar nossos estudos no desenvolvimento de uma vacina de DNA tetravalente contra o vírus da dengue e, possivelmente, futuramente para outras viroses de importância na saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLE, J. H. et al. A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.163, n.12, p.6756-6761, 1999.

AKBARI, O. et al. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.189, n.1, p.169-178, 1999.

ALVAREZ, M. et al. Study of biologic attributes of Cuban dengue 2 virus after serial passage in primary dog kidney cells. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v.5, n.1, p.35-39, 2001.

ANTO, S. et al. Nutritional status of Dengue haemorrhagic fever in children. **Paediatrica Indonesiana**, Jakarta, v.23, n.1-2, p.15-24, 1983.

ANTUÑANO, F. J. L.; MOTA, J. Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. **Pan American Journal of Public Health**, Washington, v.7, n., p.285-292, 2000.

ANWAR, A. et al. West Nile premembrane-envelope genetic vaccine encoded as a chimera containing the transmembrane and cytoplasmic domains of a lysosome-associated membrane protein: increased cellular concentration of the transgene product, targeting to the MHC II compartment, and enhanced neutralizing antibody response. **Virology**, New York, v.332, n.1, p.66-77, 2005.

APT, D. et al. Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a single chimeric dengue envelope antigen. **Vaccine**, Guildford, v.24, n.3, p.335-344, 2006.

ARIAS, C. F.; PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J. H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Virology**, New York, v.193, n.2, p.888-899, 1993.

ARROYO, J. et al. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. **Journal of Virology**, Baltimore, v.78, n.22, p.12497-12507, 2004.

ARRUDA, L. B. et al. Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.177, n.4, p.2265-2275, 2006.

BALMASEDA, A. et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.74, n.3, p.449-456, 2006.

BARRETT, A. D. Current status of flavivirus vaccines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.951, n., p.262-271, 2001.

BEASLEY, D. W. et al. Protection against Japanese encephalitis virus strains representing four genotypes by passive transfer of sera raised against ChimeriVax-JE experimental vaccine. **Vaccine**, Guildford, v.22, n.27-28, p.3722-3726, 2004.

BHAKDI, S.; KAZATCHKINE, M. D. Pathogenesis of dengue: an alternative hypothesis. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.21, n.4, p.652-657, 1990.

BHAMARAPRAVATI, N.; SUTEE, Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, Guildford, v.18, suppl. 2, n., p.44-47, 2000.

BHAMARAPRAVATI, N.; YOKSAN, S. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. In: GLUBER, D. J. e KUNO, G. (Ed.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. ed. New York: Cab International, 1997. p.367-376.

BLAIR, P. J. et al. Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in Aotus nancymae monkeys. **Vaccine**, Guildford, v.24, n.9, p.1427-1432, 2006.

BLANEY, J. E., et al. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.71, n.6, p.811-821, 2004a.

BLANEY, J. E. et al. Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. **BMC Infectious Diseases**, London, v.4, n., p.39, 2004b.

BLANEY, J. E. et al. Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. **Journal of Virology**, Baltimore, v.79, n.9, p.5516-5528, 2005.

BLANEY, J. E. et al. Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. **Viral Immunology**, New York, v.19, n.1, p.10-32, 2006.

BLANEY, J. E. et al. Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4. **Vaccine**, Guildford, v.26, n.6, p.817-828, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue**. Brasília, DF, 2009. Disponível em <http://www.dengue.org/dengue_mapas.html>. Acessado em : 16 jan. 2009.

BRINKMANN, U.; MATTES, R. E.; BUCKEL, P. High-level expression of recombinant genes in Escherichia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product. **Gene**, Amsterdam, v.85, n.1, p.109-114, 1989.

BURGESS-BROWN, N. A. et al. Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: A multi-gene study. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v.59, n.1, p.94-102, 2008.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. v.1, p.1043-1125.

CALDERONE, T. L.; STEVENS, R. D.; OAS, T. G. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in Escherichia coli. **Journal of Molecular Biology**, London, v.262, n.4, p.407-412, 1996.

CARDOSA, M. J. Dengue vaccine design: issues and challenges. **British Medical Bulletin**, London, v.54, n.2, p.395-405, 1998.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.44, n., p.649-688, 1990.

CHAMBERS, T. J. et al. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting. **Vaccine**, Guildford, v.15, n.14, p.1494-1502, 1997.

CHAN, K. et al. The roles of MHC class II, CD40, and B7 costimulation in CTL induction by plasmid DNA. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.166, n.5, p.3061-3066, 2001.

CHANG, G. Molecular Biology of Dengue Virus. In: GULBLER, D. e KUNO, G. (Ed.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. ed. New York: CAB International, 1997. p.89-113.

CHANG, G. J. et al. Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.951, p.272-285, 2001.

CHEN, J. W. et al. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.101, n.1, p.85-95, 1985a.

CHEN, J. W. et al. Lysosome-associated membrane proteins: characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.239, n.2, p.574-586, 1985b.

CHEN, J. W. et al. Lysosomal membrane glycoproteins: properties of LAMP-1 and LAMP-2. **Biochemical Society Symposia**, New York, v.51, n., p.97-112, 1986.

CHIEWSILP, P.; SCOTT, R. M.; BHAMARAPRAVATI, N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore. v.30, n.5, p.1100-1105, 1981.

CHIKHLIKAR, P. et al. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8(+) responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera. **Virology**, New York, v.323, n.2, p.220-232, 2004.

CHIMELLI, L. et al. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. **Clinical Neuropathology**, Munich Dustrri, v.9, n.3, p.157-162, 1990.

CHUAN, Y. P.; LUA, L. H.; MIDDELBERG, A. P. High-level expression of soluble viral structural protein in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.134, n.1-2, p.64-71, 2008.

CLYDE, K.; KYLE, J.; L.HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, Baltimore, v.80, n.23, p.11418-11431, 2006.

COLOMBAGE, G. et al. DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with prM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. **Virology**, New York, v.250, n.1, p.151-163, 1998

CORDEIRO, M. T. et al. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.77, n.6, p.1128-1134, 2007.

COSTA, S. M.; FREIRE, M. S.; ALVES, A. M. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. **Vaccine**, Guildford, v.24, n.21, p.4562-4564, 2006.

CRABTREE, M. B.; KINNEY, R. M.; MILLER, B. R. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. **Archives of Virology**, Viena, v.150, n.4, p.771-786, 2005.

CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v.75, n.16, p.7769-7773, 2001.

DAVIS, B. S. et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Virology**, Baltimore, v.75, n.9, p.4040-4047, 2001.

DE ARRUDA, L. B. et al. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. **Immunology**, Oxford, v.112, n.1, p.126-133, 2004.

DE BOER, H. A.; KASTELEIN, R. A. Biased codon usage: an exploration of its role in optimization of translation. In: Reznikoff, W. and Gold, L. (eds). **Maximizing Gene Expression**. ed. Stoneham, MA: Butterworth, 1986. p. 225-285.

DE PAULA, S. O. et al. One-Step RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to Two-Step RT-PCR approaches. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v.30, n.4, p.297-301, 2004.

DELGADO, I. et al. Prediction of serotypes of dengue virus by response to IgM antibodies. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Havana, v.54, n.2, p.113-117, 2002.

DONNELLY, J. J. et al. DNA vaccines. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.15, n., p.617-648, 1997.

DRAKE, J. R. et al. Involvement of MIIC-like late endosomes in B cell receptor-mediated antigen processing in murine B cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.162, n.2, p.1150-1155, 1999.

DURBIN, A. P. et al. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.65, n.5, p.405-413, 2001.

DURBIN, A. P. et al. rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. **The journal of infectious Diseases**, Boston, v.191, n.5, p.710-718, 2005.

DURBIN, A. P. et al. The live attenuated dengue serotype 1 vaccine rDEN1Delta30 is safe and highly immunogenic in healthy adult volunteers. **Human Vaccine**, Georgetown, v.2, n.4, p.167-173, 2006a.

DURBIN, A. P. et al. rDEN2/4Delta30(ME), a live attenuated chimeric dengue serotype 2 vaccine is safe and highly immunogenic in healthy dengue-naive adults. **Human Vaccine**, Georgetown, v.2, n.6, p.255-260, 2006b.

EDELMAN, R. et al. A live attenuated dengue-1 vaccine candidate (45AZ5) passaged in primary dog kidney cell culture is attenuated and immunogenic for humans. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v.170, P.1448–1455, 1994.

EDELMAN, R. et al. Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.69, n.6 suppl., p.48-60, 2003.

EGLOFF, M. P. et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.21, n.11, p.2757-2768, 2002.

ENDY, T. P. et al. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.156, n.1, p.52-59, 2002.

ENDY, T. P., et al. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v.189, n.6, p.990-1000, 2004.

FIGUEIREDO, L. T. Vacinas contra o dengue. **Medicina** (Ribeirão Preto), Ribeirão Preto, p.21-25, 1999.

FONSECA, B. A. et al. Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, Guildford, v.12, n.3, p.279-285, 1994.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 6 ed., p.231, 2005.

GEUZE, H. J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. **Immunology Today**, Cambridge, v.19, n.6, p.282-287, 1998.

GREEN, S. et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v.179, n.4, p.755-762, 1999.

GUARNIERI, F. G. et al. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.268, n.3, p.1941-1946, 1993.

GUBLER, D. J. Dengue in the United States, 1981. **Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries**, Atlanta, v.32, n.1, p.23SS-26SS, 1983.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.11, n.3, p.480-496, 1998.

GUBLER D. J. CLARK G. G. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.50, n.6 Suppl, p.50-60, 1994.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.1, n.2, p.55-57, 1995.

GUIRAKHOO, F. et al. Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. **Virology**, New York, v.194, n.1, p.219-223, 1993.

GUIRAKHOO, F. et al. Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric yellow fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live,

attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. **Virology**, New York, v.257, n.2, p.363-372, 1999.

GUIRAKHOO, F. et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. **Journal of Virology**, Baltimore, v.75, n.16, p.7290-7304, 2001.

GUIRAKHOO, F. et al. Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. **Virology**, New York, v.298, n.1, p.146-159, 2002.

GUIRAKHOO, F. et al. Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. **Journal of Virology**, Baltimore, v.78, n.9, p.4761-4775, 2004.

GUIRAKHOO, F. et al. Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. **Human Vaccine**, Georgetown, v.2, n.2, p.60-67, 2006.

GUY, B.; ALMOND, J. W. Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, New York, v.31, n.2-3, p.239-252, 2008.

GUY B.; BARBAN V.; MANTEL N., et al. Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.80, n.2, p.302-311, 2009.

GUZMAN, M. G. et al. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, Washington, v.18, n.3, p.213-220, 1984.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.42, n.2, p.179-184, 1990.

GUZMAN, M. G. et al. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v.6, n.2, p.118-124, 2002a.

GUZMAN, M. G. et al. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. **Pan American Journal of Public Health**, Washington, v.11, n.4, p.223-227, 2002b.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v.42, n.5, p.350-362, 1970.

HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.58, n.1, p.1-21, 1980.

HALSTEAD, S. B. The Alexander D. Langmuir Lecture. The pathogenesis of dengue. Molecular epidemiology in infectious disease. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.114, n.5, p.632-648, 1981.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**. Washington, v.239, n.4839, p.476-481, 1988.

HALSTEAD, S. B. et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.8, n.12, p.1474-1479, 2002.

HALSTEAD, S. B.; NIMMANNITYA, S.; COHEN, S. N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v.42, n.5, p.311-328, 1970.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.146, n.1, p.201-217, 1977.

HALSTEAD, S. B. et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.65, n.3, p.180-183, 2001.

HERMIDA, L. et al. A fragment of the envelope protein from dengue-1 virus, fused in two different sites of the meningococcal P64k protein carrier, induces a functional immune response in mice. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v.39, n.Pt 1, p.107-114, 2004.

HERMIDA, L. et al. A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue-2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates. **Vaccine**, Guildford, v.24, n.16, p.3165-3171, 2006.

HOMBACH, J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. **Pan American Journal of Public Health**, Washington, v.21, n.4, p.254-260, 2007.

HUANG, C. Y. et al. Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. **Journal of Virology**, Baltimore, v.77, n.21, p.11436-11447, 2003.

HUNG, S. L. et al. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. **Virology**, New York, v.257, n.1, p.156-167, 1999.

IMOTO, J.; KONISHI, E. Dengue tetravalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. **Vaccine**, Guildford, v.25, n.6, p.1076-1084, 2007.

INNIS, B. L.; ECKELS, K. H. Progress in development of a live-attenuated, tetravalent dengue virus vaccine by the United States Army Medical Research and Materiel Command. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.69, n.6 Suppl, p.1-4, 2003.

IZQUIERDO, A. et al. Serotype-specificity of recombinant fusion proteins containing domain III of dengue virus. **Virus Research**, Amsterdam, v.138, n.1-2, p.135-138. 2008.

JACOBS, M; .YOUNG, P. Dengue vaccines: preparing to roll back dengue. **Current Opinion in Investigational Drugs**, London v.4, n.2, p.168-171, 2003.

JANSSEN, E. M. et al. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. **Nature**, New York, v.421, n.6925, p.852-856, 2003.

JI, H. et al. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. **Human Gene Therapy**, New York , v.10, n.17, p.2727-2740, 1999.

JOHNSON, A. J.; GUIRAKHOO, F.; ROEHRIG, J. T. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. **Virology**, New York, v.203, n.2, p.241-249, 1994.

JOHNSON, B. W. et al. Growth characteristics of the veterinary vaccine candidate ChimeriVax-West Nile (WN) virus in *Aedes* and *Culex* mosquitoes. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.17, n.3, p.235-243, 2003.

JOHNSON, B. W. et al. Analysis of the replication kinetics of the ChimeriVax-DEN 1, 2, 3, 4 tetravalent virus mixture in *Aedes aegypti* by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.70, n.1, p.89-97, 2004.

KAECH, S. M.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, London, v.2, n.4, p.251-262, 2002.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.6, n.5, p.494-500, 1995.

KANESA-THASAN, N. et al. Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus--poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. **Vaccine**, Guildford, v.19, n.4-5, p.483-491, 2000.

KANESA-THASAN, N. et al. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. **Vaccine**, Guildford, v.19, n.23-24, p.3179-3188, 2001.

KANESA-THASAN, N. et al. Phase 1 studies of Walter Reed Army Institute of Research candidate attenuated dengue vaccines: selection of safe and immunogenic monovalent vaccines. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.69, p.17-23, 2003.

KAUFMAN, B. M. et al. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.36, n.2, p.427-434, 1987.

KAUFMAN, B. M. et al. Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.41, n.5, p.576-580, 1989.

KHIN, M. M. et al. Infection, dissemination, transmission, and biological attributes of dengue-2 PDK53 candidate vaccine virus after oral infection in *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.51, n.6, p.864-869, 1994.

KITCHENER, S. et al. Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. **Vaccine**, Guildford, v.24, n.9, p.1238-1241, 2006.

KLEIJMEER, M. J. et al. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.139, n.3, p.639-649, 1997.

KLIKS, S. C. et al. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.38, n.2, p.411-419, 1988.

KLIKS, S. C. et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.40, n.4, p.444-451, 1989.

KOCHEL, T. et al. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, Guildford, v.15, n.5, p.547-552, 1997.

KOCHEL, T. J. et al. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. **Vaccine**, Guildford, v.18, n.27, p.3166-3173, 2000.

KONISHI, E.; FUJII, A. Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. **Vaccine**, Guildford, v.20, n.7-8, p.1058-1067, 2002.

KONISHI, E.; FUJII, A.; MASON, P. W. Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. **Journal Virology**, Baltimore, v.75, n.5, p.2204-2212, 2001.

KONISHI, E.; KOSUGI, S.; IMOTO, J. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. **Vaccine**, Guildford, v.24, n.12, p.2200-2207, 2006.

KONISHI, E. et al. A highly attenuated host range-restricted vaccinia virus strain, NYVAC, encoding the prM, E, and NS1 genes of Japanese encephalitis virus prevents JEV viremia in swine. **Virology**, New York, v.190, n.1, p.454-458, 1992a.

KONISHI, E. et al. Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus prM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. **Virology**, New York, v.188, n.2, p.714-720, 1992b.

KONISHI, E. et al. A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. **Vaccine**, Guildford, v.18, n.11-12, p.1133-1139, 2000a.

KONISHI, E. et al. Japanese encephalitis DNA vaccine candidates expressing premembrane and envelope genes induce virus-specific memory B cells and long-lasting antibodies in swine. **Virology**, New York, v.268, n.1, p.49-55, 2000b.

KOURI, G. P.; GUZMAN, M. G.; BRAVO, J. R. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.81, n.5, p.821-823, 1987.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, Cambridge, v.108, n.5, p.717-725, 2002.

KURANE, I. et al. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v.88, n.5, p.1473-1480, 1991.

KURANE, I. et al. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. **Archives of Virology Supplement**, Viena, v.9, n., p.59-64, 1994.

KURANE, I.; MEAGER, A.; ENNIS, F. A. Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.170, n.3, p.763-775, 1989.

LAI, C. J.; MONATH, T. P. Chimeric flaviviruses: novel vaccines against dengue fever, tick-borne encephalitis, and Japanese encephalitis. **Advances in Virus Research**, New York, v.61, p.469-509, 2003.

LAOPRASOPWATTANA, K. et al. Dengue Virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v.192, n.3, p.510-519, 2005.

LAZO, L. et al. The Dengue-4 envelope domain III fused twice within the meningococcal P64k protein carrier induces partial protection in mice. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v.52, p.265-271, 2009.

LECLERC, C. et al. Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. **Molecular Immunology**, Oxford, v.30, n.7, p.613-625, 1993.

LEE, E.; WEIR, R. C.; ALGARNO L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. **Virology**, New York, v.232, n.2, p.281-290, 1997.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal Virology**, Baltimore, v.73, n.6, p.4738-4747, 1999.

LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The journal of infectious Diseases**, Boston, v.186, n.8, p.1165-1168, 2002.

LIEBERMAN, M. M. et al. Preparation and immunogenic properties of a recombinant West Nile subunit vaccine. **Vaccine**, Guildford, v.25, n.3, p.414-423, 2007.

LIN, C. W. et al. Protective immunity of E. coli-synthesized NS1 protein of Japanese encephalitis virus. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.30, n.2, p.205-214, 2008.

LIN, K. Y. et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Research**, Baltimore, v.56, n.1, p.21-26, 1996.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2001. p.991-1041, v.1.

LIU, M. A. DNA vaccines: a review. **Journal of internal medicine**, Oxford, v.253, n.4, p.402-410, 2003.

LIVINGSTON, P. G. et al. Dengue virus-specific, HLA-B35-restricted, human CD8+ cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones. Recognition of NS3 amino acids 500 to 508 by CTL clones of two different serotype specificities. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.154, n.3, p.1287-1295, 1995.

LORENZ, I. C. et al. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**, Baltimore, v.76, n.11, p.5480-5491, 2002.

LOZACH, P. Y. et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.280, n.25, p.23698-23708, 2005.

LU, Y. et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, Guildford, v.21, n.17-18, p.2178-2189, 2003.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, New York, v.220, n.1, p.232-240, 1996.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, New York, v.10, n.12, suppl., p.S98-109, 2004.

MAECKER, H. T. et al. Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via class II MHC. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.161, n.12, p.6532-6536, 1998.

MARKOFF, L.; FALGOUT, B.; CHANG, A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. **Virology**, New York, v.233, n.1, p.105-117, 1997.

MARQUES, E. T. et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, n.39, p.37926-37936, 2003.

MARTINEZ-TORRES, M. E. **Dengue hemorrágico em crianças**: editorial. Havana: José Martí, p.1-180, 1990.

MASON, P. W. et al. Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. **Virology**, New York, v.180, n.1, p.294-305, 1991.

MATHEWS, J. H. et al. T-helper cell and associated antibody response to synthetic peptides of the E glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus. **Journal of Virology**, Baltimore, v.65, n.10, p.5141-5148, 1991.

MESSER, W. B. et al. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.9, n.7, p.800-809, 2003.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.35, n.8, p.869-872, 2002.

MILLER, S. et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.282, n.12, p.8873-8882, 2007.

MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.281, n.13, p.8854-8863, 2006.

MINKE, J. M. et al. Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. **Archives of Virology Supplement**, Viena, v.18, p.221-230, 2004.

MONATH, T. P. et al. Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. **Vaccine**, Guildford, v.20, n.7-8, p.1004-1018, 2002.

MORENO, J. et al. Processing of an endogenous protein can generate MHC class II-restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.147, n.10, p.3306-3313, 1991.

MUNOZ-JORDAN, J. L. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.100, n.24, p.14333-14338, 2003.

NAVARRO-SANCHEZ, E. et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO reports**, Oxford, v.4, n.7, p.723-728, 2003.

NGUYEN, T. H. et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. **The journal of infectious Diseases**, Boston, v.189, n.2, p.221-232, 2004.

NISALAK, A. et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.68, n.2, p.191-202, 2003.

NOGUEIRA, R. M. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.11, n.9, p.1376-1381, 2005.

NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.33, n.1, p.68-71, 2002.

NOMAGUCHI, M. et al. De novo synthesis of negative-strand RNA by Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. **Journal of Virology**, Baltimore, v.77, n.16, p.8831-8842, 2003.

NOWAK, T.; FARBER, P. M.; WENGLER, G. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. **Virology**, New York, v.169, n.2, p.365-376, 1989.

OBERMULLER, S. et al. The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. **Journal of Cell Science**, London, v.115, n.Pt 1, p.185-194, 2002.

OCAZIONEZ JIMENEZ, R.; LOPES DA FONSECA, B. A. Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice. **Vaccine**, Guildford, v.19, n.6, p.648-654, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**, Gêneva, 1997.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control**. Washington, 1994 (Scientific publication 548).

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. **Epidemiological Bulletin-PAHO**, Washington, v.23, n.1, p.3-6, 2002.

PANG, T. Dengue haemorrhagic fever: virus or host response? **BioEssays**, Cambridge, v.6, n.3, p.141-144, 1987.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunology and Cell Biology**, Canberra, v.85, n.1, p.43-45, 2007.

PARKER, K. C.; WILEY, D. C. Overexpression of native human beta 2-microglobulin in *Escherichia coli* and its purification. **Gene**, Amsterdam v.83, n.1, p.117-124, 1989.

PATEY, O. et al. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.48, n.6, p.793-802, 1993.

PETERS, P. J. et al. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. **Nature**, London, v.349, n.6311, p.669-676, 1991.

PHILLPOTTS, R. J.; VENUGOPAL, K.; BROOKS, T. Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. **Archives of Virology**, Viena, v.141, n.3-4, p.743-749, 1996.

PINCUS, S. et al. Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. **Virology**, New York, v.187, n.1, p.290-297, 1992.

PLETNEV, A. G. et al. West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, n.5, p.3036-3041, 2002.

POKIDYSHEVA, E. et al. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. **Cell**, Cambridge, v.124, n.3, p.485-493, 2006.

PORTER, K. R. et al. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. **Archives of Virology**, Vienna, v.143, n.5, p.997-1003, 1998.

PUGACHEV, K. V. et al. High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. **Journal Virology**, Baltimore, v.78, n.2, p.1032-1038, 2004.

PUTNAK, R. et al. Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.68, n.4, p.469-476, 2003.

QIAO, M. et al. Induction of sterilizing immunity against West Nile Virus (WNV), by immunization with WNV-like particles produced in insect cells. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v.190, n.12, p.2104-2108, 2004.

RAVIPRAKASH, K. et al. A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. **Virology**, New York, v.353, n.1, p.166-173, 2006.

RAVIPRAKASH, K. et al. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. **Virology**, New York, v.290, n.1, p.74-82, 2001.

RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, Washington, v.229, n.4715, p.726-733, 1985.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, New York, v.59, n., p.315-341, 2003.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, New York, v.230, n.2, p.244-251, 1997.

ROBERT PUTNAK, J. et al. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, Guildford, v.23, n.35, p.4442-4452, 2005.

ROCCO, I. M.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.43, n.1, p.55-57, 2001.

ROEHRIG, J. T.; BOLIN, R. A.; KELLY, R. G. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**, New York, v.246, n.2, p.317-328, 1998.

ROEHRIG, J. T. et al. T-helper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue 2 Jamaica virus. **Virology**, New York, v.198, n.1, p.31-38, 1994.

ROHRER, J. et al. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.132, n.4, p.565-576, 1996.

ROSENDAAL, J. et al. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and Golgi trafficking of the NS4A protein. **Journal of Virology**, Baltimore, v.80, n.9, p.4623-4632, 2006.

ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.26, n.3, p.337-343, 1977.

ROSEN, L. Pathogenesis of hemorrhagic dengue: critical discussion of current hypotheses. **Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales**, Paris, v.79, n.3, p.342-349, 1986.

ROSENBERG, H. F. Bacterial chromosomal contamination of a eukaryotic cDNA library. **Biotechniques**, Natick, v.15, n.2, p.200-201, 1993.

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

ROWELL, J. F. et al. Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.155, n.4, p.1818-1828, 1995.

RUFF, A. L. et al. The enhanced immune response to the HIV gp160/LAMP chimeric gene product targeted to the lysosome membrane protein trafficking pathway. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.272, n.13, p.8671-8678, 1997.

SABCHAREON, A. et al. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v.66, n.3, p.264-272, 2002.

SABCHAREON, A. et al. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v.23, n.2, p.99-109, 2004.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.1, n.1, p.30-50, 1952.

SCHMALJOHN, C. et al. Naked DNA vaccines expressing the prM and E genes of Russian spring summer encephalitis virus and Central European encephalitis virus protect mice from homologous and heterologous challenge. **Journal Virology**, Baltimore. v.71, n.12, p.9563-9569, 1997.

SEEMA; JAIN S. Molecular Mechanism of Pathogenesis of Dengue Virus: Entry and Fusion with Target Cell. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v.20, n.2, p.92-103, 2005.

SENEVIRATNE, S. L.; MALAVIGE, G. N.; DE SILVA, H. J. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.100, n.7, p.608-614, 2006.

SOLOMON, T. et al. Neurological manifestations of dengue infection. **The Lancet**, London. v.355, n.9209, p.1053-1059, 2000.

SPANJAARD, R. A. et al. Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to argU tRNA and T4 tRNA(Arg). **Nucleic Acids Research**, London, v.18, n.17, p.5031-5036, 1990.

SRIVASTAVA, I. K.; LIU, M. A. Gene vaccines. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v.138, n.7, p.550-559, 2003.

SU, Z. et al. Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product. **Cancer Research**, Baltimore, v.62, n.17, p.5041-5048, 2002.

SUN, W. et al. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.69, P.24-31, 2003.

TAN, B. H. et al. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. **Virology**, New York, v.216, n.2, p.317-325, 1996.

TEIXEIRA, Mda. G. et al. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.7, n.9, p.757-762, 2002.

THISYAKORN, U.; NIMMANNITYA, S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.16, n.2, p.295-297, 1993.

TIMOFEEV, A. V.; BUTENKO, V. M.; STEPHENSON, J. R. Genetic vaccination of mice with plasmids encoding the NS1 non-structural protein from tick-borne encephalitis virus and dengue 2 virus. **Virus Genes**, Boston, v.28, n.1, p.85-97, 2004.

TSEN, S. W. et al. Enhancing DNA vaccine potency by modifying the properties of antigen-presenting cells. **Expert Review of Vaccines**, v.6, n.2, p.227-239, 2007.

TURLEY, S. J. et al. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. **Science**, Washington, v.288, n.5465, p.522-527, 2000.

UEHARA, P. M. et al. Liver involvement in patients with dengue hemorrhagic fever: a rare phenomenon? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.6, p.544-547, 2006.

UMAREDDY, I. et al. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **The Journal of General Virology**, London, v.87, n.Pt 9, p.2605-2614, 2006.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The journal of infectious Diseases**, Boston, v.181, n.1, p.2-9, 2000.

VENUGOPAL, K.; GOULD, E. A. Towards a new generation of flavivirus vaccines. **Vaccine**, Guildford, v.12, n.11, p.966-975, 1994.

WESTAWAY, E. G. et al. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. **Journal of Virology**, Baltimore, v.71, n.9, p.6650-6661, 1997.

WHITEHEAD, S. S. et al. Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. **Vaccine**, Guildford, v.21, n.27-30, p.4307-4316, 2003.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.5, n.7, p.518-528, 2007.

WU, T. C. et al. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, n.25, p.11671-11675, 1995.

WU, S. F. et al. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. **Vaccine**, Guildford, v.21, n.25-26, p.3919-3929, 2003.

ZHANG, S. P.; ZUBAY, G.; GOLDMAN, E. Low-usage codons in Escherichia coli, yeast, fruit fly and primates. **Gene**, Amsterdam, v.105, n.1, p.61-72, 1991.

ZHANG, Y. M. et al. Immunization of mice with dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. **Journal of Virology**, Baltimore, v.62, n.8, p.3027-3031, 1988.

ZULUETA, A. et al. Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. **Virus Research**, Amsterdam, v.121, n.1, p.65-73, 2006.

Apêndice A – Artigo em preparação

Clonagem, expressão e análise do tráfego celular das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 3 fusionadas a proteína lisossomal LAMP.

Georgia de Freitas Guimarães^a, Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior^{a,b}, Laura Helena Vega Gonzales Gil^a.

^a Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife-PE, Brasil.

^b The Johns Hopkins School of Medicine, Department of Pharmacology and Molecular Sciences, 725 North Wolfe, Baltimore, MD 21205, USA.

Resumo. A infecção com o vírus da dengue constitui um sério problema de saúde pública no mundo, tornando-se necessário o desenvolvimento de uma vacina tetravalente que possa proteger contra os quatro sorotipos da dengue. Neste estudo foram desenvolvidos uma série de plasmídeos expressando as proteínas pré-membrana e envelope do vírus da dengue sorotipo 3. Para uma melhor resposta vacinal alguns construídos tiveram suas sequências gênicas otimizadas e ou fusionadas a proteína lisossomal LAMP (p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP). A expressão das proteínas pré-membrana e envelope pelos plasmídeos contruídos foi confirmada por ensaio de imunofluorescência em células HEK-293 transfectadas. Nos estudos de tráfego celular por microscopia confocal observou-se, como esperado, a localização lisossomal dos plasmídeos fusionados com a porção c-terminal de LAMP, e uma distribuição perinuclear dos plasmídeos sem fusão com LAMP. Acreditamos que os frutos adquiridos neste projeto serão de grande benefício para o desenvolvimento futuro de uma vacina de DNA tetravalente contra o vírus da dengue.

Palavras chave: dengue sorotipo 3, vacina de DNA, LAMP.

INTRODUÇÃO

A Dengue é uma doença causada por um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) pertencente ao gênero Flavivírus e família Flaviviridae (LINDENBACH; RICE, 2001). O vírus da dengue possui 4 sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, -2, -3 e -4), que são transmitidos ao homem através da picada de mosquitos do gênero Aedes, sendo o Aedes aegypti considerado o principal vetor da doença (BURKE; MONATH, 2001).

O controle do dengue é feito, nos dias atuais, em todo o mundo, seguindo as normas gerais de combate aos mosquitos vetores preconizadas pelos médicos sanitaristas do começo do século (FIGUEIREDO, 1996). O controle e a erradicação do mosquito Aedes aegypti, vetor do dengue, é um procedimento bastante difícil, que necessita de grandes investimentos

com funcionários, máquinas, inseticidas e campanhas educacionais, permanentes, que mobilizem toda a comunidade (GUBLER; CLARK, 1994). A alternativa ideal para o controle do dengue seria através do uso de vacinas.

Atualmente não existem vacinas seguras e eficazes contra a dengue. Dois fatores principais têm dificultado o seu desenvolvimento. O primeiro é que a vacina precisa promover imunidade duradoura contra os quatro sorotipos de dengue. O segundo é a falta de uma metodologia para prever como as respostas imunes induzidas pela vacina iriam interferir com os mecanismos imunopatogênicos da FHD, podendo até promover efeitos deletérios. Assim, uma vacina ideal contra dengue deverá cumprir as seguintes exigências: promover imunização duradoura contra os 4 sorotipos (não causando ADE); ter baixo custo; ter baixa toxicidade (principalmente neuro e hepatotoxicidade); manter títulos virais no refrigerador ou à temperatura ambiente por 3 dias (BHAMARAPRAVATI; YOKSAN, 1997).

Várias estratégias de vacina de DNA vêm sendo desenvolvidas e analisadas contra o vírus da dengue. Apesar dos esforços supracitados, as formulações de vacina de DNA não foram satisfatórias para a indução de anticorpos neutralizantes suficientes para gerar uma resposta imune eficaz e duradoura. A ineficiência destas estratégias de vacinação está muito provavelmente relacionada ao mecanismo de apresentação destes antígenos ao sistema imune dos hospedeiros. Isto se deve ao fato de que a maioria dos antígenos produzidos endogenamente, característicos das vacinas de DNA, sejam seqüestrados e apresentados ao sistema imune do hospedeiro por moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHC I). A via MHC I de processamento e apresentação antigênica está mais associada à resposta celular citotóxica, não estimulando uma resposta humoral suficiente para a geração de altos títulos de anticorpos neutralizantes (essenciais para uma resposta eficiente contra infecções virais) (AKBARI et al., 1999; MORENO et al., 1991).

A possibilidade de direcionamento de antígenos, produzidos endogenamente, para o processamento via MHC II foi firmemente reforçada após o descobrimento de uma proteína transmembrana do tipo I denominada de “Lysosome-Associated Membrane Protein”-LAMP (Chen et al., 1985). A constatação da colocalização das moléculas LAMP e MHC II vem servindo como suporte para a utilização de antígenos quiméricos, contendo as seqüências alvos de LAMP, visando o direcionamento do processamento antigênico para o compartimento MHC II (LU et al., 2003; MARQUES et al., 2003).

Apesar das vacinas de DNA serem pouco imunogênicas, as vacinas de DNA contra o vírus da dengue sorotipo 2 fusionados ao LAMP têm se mostrado altamente promissoras em estudos pré-clínicos (ANWAR et al., 2005; LU et al., 2003; RAVIPRAKSHI et al., 2001). O

direcionamento do processamento antigênico para o compartimento MHC II auxilia na potencialização da resposta deste tipo de vacina. Aliado a esta estratégia, podemos contar com a otimização gênica, que se baseia na troca de códons, sem alterar a sequência de aminoácidos. Isto resulta num aumento na expressão do antígeno, colaborando na melhora da imunogenicidade da vacina de DNA. O presente estudo demonstra a construção e a análise de expressão protéica em cultivo celular de plasmídeos que codifiquem os genes das proteínas prM/E do vírus da dengue do sorotipo 3. Com o intuito de se utilizar futuramente estas construções plasmidiais como agente vacinal, os códons destes antígenos foram otimizados e clonados em vetores plasmidiais capazes de direcionar a expressão para o compartimento lisossomal celular. Esperamos que estas construções induzam uma melhor resposta imunológica contra o vírus do dengue e que no futuro possamos desenvolver uma vacina tetravalente eficaz e segura contra o vírus da dengue.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de células e vírus. Células HEK-293 foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's MédiuM) suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% de 2 mM L-glutamina (Invitrogen) e 1% de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina, Gibco), em estufa 37°C com 5% de CO₂. Células HEK 293 com 80-90% de confluência foram infectadas com quimera de febre amarela com dengue sorotipo 3, YFV-DENV3 (Clone #3) (GIL et al. dados não publicados) e incubada a 37° C em meio de manutenção (5% de soro fetal bovino). As células infectadas foram utilizadas como controle positivo para microscopia de imunofluorescência, confocal e “Western Blot”.

Construção dos plasmídeos. Para a construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E, a sequência do gene da proteína prM/E foi amplificada por PCR, com primers específicos contendo o sítio de restrição para a clonagem do gene ao vetor, a sequência Kozak e um iniciador ATG. Posteriormente, o produto de PCR foi digerido com as enzimas AvrII e NotI (New England BioLab_m) e inserido no plasmídeo p43.2 (gentilmente cedido pelo Dr. Ernesto T. A. Marques Jr, The Johns Hopkins School of Medicine, EUA), entre os sítios de clivagem NheI e NotI (New England BioLab_m), gerando o plasmídeo p43-DENV3-prM/E. O plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP contendo prM/E foi construído substituindo o domínio transmembrana C-terminal da proteína E pelo domínio C-terminal da proteína LAMP-1 contida no plasmídeo p43 HIVhumanLAMP/Gag (CHIKHLIKAR et al., 2004), utilizando as

enzimas *NheI* e *EcoRI* (*New England BioLab_{inc.}*). A sequência referente as proteínas prM e E (GenBank AY038605) foi otimizada pelo programa LETO 1.0 (Entelechon GmbH, versão 1.0.11), a partir de parâmetros como, *codon usage*, estrutura secundária do mRNA e sequências repetitivas. Esta sequência otimizada foi sintetizada pela Geneart (GENEART Inc, Toronto, ON). O gene sintetizado foi inserido no vetor p43 HIVhumanLAMP/Gag (CHIKHLIKAR et al., 2004), entre os sítios de clivagem *NheI* e *KpnI* (*New England BioLab_{inc.}*), gerando o plasmídeo p43-DENV3-prME-opt, e entre os sítio *NheI* e *EcoRI* (*New England BioLab_{inc.}*) gerando o plasmídeo p43-DENV3-prME-opt-LAMP (Figura 1).

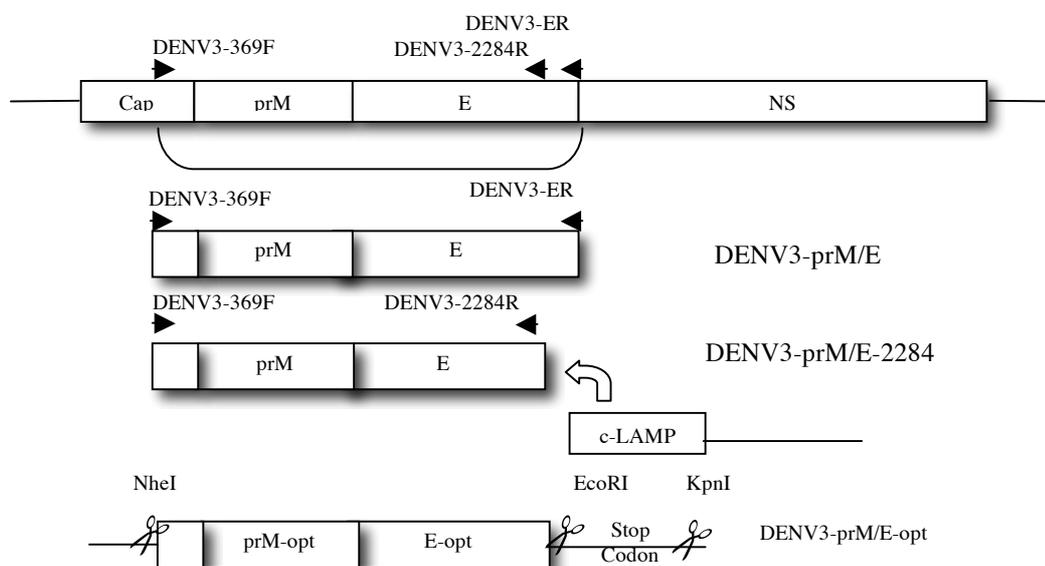


Figura 1. Esquema dos fragmentos gerados para produzir os plasmídeos selvagens e otimizados. O esquema mostra o genoma do vírus da dengue composto pelas proteínas estruturais (Cap- Capsídeo, prM- pré-Membrana, e E- Envelope) e pelas NS- proteínas não estruturais. As setas indicam os primers utilizados para amplificação (DENV-369F, DENV3-ER e DENV3-2284R). p43 HIVhumanLAMP/Gag- vetor que será utilizado nas construções, possibilitando a fusão, *in frame*, das proteínas prM/E com a porção c-terminal de LAMP, este mesmo vetor pode servir de base para construção sem LAMP. DENV3-prM/E é o fragmento utilizado na construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E. DENV3-prM/E-2284 é o fragmento utilizado para construção do plasmídeo p43-DENV3-prM/E-LAMP. Abaixo, tem a representação esquemática do fragmento otimizado que compreende os nucleotídeos 369 e 2284 do DENV3 (GenBank AY038605), o DENV3-prM/E-opt, que foi utilizado para construção dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP.

Transfecção. Células HEK-293 foram transfectadas com os plasmídeos p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP, p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-otp-LAMP, utilizando o kit PolyFect® Transfection Reagent (QiAGEN, Valencia, CA). A transfecção foi conduzida em placas de 6 poços, para os ensaios de imunofluorescência e Western Blot, com 2 µg de DNA para cada plasmídeo e 20 µl de PolyFect Reagent, de acordo com as instruções do fabricante. Para os ensaios de microscopia confocal, as células HEK-293 foram semeadas em Lab-Tek® Chamber Slide de 8 poços (Campbell, CA), utilizando 200 ng de DNA para

cada plasmídeo e 2 μ l de PolyFect Reagent. Após 48 horas, lâminas contendo as células transfectadas foram fixadas ou lisadas para realização dos devidos ensaios.

Western Blot. 48 horas após a transfecção, as células HEK-293 foram lisadas com 200 μ l de tampão de lise (Tris-HCL/SDS, pH6.8 ; Glicerol ; SDS ; DTT ; Azul de Bromofenol). As amostras protéicas dos extratos celulares foram fracionadas em gel SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas Hybond™ECL™ Nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech), em sistema semi-seco de transferência (Bio-Rad). O anticorpo monoclonal mouse **4G2**, específico para proteína E dos flavivírus (Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP, Curitiba – PR) foi utilizado como anticorpo primário. Como anticorpo secundário, foi utilizado anti-camundongo IgG, conjugado a peroxidase (Sigma). As bandas protéicas reativas foram detectadas pelo kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), e em seguida revelada pela exposição da membrana ao filme radiográfico Kodak BioMax MR Film (Kodak).

Microscopia de fluorescência. As células HEK-293 transfectadas foram fixadas com 48 horas após a transfecção, com solução gelada de metanol 100%. As lâminas foram incubadas com Anticorpo primário Fluido ascítico hiperimune para *flavivírus*, por uma hora, posteriormente, lavadas com 1X PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo IgG, produzido em caprinos e conjugado a marca de fluorescência FITC (1mg/ml). A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o microscópio Leica DMI 4000B. Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células.

Microscopia confocal. Após 48 horas da transfecção, as câmaras do Lab-Tek® Chamber Slide (Campbell, CA) foram retiradas e as lâminas lavadas com tampão PBS 1X, fixadas com metanol 100% e posteriormente bloqueada com uma solução de PBS 1X/ BSA 1% por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação orbital. As lâminas foram incubada com o anticorpo primário Fluido ascítico hiperimune para *flavivírus*, por uma horas a temperatura ambiente, depois foram lavadas com 1X PBS e incubadas com um o anticorpo secundário anti-camundongo IgG, produzido em caprinos, conjugado a marca de fluorescência FITC (1mg/ml). Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia

das células. A localização celular das proteínas foi confirmada por microscopia confocal utilizando o microscópio Leica TCS SP2 OABS.

RESULTADOS

Análise da expressão dos plasmídeos p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-opt, p43-DENV3-prM/E-LAMP e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP em células transfectadas. A expressão protéica dos plasmídeos construídos neste estudo foi confirmada por microscopia de imunofluorescência de células transfectadas com os DNAs plasmidiais. Neste ensaio foi possível observar uma forte fluorescência das células transfectadas com os plasmídeos construídos (Fig 2). Infelizmente, não foi possível detectar a expressão através do “Western-blot”, acredita-se que isto se deva ao fato da pouca concentração de células que expressem as proteínas após a transfecção, ou devido a problemas de reconhecimento conformacional dos anticorpos testados.

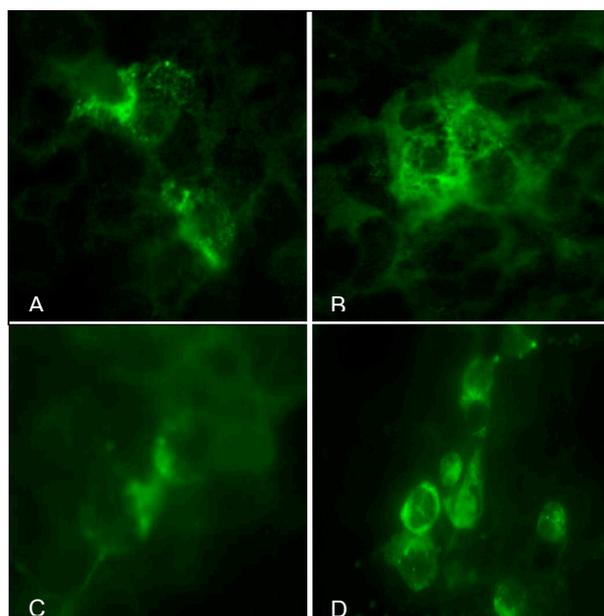
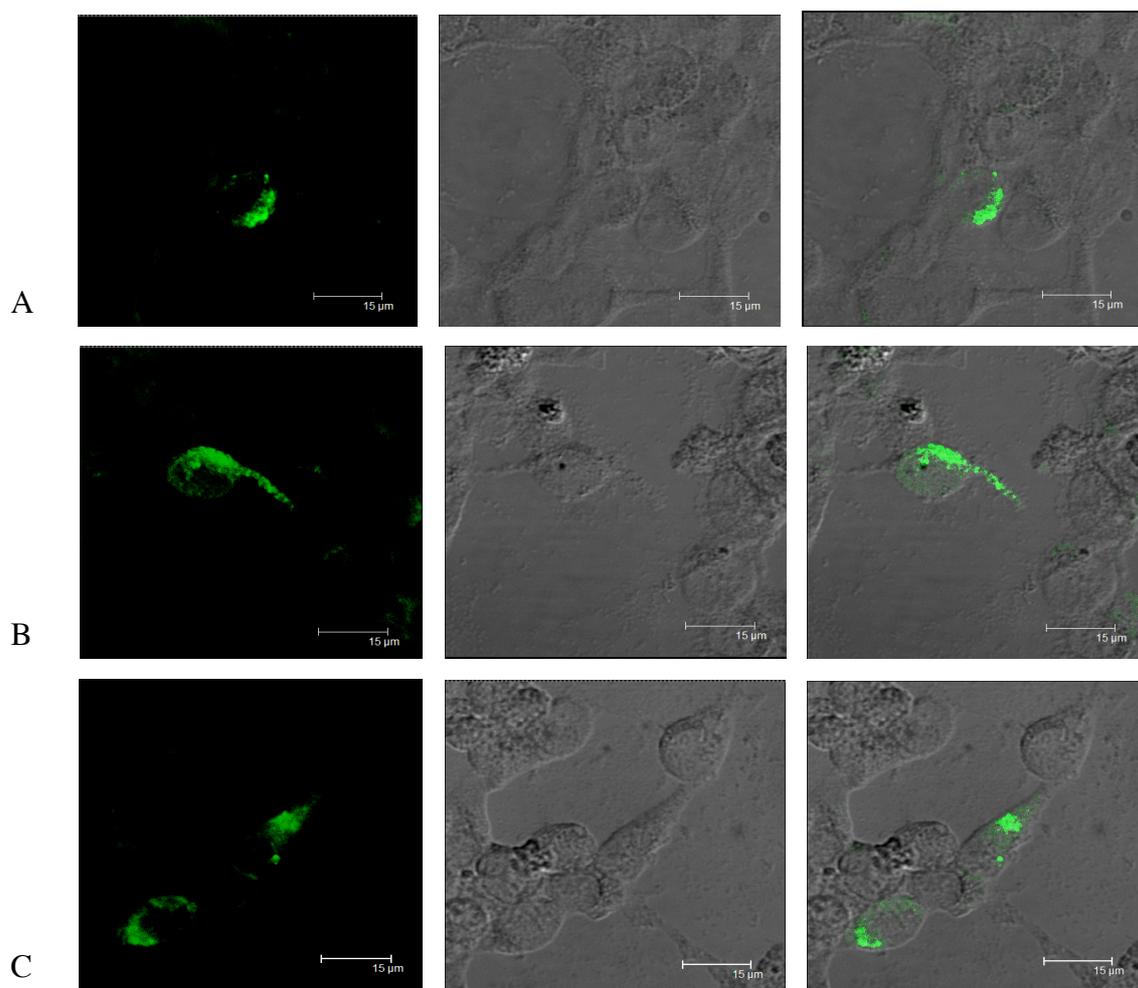


Figura 2. Células HEK-293 transfectadas com as construções p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP; p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP. A validação da expressão das proteínas codificadas pelos plasmídeos p43-DENV3-prM/E (A), p43-DENV3-prM/E-LAMP (B); p43-DENV3-prM/E-opt (C) e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP (D) foi realizado através de ensaio de imunofluorescência. A proteína prM/E foi detectada através do anticorpo policlonal para flavivírus.

Tráfego celular das proteínas prM/E expressas pelos plasmídeos p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-opt, p43-DENV3-prM/E-LAMP e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP.

Diversas construções contendo antígenos fusionados ao LAMP já foram desenvolvidos e demonstram em estudos de tráfego celular a colocalização *in vitro* do antígeno com proteínas lisossomais como MHC II, LAMP-1, LAMP-2, e H-2M. Em nossos estudos de tráfego celular através de ensaios de microscopia confocal, foi possível deduzir a localização das proteínas prM/E do DENV3 fusionadas a LAMP, otimizadas e não otimizadas, em compartimentos lisossomais, enquanto que as proteínas não fusionadas a LAMP, apresentaram-se nos compartimentos reticulares, na região perinuclear (Figura 3), confirmando deste modo o fusão destes antígenos ao LAMP.



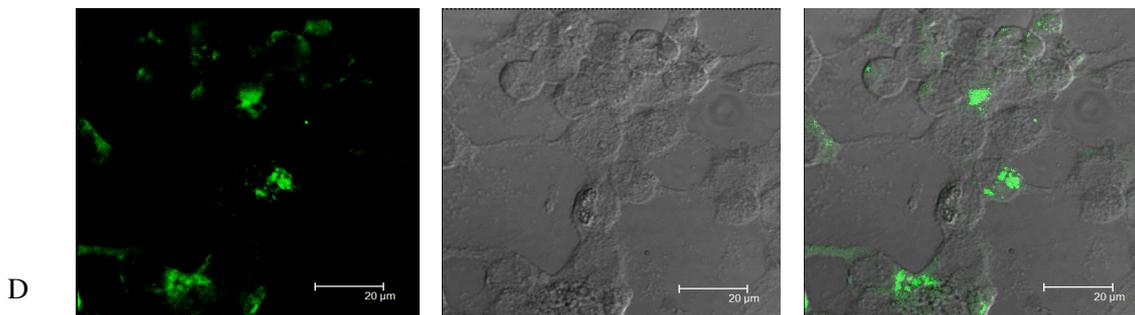


Figura 3. Localização das proteínas geradas pelas construções p43-DENV3-prM/E, p43-DENV3-prM/E-LAMP; p43-DENV3-prM/E-opt e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP em células HEK-293 transfectadas através da microscopia confocal. A distribuição das proteínas expressas nas células transfectadas ocorreram como esperado, os plasmídeos p43-DENV3-prM/E (A) e p43-DENV3-prM/E-opt (B) expressando as proteínas prM/E selvagem e prM/E otimizada, apresentaram-se distribuídas em compartimentos reticulares, enquanto que em células transfectadas com os plasmídeos p43-DENV3-prM/E-LAMP (C) e p43-DENV3-prM/E-opt-LAMP (D) as proteínas prM/E selvagem e prM/E otimizada, fusionadas a LAMP, apresentaram-se distribuídas em compartimentos lisossomais. As células foram marcadas com anticorpos policlonal anti-flavivírus, essas imagens foram sobrepostas contra a transducência celular.

DISCUSSÃO

A dengue continua sendo um sério problema em saúde pública, e tem se tornado impossível de erradicar e de difícil controle. Até os dias atuais, o controle do dengue é feito, em todo o mundo, seguindo as normas gerais de combate aos mosquitos vetores preconizadas pelos médicos sanitaristas do começo do século (FIGUEIREDO, 1999). O controle e a erradicação do mosquito *Aedes aegypti*, vetor do dengue, é um procedimento bastante difícil, que necessita de grandes investimentos com funcionários, máquinas, inseticidas e campanhas educacionais permanentes, que mobilizem toda a comunidade (GUBLER; CLARK, 1994). A alternativa ideal para o controle do dengue seria através do uso de vacinas. Porém para a obtenção de uma vacina contra dengue é necessário se identificar antígenos que produzam uma imunidade protetora contra os quatro sorotipos do vírus para toda a vida. Apesar de ainda não haver uma vacina disponível que possa prevenir a infecção com o vírus dengue, já existem vários estudos em desenvolvimento, utilizando tanto a tecnologia convencional compostas de vacinas como vírus atenuados, assim como novas tecnologias de manipulação genética (JACOBS; YOUNG, 2003; KONISHI et al., 2006). No presente estudo foram clonados em vetores plasmidiais os genes das proteínas estruturais prM e E do vírus da dengue sorotipo 3, a escolha desses genes virais se deve ao fato da importância dos genes estruturais ao reconhecimento viral pelo sistema imunológico do hospedeiro durante a infecção, e devido a predominância deste sorotipo no Brasil atualmente. A presença da

proteína prM é necessária para o correto dobramento da proteína E, e a proteína estrutural E é conhecida por conter importantes determinantes antigênicos virais (CHANG, 1997; LORENZ et al., 2002). Devido a características imunogênicas destas proteínas estruturais do vírus da dengue, diversos grupos de pesquisa têm estudado estas proteínas como um possível antígeno para o desenvolvimento de vacinas genéticas eficazes contra dengue (FONSECA et al., 1994).

É de conhecimento que o principal inconveniente das vacinas de DNA é que elas induzem uma resposta humoral inadequada (AKBARI et al., 1999), e uma das prováveis causas para isto seria a forma de apresentação do antígeno, o qual é predominantemente através da via do MHC-I. Para contornar este problema e realçar a apresentação de antígenos contidos em vacinas de DNA pela via do MHC II, nós realizamos em nossas construções o fusionamento da região do antígeno (proteínas prM/E do DENV3) a porção c-terminal da proteína LAMP, esta proteína como já citado tem a capacidade de direcionar as moléculas antigênicas para a via endossomo/lisossomo, resultando assim em uma melhor apresentação antigênica via MHC II, e conseqüentemente uma melhor resposta humoral e celular (DRAKE et al., 1999; GEUZE, 1998; KLEIJMEER et al., 1997; PETERS et al., 1991; TURLEY et al., 2000). Diversas vacinas de DNA quiméricas contendo o antígeno fusionado ao LAMP já foram desenvolvidas para diversos vírus, incluindo os vírus da febre do Nilo (WNV), dengue sorotipo 2, síndrome respiratória aguda grave (SARS CoV), vírus do papiloma humano (HPV) e HIV-1, nos quais demonstram em estudo de tráfego celular a colocalização *in vitro* do antígeno com as proteínas do MHC II, LAMP-1, LAMP-2, e H-2M (ANWAR et al., 2005; ARRUDA et al., 2006; CHIKHLIKAR et al., 2004; DE ARRUDA et al., 2004; LU et al., 2003; MARQUES et al., 2003; WU et al., 1995). Wu e colaboradores demonstraram que a fusão da proteína E7 do tipo 16 do papiloma vírus humano (Human Papilloma Virus, HPV-16) a proteína LAMP pode direcionar o antígeno E7 para o compartimento lisossomal e facilitar a apresentação desta proteína ao MHC II (WU et al., 1995), e quando testado em forma de vacina de DNA, gerou um elevado número de células T CD4 específicas, bem como atividade citotóxica em camundongos (JI et al., 1999). Construções contendo a região que codifica os genes das proteínas prM/E do vírus da dengue sorotipo 2 fusionada a porção carboxi-terminal do LAMP, ou seja o mesmo tipo de estratégias que realizamos para o sorotipo 3 neste estudo, demonstraram em células NIH3T3 transfectadas uma colocalização dos antígenos prM/E-LAMP com a membrana lisossomal, e em camundongos imunizados foram detectados uma soroconversão 30 dias pós-imunização (RAVIPRAKASH et al., 2001). Em um outro estudo realizado pelo mesmo grupo também foram confirmados a colocalização das proteínas prM/E do DENV2 fusionada ao LAMP com moléculas do MHC II e como a

proteína LAMP celular (endógena), através de microscopia de imunofluorescência e de confocal. Além disso, os camundongos imunizados com esta construção também foram capazes de soroconverter, com intensa capacidade de neutralização viral (LU et al., 2003). Este mesmo tipo de resposta também foi observado em vacina quimérica do vírus da febre do Oeste do Nilo expressando as proteínas prM/E fusionadas ao LAMP (ANWAR et al., 2005). Em uma vacina de DNA contra o HIV foram demonstrados que o domínio luminal de LAMP é requerido para o direcionamento endossomo/lisossomo da proteína Gag do HIV. Neste estudo, camundongos vacinados com plasmídeos que expressavam a proteína Gag quimerizada com a proteína LAMP com o domínio luminal, apresentaram uma resposta imune humoral e celular mais robustas quando comparada a vacina sem o fusionamento com o LAMP (MARQUES et al., 2003).

Além da estratégia de fusionamento dos genes que codificam as proteínas prM/E do dengue sorotipo 3 ao LAMP, nos também realizamos a otimização genética destes genes com o intuito de melhorar a expressão das proteínas e gerar uma resposta imune ainda mais robusta. Trabalhos que utilizam a otimização de genes têm demonstrado uma melhor expressão dos genes submetidos à otimização (BURGESS-BROWN et al., 2008; CHUAN et al., 2008).

Todos os plasmídeos construídos, incluindo os com os gene sintetizados, foram confirmados por sequenciamento e digestão enzimática antes dos ensaios de expressão. Para a análise de expressão dos genes construídos foram realizadas transfecções em células HEK-293, as quais apresentaram uma eficiência transfecção de em torno de 80%, quando avaliada a expressão do gene repórter β -lactosidase pelo plasmídeo pCMV- β gal. A expressão dos genes prM/E (otimizado ou não) clonados foram detectados através de ensaios de imunofluorescência, utilizando-se um anticorpo policlonal feito em camundongos (fluido ascítico hiperimune para *flavivírus*). Porém, apesar de terem sido detectados por imunofluorescência, as proteínas prM/E do DENV3 clonadas não puderam ser detectadas por “Western blot”, talvez devido à baixa concentração das proteínas após a transfecção, inespecificidade dos anticorpos utilizados ou devido a algum problema conformacional das proteínas, pois, para esta técnica é preciso desnaturar as proteínas, tornando-as lineares, e alguns anticorpos só reconhecem as proteínas em sua conformação original. Devido a falta de um anticorpo que detectasse as proteínas prM/E em células transfectadas através da técnica de “Western blot”, não pudemos analisar a eficiência de expressão dos genes otimizados quantitativamente, visto que os ensaios de imunofluorescência são apenas qualitativos. Para

contornar este problema, estamos desenvolvendo anticorpos específicos para cada sorotipo do vírus da dengue, como também um anticorpo em combinação tetravalente, através da expressão da região que compõe o domínio III da proteína E destes vírus.

Nos estudos do tráfego celular em células transfectadas com os construídos nós observamos que as proteínas prM/E contendo a sequência sinal de translocação para o lúmen do retículo endoplasmático (porção c-terminal do capsídeo), pode ser encontrado em compartimentos secretórios do retículo, complexo de Golgi e possivelmente na membrana plasmática, observando uma localização perinuclear compatível com a localização reticular. Contrastando com isto, quando as proteínas prM/E está fusionada ao LAMP, observou-se uma distribuição vesicular (em lisossomos) nas células transfectadas, confirmando deste modo o fusionamento dos genes prM/E ao LAMP, visto que a localização da proteína LAMP mostra-se constantemente relacionada a membrana lisossomal (CHEN et al., 1985; CHEN et al., 1985; CHEN et al., 1986). Para confirmação da verdadeira localização das quimeras antígeno/LAMP nos compartimentos lisossomais, seria preciso uma marcação para o LAMP endógeno, o qual não foi possível devido a reação cruzada existente entre o anticorpo primário anti-LAMP utilizado (produzido em rato), e o anticorpo secundário anti-camundongo destinado a marcação secundária contra o anticorpo policlonal anti-flavívirus produzido em camundongos, o qual era necessário para a detecção da expressão das proteínas prM/E do DENV3.

Ensaio para a avaliação da imunogenicidade dos plasmídeos construídos em camundongos Balb/C (SPF, Specific Pathogen Free) estão programados ainda para este ano. As respostas vacinais destes ensaios serão analisadas quanto aos títulos de anticorpos neutralizantes produzidos para cada plasmídeo e quanto a sua capacidade de proteção contra o vírus da dengue sorotipo 3.

Esperamos que a otimização gênica aliado ao direcionamento antigênico via MHC II produza uma resposta imunológica humoral e celular mais robusta nos animais vacinados e que sirva de base futuramente para construção de uma vacina de DNA tetravalente contra o vírus da dengue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBARI, O. et al. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.189, n.1, p.169-178, 1999.

ANWAR, A. et al. West Nile premembrane-envelope genetic vaccine encoded as a chimera containing the transmembrane and cytoplasmic domains of a lysosome-associated membrane protein: increased cellular concentration of the transgene product, targeting to the MHC II compartment, and enhanced neutralizing antibody response. **Virology**, New York, v.332, n.1, p.66-77, 2005.

ARRUDA, L. B. et al. Dendritic cell-lysosomal-associated membrane protein (LAMP) and LAMP-1-HIV-1 gag chimeras have distinct cellular trafficking pathways and prime T and B cell responses to a diverse repertoire of epitopes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.177, n.4, p.2265-2275, 2006.

BHAMARAPRAVATI, N.; YOKSAN, S. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. In: GLUBER, D. J. e KUNO, G. (Ed.). **Dengue and dengue hemorrhagic fever**, ed. New York: Cab International, 1997. p.367-376.

BURGESS-BROWN, N. A. et al. Codon optimization can improve expression of human genes in Escherichia coli: A multi-gene study. **Protein Expression and Purification**. San Diego, v.59, n.1, p.94-102. 2008.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2001. p.1043-1125.

CHEN, J. W. et al. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.101, n.1, p.85-95, 1985a.

CHEN, J. W. et al. Lysosome-associated membrane proteins: characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.239, n.2, p.574-586, 1985b.

CHEN, J. W. et al. Lysosomal membrane glycoproteins: properties of LAMP-1 and LAMP-2. **Biochemical Society Symposia**, New York, v.51, n., p.97-112, 1986.

CHIKHLIKAR, P. et al. Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8(+) responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera. **Virology**, New York, v.323, n.2, p.220-232, 2004.

CHIKHLIKAR, P. et al. DNA encoding an HIV-1 Gag/human lysosome-associated membrane protein-1 chimera elicits a broad cellular and humoral immune response in Rhesus macaques. **PLoS ONE**, San Francisco, v.1, p.e135, 2006.

CHUAN, Y. P.; LUA, L. H.; MIDDELBERG A. P. High-level expression of soluble viral structural protein in Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.134, n.1-2, p.64-71, 2008.

DE ARRUDA, L. B. et al. DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. **Immunology**, Oxford, v.112, n.1, p.126-133, 2004.

DRAKE, J. R. et al. Involvement of MIIC-like late endosomes in B cell receptor-mediated antigen processing in murine B cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.162, n.2, p.1150-1155, 1999.

FIGUEIREDO, L. T. Vacinas contra o dengue. **Medicina** (Ribeirão Preto), Ribeirão Preto, p.21-25, 1999.

FONSECA, B. A. et al. Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, Guildford, v.12, n.3, p.279-285, 1994.

GEUZE, H. J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. **Immunology Today**, Cambridge, v.19, n.6, p.282-287, 1998.

GUARNIERI, F. G. et al. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.268, n.3, p.1941-1946, 1993.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.50, n.6 suppl., p.50-60, 1994.

JACOBS, M.; YOUNG, P. Dengue vaccines: preparing to roll back dengue. **Current Opinion Investigation of Drugs**, London, v.4, n.2, p.168-171, 2003.

Ji, H. et al. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. **Human Gene Therapy**, New York, v.10, n.17, p.2727-2740, 1999.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 71, n. 2, Feb, p. 1497-1505, 1997.

KLEIJMEER, M. J. et al. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.139, n.3, p.639-649, 1997.

KONISHI, E.; KOSUGI, S.; IMOTO, J. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. **Vaccine**, Guildford, v.24, n.12, p.2200-2207, 2006.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, v.1, 2001. p.991-1041.

LU, Y. et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, Guildford, v.21, n.17-18, p.2178-2189, 2003.

MARQUES, E. T. et al. HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, n.39, p.37926-37936, 2003.

MORENO, J. et al. Processing of an endogenous protein can generate MHC class II-restricted T cell determinants distinct from those derived from exogenous antigen. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.147, n.10, p.3306-3313, 1991.

PETERS, P. J. et al. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. **Nature**, London, v.349, n.6311, p.669-676, 1991.

RAVIPRAKASH, K. et al. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. **Virology**, New York, v.290, n.1, p.74-82, 2001.

TURLEY, S. J. et al. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. **Science**, Washington, v.288, n.5465, p.522-527, 2000.

WU, T. C. et al. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.92, n.25, p.11671-11675, 1995.

ANEXO I

Optimization report



Sequence comparison Created with Lato 1.0

1 General Information:

Gene: PRME_compare1_28-03
Optimization requested by:
Date: Mar 28, 2008
Operator: Rangel
Target organism: Homo sapiens 50%
Optimization iteration: 1
Length: 1953 bp

1.1 Sequence

Below the original sequence and optimized sequence are listed, labelled with 'Org:' and 'Opt:' respectively. Where both are identical, the original sequence contains dots instead of nucleotides ('.'). Where the original sequence was locked against editing, it contains underscores ('_'). The names of the restriction enzymes start at the first nucleotide after the restriction cut in the forward strand.

```

      5    10    15    20    25    30    35    40    45    50
ORF:           M V S I I N K R K K T E
Org: ..... .. ... .. AGC ..A ... .. ..A C.. ..A ..G ..A TCG
Opt: GTCGA CGCTA GCACC ATG GTG TCA ATC ATC AAC AAG AGG AAG AAA ACC ACC
      Sall  NheI

      55    60    65    70    75    80    85    90    95
ORF: L C L M M I L P A A L A F H L T
Org: ..C ... ..C ... .. ..A T.G ... ..A ..A ..T ..T ..C ... T.. ...
Opt: CTG TGT CTG ATG ATG ATC CTC CCA GCG GCC CTG GCC TTT CAC CTG ACT

     100   105   110   115   120   125   130   135   140   145
ORF: S R D G E P R M I V G K N E R G
Org: ..A C.A ..T ..A ..G ..G C.C ... .. ..G ... ..T ... ..A ..A
Opt: TCC AGC GAC GGT GAA CCT AGG ATG ATT GTG GCA AAG AAC GAA AGG GGT
```

```

      150   155   160   165   170   175   180   185   190   195
ORF: K S L L F K T A S G I N M C T L
Org: ..A ..C ..A ..T ... ..A ..C TCT ..A ... ..C ..A ..C
Opt: AAG TCA CTG CTG TTT AAG ACT GCA ACC GGT ATC AAC ATG TGT ACC CTG

```

```

      200   205   210   215   220   225   230   235   240
ORF: I A M D L G E M C D D T V T Y K
Org: ..A ..C ... ..T... ..G ... ..T ... ..G ..C ..T ... ..A
Opt: ATC GCA ATG GAC CTG GGA GAA ATG TGT GAC GAC ACC GTG ACC TAC AAG

```

```

      245   250   255   260   265   270   275   280   285   290
ORF: C P H I T E V E P E D I D C W C
Org: ... ..T ..C ..A ... ..A ..T ..A ... ..C ... ..C
Opt: TCC CCC CAC ATA ACA GAG GTG GAG CCG GAG GAC ATT GAC TCC TCG TGT

```

```

      295   300   305   310   315   320   325   330   335
ORF: N L T S T N V T Y G T C N Q A G
Org: ... ..T ..A TCA ..A ... ..T ... ..G ..C ... ..A
Opt: AAC CTC ACT ACC ACC TCG GTG ACC TAC GGA ACC TGT AAT CAA GCC GCG

```

```

      340   345   350   355   360   365   370   375   380   385
ORF: E R R R D K R S V A L A P H V G
Org: ... C.T ..A ..C ..C ... ..A ..A ... ..G T.A ... ..T ..C ...
Opt: GAG ACC ACC CGA GAT AAG ACC TCC GTG GCC CTG GCT CCC CAC GTG GCC

```

```

      390   395   400   405   410   415   420   425   430   435
ORF: M G L D T R T Q T W M S A E G A
Org: ... ..A ..A ... ..A ... ..A ... ..C ... TCG ..T ..A ... ..T
Opt: ATG GGC CTG GAC ACC CGC ACC CAG ACC TCG ATG AGT GCC GAG GGA GCG

```

```

      440   445   450   455   460   465   470   475   480
ORF: N R Q V E K V E T W A L R H P G
Org: ... ..C ... ..G ..A ..G ..A ... ..C ..T ..G ... ..A ...
Opt: TCG ACC CAA GTG GAG AAA GTG GAA ACC TCG GCA CTG ACA CAC CCC GCG

```

```

      485   490   495   500   505   510   515   520   525   530
ORF: F T I L A L F L A H Y I G T S L
Org: ..C ... ..A ..C ..A ..T ... ..C ..T ... ..A ..C ..A TC. ...
Opt: TTT ACC ATA CTG GCA CTG TTC CTT GCA CAC TAC ATT GGA ACC ACC TTG

```

```

      535   540   545   550   555   560   565   570   575
ORF: T Q K V V I F I L L M L V T P S
Org: ... ..G ... ..T ..T ..A ..A ..A ... ..G ..C ... ..A TC.
Opt: ACC CAG AAA GTG GTT ATC TTC ATC CTG CTG ATG CTT GTG ACC CCC ACC

```

```
580 585 590 595 600 605 610 615 620 625
ORF: M T M R C V G V G N R D F V E G
Org: ... ..A ..T ... ..A ..A ... ..A ... ..T ... ..T
Opt: ATG ACA ATG AGG TGC GTG GCA GTG GGC AAC AGG GAT TTC GTG GAA GGG

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675
ORF: L S G A T N V D V V L E H G G C
Org: ..A TCA ..A ..T ..G ... ..T ... ..C.C ... ..C ... ..G ..T
Opt: CTG AGC GGC GCC ACC TGG GTG GAC GTG GTG TTG GAG CAT GGA GGC TGC

680 685 690 695 700 705 710 715 720
ORF: V T T M A K N K P T L D I E L Q
Org: ... ..T ... ..T ... ..G ..A ..G T.. ..T ... ..G ..T ...
Opt: GTG ACC ACC ATG GCG AAG AAC AAA CCG ACC CTG GAC ATA GAA CTG CAG

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770
ORF: K T E A T Q L A T L R K L C I E
Org: ... ..C ..C ..A T.. ..G ..C ..A ... ..G ..A ... ..T ...
Opt: AAG ACC GAG GCA ACT CAG CTG GCC ACA CTC AGG AAA CTG TGC ATC GAG

775 780 785 790 795 800 805 810 815
ORF: G K I T N I T T D S R C P T Q G
Org: ..G ..A ..T ..C ... ..A ..A ..T ..C TCA ... ..C ... ..G ..T ...
Opt: GGC AAG ATC ACT AAC ATC ACC ACA GAT AGC AGA TGT CCT ACA CAA GGC

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865
ORF: E A V L P E E Q D Q N Y V C K H
Org: ... ..G ..T T.G ..T ... ..C ... ..C ... ..G ..T ...
Opt: GAA GCC GTC CTT CCC GAG GAG CAG GAT CAG AAC TAT GTG TGT AAA CAC

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915
ORF: T Y V D R G N G N G C G L F G K
Org: ..A ..C ..A ..C ..A ..C ... ..G ... ..T.. ... ..G ..T ...
Opt: ACC TAT GTG GAT AGG GGT TGG GGA AAC GGA TGT GGT CTG TTT GGC AAA

920 925 930 935 940 945 950 955 960
ORF: G S L V T C A K F Q C L E P I E
Org: ..A ... T.. ..A ..A ..T ..G ..A ... ..A ... ..G ... ..A ..G
Opt: GGC AGC CTG GTG ACC TGC GCC AAG TTT CAG TGC CTC GAA CCA ATC GAA

965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010
ORF: G K V V Q Y E N L K Y T V I I T
Org: ..A ..A ... ..G ..T ..G ... ..C ..A ... ..C ..C ... ..A ..G
Opt: GGT AAG GTG GTG CAA TAC GAA AAC CTG AAG TAC ACA GTG ATC ATC ACC
```

1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055
 ORF: V H T G D Q H Q V G M E T Q G V
 Org:A ..A ..T ..AG ..A ..T ..A ..G ..G ..A ..C
 Opt: GTG CAC ACC GGT GAC CAG CAC CAG GTC GGC AAC GAG ACC CAA GGC GTG

1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105
 ORF: T A E I T P Q A S T T E A I L P
 Org: ..G ..TA ..AA TCAT T.. ..T
 Opt: ACC GCC GAG ATT ACC CCT CAG GCC AGC ACC ACC GAA GCC ATC CTG CCC

1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155
 ORF: E Y G T L G L E C S P R T G L D
 Org: ..A ..TT ..G C.A ..A ... TCA ... C.. ..A ..T T.G ..T
 Opt: GAG TAC GCA ACC CTG GCA TTG GAG TGC ACC CCA AGC ACC GGC CTC GAC

1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200
 ORF: F N E M I L L T M K N K A W M V
 Org:T ..AC ... C.A ..AGA ..AA
 Opt: TTC AAC GAG ATG ATA TTG TTG ACC ATG AAA AAC AAG GCG TCG ATG GTG

1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250
 ORF: H R Q N F F D L P L P N T S G A
 Org: ..T A.. ..ATA ..T ..A ..A TCA ..A ..T
 Opt: CAC CGA CAG TCG TTC TTT GAC CTC CCA CTC CCC TCG ACA AGC GGC GCC

1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295
 ORF: T T E T P T N M R K E L L V T F
 Org: ..AA ..A ..AC A.. ..GT ..TA ..T
 Opt: ACC ACC GAG ACC CCT ACC TCG AAT CGG AAA GAG CTG CTG GTG ACC TTC

1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345
 ORF: K N A H A K K Q E V V V L G S Q
 Org: ..A ..C ..A ..T ..GAA ..T ..C ..T ..A TCG ..A
 Opt: AAG AAT GCT CAC GCA AAG AAA CAG GAA GTC GTG GTG CTG GGC ACC CAG

1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395
 ORF: E G A M H T A L T G A T E I Q M
 Org:AT ..C ..A T.. ..A ..A ..CA ..C ..A ...
 Opt: GAG GCA GCT ATG CAC ACT GCC CTG ACC GGC GCT ACA GAG ATA CAG AAC

1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440
 ORF: S G G T S I F A G H L K C R L K
 Org:AA ..T ..TG T.. ..A ..T A.A ..T ...
 Opt: TCA GGT GGC ACC AGC ATC TTT GCA GCG CAC CTG AAG TCG CGT CTG AAG

```

1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490
ORF: M D K L E L K G M S Y A M C T N
Org: ... .. T.. ..A ..C ..G ..G ... ..C ... ..A ... ..G ..T
Opt: ATG GAC AAA CTG GAG CTG AAA GGC ATG AGT TAT GCT ATG TGC ACT AAC

```

```

1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535
ORF: T F V L K K E V S E T Q H G T I
Org: ... ..T ... T.. ... ..A ..A ..C TCA ... ..G ... ..G ... ..A
Opt: ACC TTC GTG CTG AAG AAG GAG GTG AGC GAA ACC CAG CAT GGC ACA ATC

```

```

1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585
ORF: L I K V E Y K G E D A D C K I P
Org: ..C ..T ... ..G ... ..G ... ..T ..A ..T ..C ... ..T ..T
Opt: CTG ATC AAG GTC GAA TAC AAA GGC GAA GAC GGC CCC TGT AAG ATA CCG

```

```

1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635
ORF: F S T E D G Q G K A H N G R L I
Org: ... ..C ..A ... ..T ... ..G ... ..G ... ..G ... ..G ... ..T
Opt: TTC TCT ACC GAG GAC GCA CAA GGC AAA GCT CAC AAT GGC ACA CTG ATC

```

```

1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680
ORF: T A N P V V T K K E E P V N I E
Org: ..A ..C ... ..G ... ..G ..G ... ..C ..T ... ..G
Opt: ACC GCT AAC CCA GTG GTG AGC AAG AAG GAA GAA CCT GTG AAC ATT GAA

```

```

1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730
ORF: A E P P F G E S N I V I G I G D
Org: ..T ..A ..T ... ..G ..A ..T ..T ..A ... ..T ... ..A ...
Opt: GGC GAG CCA CCT TTT GGC GAG AGC AAC ATC GTG ATC GCA ATT GGC GAC

```

```

1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775
ORF: K A L K I N N Y R K G S S I G K
Org: ... ..C ..G ..A ... ..C ... ..C ... ..A AG. ..T ..T ..G ...
Opt: AAA GCG CTT AAG ATC AAT TGG TAT AGG AAG GGC TCC TCA ATC GGC AAG

```

```

1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825
ORF: M F E A T A R G A R R M A I L G
Org: ... ..C ... ..C ..T ..C ..A ..T ... ..C.C ... ..C ..C T.G ..A
Opt: ATG TTT GAG GCT ACC GCA AGG GCA GCA AGG AGG ATG GCT ATA CTC GGC

```

```

1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875
ORF: D T A N D F G S V G G V L N S L
Org: ..C ..A ... ..C ... ..A TCA ..G ..T ..T ... ..TCA T.A
Opt: GAT ACC GCT TGG GAT TTT GGT AGT GTT GCA GCA GTT CTG AAC AGC CTT

```

```

      1880  1885  1890  1895  1900  1905  1910  1915  1920
ORF:  G  K  M  V  H  Q  I  F  G  S  A  Y  T  A  L  F
Org:  ... ..A ... ..G ... ..A ... ..A ... ..T ..C ... ..C ..A ...
Opt:  GGC AAG ATG GTT CAC CAG ATA TTC GGC AGT GGC TAT ACA GCT CTG TTC

```

```

      1925  1930  1935  1940  1945  1950
ORF:  S  G  V  S  E  F  !
Org:  ..T ... ..C TCT ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ...
Opt:  AGC GGA GTG AGC GAA TTC TGA TAGG TACC
                        EcoRI      KpnI

```

1.1.1 Restriction table

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
EcoRI	g'aatt_c	1	1935
KpnI	g_gtac'c	1	1947
NheI	g'ctag_c	1	6
SalI	g'tcga_c	1	0

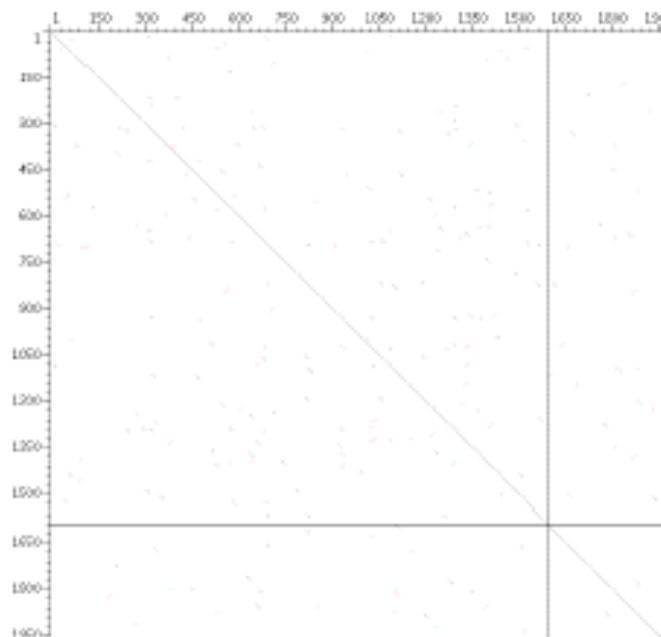
1.1.2 Enzymes that cut five or fewer times

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
EcoRI	g'aatt_c	1	1935
KpnI	g_gtac'c	1	1947
NheI	g'ctag_c	1	6
SalI	g'tcga_c	1	0

1.1.3 Enzymes that do not cut

XhoI

1.2 Dotplot



1.3 ORFs

The gene was optimized using the following ORF(s). Please note that sequence positions are given relative to the continuous DNA sequence defined by all ORFs:

ORF: 16-1944

2 Optimized parameters

2.1 Codon tandem repeats

Number of codon tandem repeats:

Original sequence: 14

Optimized sequence: 21

Position	Number of repeats
[9]	2
[45]	2
[138]	2
[207]	2
[327]	2
[540]	2
[836]	2
[1663]	2

[819]	2
[954]	2
[987]	2
[1071]	2
[1165]	2
[1289]	2
[1314]	2
[1488]	2
[1632]	2
[1641]	2
[1647]	2
[1791]	2
[1839]	2

2.2 Codon Usage

This is a comparison of the codon frequency of the original sequence vs. the optimized sequence. As a reference, the codon usage of the target organism is included. The charts indicate the sum of the deviation from the target codon usage, for the original and the optimized sequence. Lower bars indicate a better match with the target codon usage.

2.2.1 A - Alanine:

Codon	Original	Target	Optimized
GCU	27.9 %	26.0 %	25.6 %
GCC	34.9 %	40.0 %	39.5 %
GCA	23.3 %	22.0 %	23.3 %
GCG	14.0 %	12.0 %	11.8 %

2.2.2 C - Cysteine:

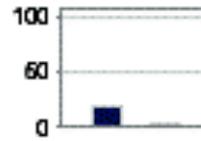
Codon	Original	Target	Optimized
UGU	47.4 %	45.0 %	47.4 %
UGC	62.8 %	66.0 %	62.8 %

2.2.3 D - Aspartic acid:

Codon	Original	Target	Optimized
GAU	34.8 %	48.0 %	30.4 %
GAC	66.2 %	64.0 %	69.6 %

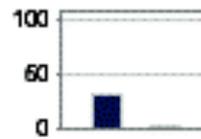
2.2.4 E - Glutamic acid:

Codon	Original	Target	Optimized
GAA	61.1 %	41.0 %	42.2 %
GAG	48.9 %	59.0 %	67.8 %



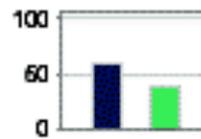
2.2.5 F - Phenylalanine:

Codon	Original	Target	Optimized
UUU	61.9 %	48.0 %	47.8 %
UUC	38.1 %	54.0 %	62.4 %



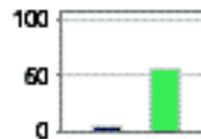
2.2.6 G - Glycine:

Codon	Original	Target	Optimized
GGU	10.2 %	18.0 %	16.3 %
GGC	11.8 %	33.0 %	45.8 %
GGA	64.2 %	24.0 %	30.6 %
GGG	23.7 %	27.0 %	8.5 %



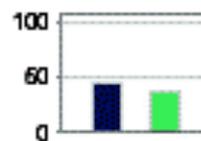
2.2.7 H - Histidine:

Codon	Original	Target	Optimized
CAU	43.8 %	41.0 %	12.6 %
CAC	66.2 %	59.0 %	87.5 %



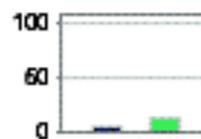
2.2.8 I - Isoleucine:

Codon	Original	Target	Optimized
AUU	38.9 %	36.0 %	18.7 %
AUC	26.0 %	47.0 %	61.1 %
AUA	36.1 %	18.0 %	22.2 %



2.2.9 K - Lysine:

Codon	Original	Target	Optimized
AAA	44.2 %	42.0 %	34.9 %
AAG	66.8 %	58.0 %	65.1 %



2.2.10 L - Leucine:

Codon	Original	Target	Optimized
UUA	3.8 %	0.0 %	0.0 %
UUG	30.4 %	12.0 %	8.9 %
CUU	19.8 %	13.0 %	8.9 %
CUC	12.6 %	19.0 %	14.3 %
CUA	26.0 %	0.0 %	0.0 %
CUG	8.9 %	56.0 %	67.9 %

2.2.11 M - Methionine:

Codon	Original	Target	Optimized
AUG	100.0 %	100.0 %	100.0 %

2.2.12 N - Asparagine:

Codon	Original	Target	Optimized
AAU	33.3 %	48.0 %	20.8 %
AAC	66.7 %	54.0 %	79.2 %

2.2.13 P - Proline:

Codon	Original	Target	Optimized
CCU	47.8 %	28.0 %	28.1 %
CCC	8.7 %	32.0 %	34.8 %
CCA	39.1 %	27.0 %	28.1 %
CCG	4.3 %	13.0 %	13.0 %

2.2.14 Q - Glutamine:

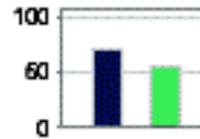
Codon	Original	Target	Optimized
CAA	69.1 %	26.0 %	27.3 %
CAG	40.9 %	74.0 %	72.7 %

2.2.15 R - Arginine:

Codon	Original	Target	Optimized
CGU	4.0 %	8.0 %	4.0 %
CGC	16.0 %	18.0 %	4.0 %
CGA	4.0 %	10.0 %	8.0 %
CGG	8.0 %	20.0 %	4.0 %
AGA	44.0 %	20.0 %	12.0 %
AGG	24.0 %	24.0 %	68.0 %

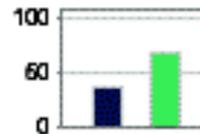
2.2.16 S - Serine:

Codon	Original	Target	Optimized
UCU	10.0 %	18.0 %	3.3 %
UCC	13.3 %	21.0 %	10.0 %
UCA	40.0 %	15.0 %	13.3 %
UCG	10.0 %	0.0 %	0.0 %
AGU	13.3 %	14.0 %	13.3 %
AGC	13.3 %	32.0 %	60.0 %



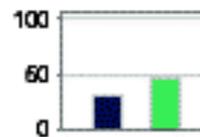
2.2.17 T - Threonine:

Codon	Original	Target	Optimized
ACU	12.5 %	24.0 %	10.9 %
ACC	28.1 %	35.0 %	68.8 %
ACA	45.3 %	29.0 %	15.8 %
ACG	14.1 %	13.0 %	4.7 %



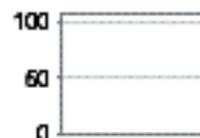
2.2.18 V - Valine:

Codon	Original	Target	Optimized
GUU	11.1 %	18.0 %	8.9 %
GUC	24.4 %	23.0 %	8.9 %
GUA	13.3 %	0.0 %	0.0 %
GUG	61.1 %	59.0 %	82.2 %



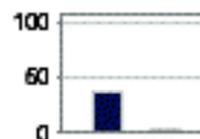
2.2.19 W - Tryptophan:

Codon	Original	Target	Optimized
UGG	100.0 %	100.0 %	100.0 %



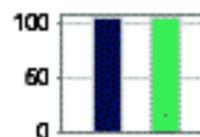
2.2.20 Y - Tyrosine:

Codon	Original	Target	Optimized
UAU	25.0 %	44.0 %	41.7 %
UAC	75.0 %	56.0 %	58.3 %



2.2.21 ! - Stop:

Codon	Original	Target	Optimized
UAA	0.0 %	28.0 %	0.0 %
UAG	100.0 %	48.0 %	100.0 %
UAG	0.0 %	24.0 %	0.0 %

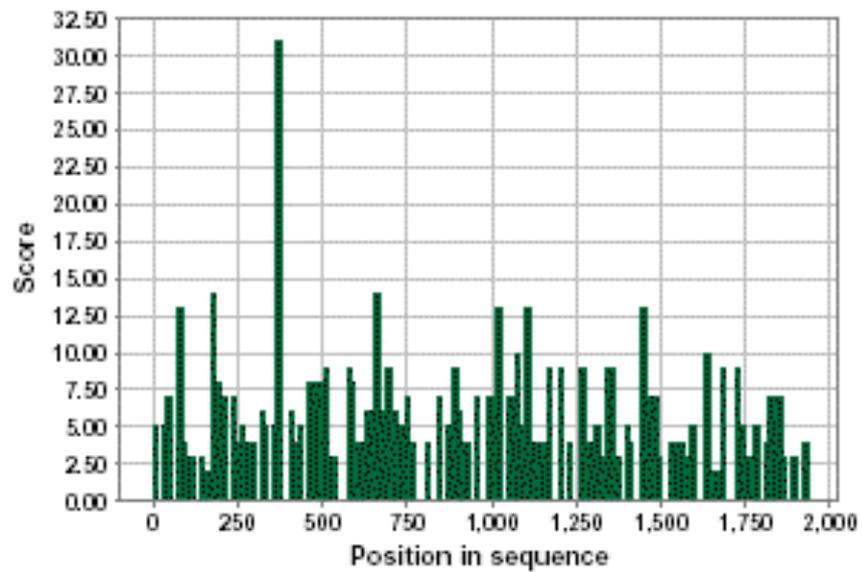


2.3 Secondary structure

In general, an extended secondary structure of the mRNA can interfere with the translation process. Therefore, the gene optimization tries to reduce the number and length of potential hairpin loops.

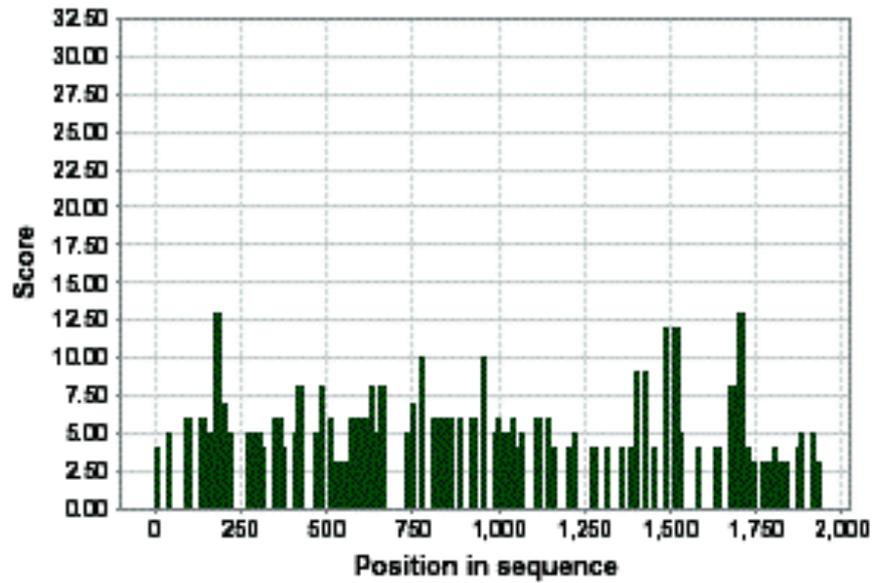
2.3.1 Original sequence

Number of helices	62
Average helix length	6.31
Maximum helix length	16
Average helix score	6.38



2.3.2 Optimized sequence

Number of helices	38
Average helix length	5.74
Maximum helix length	8
Average helix score	5.74



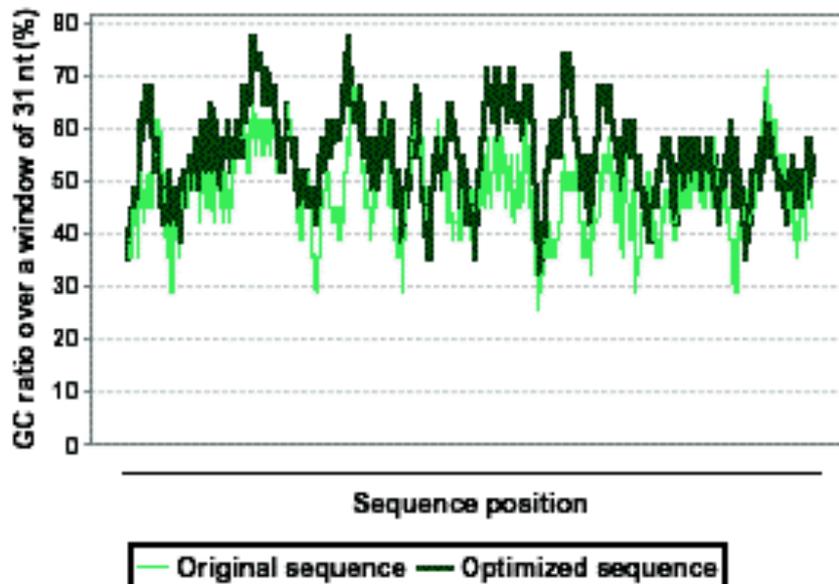
2.4 GC distribution

GC ratio over a window of 31 nt:

Original sequence: 47.85% (25.81% - 70.97%)

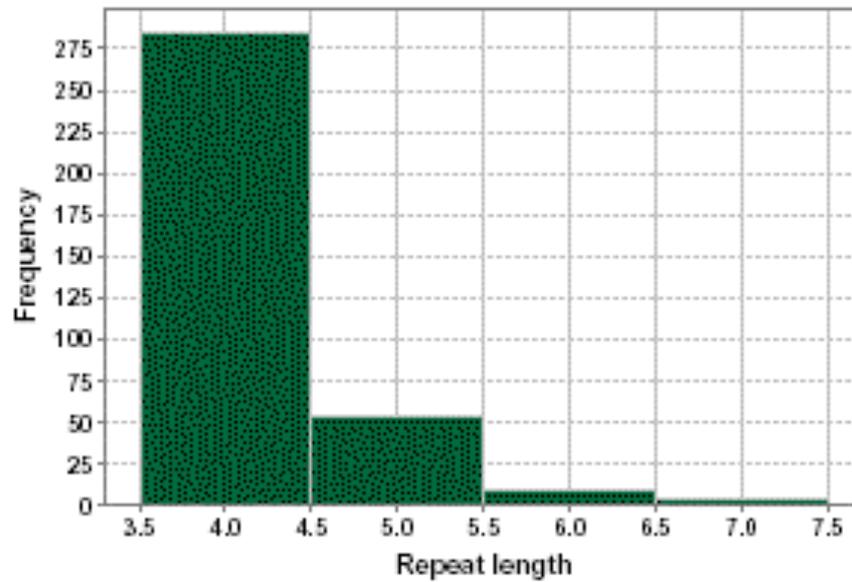
Optimized sequence: 54.85% (32.26% - 77.42%)

The number indicate the average GC content. The values in brackets indicate the interval containing 95% of all nucleotides if the GC content is averaged over a window of 11 nucleotides.



2.5 Long range repeats

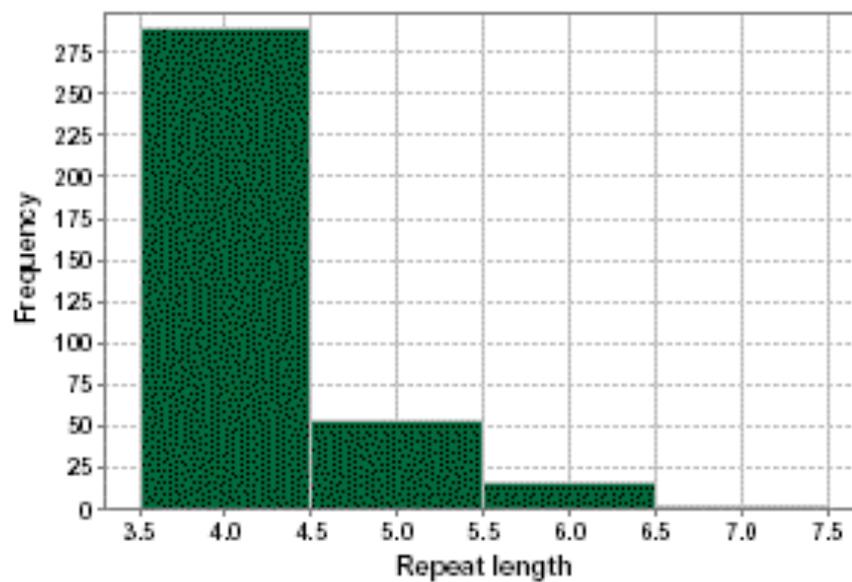
2.5.1 Original sequence



Number of repeats: 353

Longest repetitive sequence: 7 bases

2.5.2 Optimized sequence



Number of repeats: 362

Longest repetitive sequence: 7 bases

2.6 Secondary ORFs

During the optimization, secondary ORFs were removed. These are ORFs in the second or third frame or on the opposite strand. The removal was done by inserting stop codons by silent mutagenesis, or by changing start codons. The optimization tries to avoid secondary ORFs with more than 50 nucleotides.

2.6.1 Original sequence:

Number of secondary ORFs: 71
 Total length of sec. ORFs: 1442
 Number of ORFs with >50nt: 8

2.6.2 Optimized sequence:

Number of secondary ORFs: 31
 Total length of sec. ORFs: 881
 Number of ORFs with >50nt: 5

2.7 Restriction sites

The table lists the unwanted restriction sites contained in the sequence, as well as their positions.

Enzyme	Positions in original sequence	Positions in optimized sequence
EcoRI	1	1
KpnI	0	0
NheI	0	0
Sall	0	0
XhoI	1	0

2.8 Cryptic splice sites

The following table shows possible splice sites in the specified sequence. The score is relative to the range between the best-scoring and worst-scoring splice sites in the training set.

2.8.1 Splice sites in original sequence

Type	Position	Relevance
Acceptor	148	Possible
Acceptor	152	Possible
Acceptor	413	Possible
Acceptor	520	Likely
Acceptor	682	Possible
Acceptor	1018	Possible
Acceptor	1531	Possible
Acceptor	1590	Possible
Acceptor	1740	Likely

Acceptor	1887	Possible
Donor	353	Possible
Donor	438	Very likely
Donor	525	Possible
Donor	1690	Likely

2.8.2 Splice sites in optimized sequence

Type	Position	Relevance
Acceptor	197	Possible
Donor	438	Possible
Donor	525	Possible

2.9 AT/GC stretch restrictor

2.9.1 Original sequence

Number of stretches longer than 4 nt: 30

Average AT/GC stretch length: 5.97

2.9.2 Optimized sequence

Number of stretches longer than 4 nt: 23

Average AT/GC stretch length: 5.83

3 Optimized sequence

This is the optimized sequence, ready for copying and pasting into other applications.

```

GTGGA CGCTA GCACC ATGGT GTCAA TCATC AACAA GAGGA AGAAA ACCAG
CCGTG GTCTG ATGAT GATCC TCCCA GGGGC CCTGG CCTTT CACCT GACTT
CCAGG GACGG TGAAC CTGGG ATGAT TGTGG GAAAG AACGA AAGGG GTAAG
TCACT GCTGT TTAGG ACTGC AAGGG GTATC AACAT GTGTA CCTG ATCGC
AATGG ACCTG GGAGA AATGT GTGAC GACAC CGTGA CCTAC AAGTG CCCCC
ACATA ACAGA GGTGG AGCGG GAGGA CATTC ACTGC TGGTG TAACC TCACT
AGCAC CTGGG TGACC TACGG AACCT GTAAT CAGC CGGGG AGAGG AGGGG
AGATA AGAGG TCGT GGGCC TGGCT CCGCA CGTGG GCATG GGCTT GGACA
CCGGC ACCCA GACCT GCATG AGTGC CGAGG GAGGG TGGAG GCAAG TGGAG
AAGT GGAAA CCTGG GCACT GAGAC ACCCC GGGTT TACCA TACTG GCACT
GTTC TTGCA CACTA CATTC GAACC AGCTT GAGCC AGAAA GTGGT TATCT
TCATC CTGCT GATGC TTGTG ACCCC CAGCA TGACA ATGAG GTGGG TGGGA
GTGGG CAACA GGGAT TTGCT GGAAG GGCTG AGGGG CGCCA CCTGG GTGGA
CGTGG TGTTG GAGCA TGGAG GCTGC GTGAC CAGCA TGGGG AAGAA CAAAC
CGACC CTGGA CATAG AACTG CAGAA GACCG AGGCA ACTCA GCTGG CCACA
CTCAG GAAAC TGTGC ATGGA GGGCA AGATC ACTAA CATCA CCACA GATAG
CAGAT GTCTT ACACA AGGGG AAGCC GTCTT TCCCG AGGAG CAGGA TCAGA

```

ACTAT GTGTG TAAAC ACACC TATGT GGATA GGGGT TGGGG AAAGG GATGT
GGTCT GTTTG GCAAA GGCAG CCTGG TGACC TGCGC CAAGT TTCAG TGCCY
CGAAC CAATC GAAGG TAAGG TGGTG CAATA CGAAA ACCTG AAGTA CACAG
TGATC ATCAC CGTGC ACACC GGTGA CCAGC ACCAG GTGGG CAAGG AGACC
CAAGG CGTGA CCGCC GAGAT TACCC CTCAG GCCAG CACCA CCGAA GCCAT
CCTGC CCGAG TACGG AAACC TGGGA TTGGA GTGCA GCGCA AGGAC CGGCC
TGGAC TTCAA CGAGA TGATA TTGTT GACCA TGAAA AACAA GCGGT GGATG
GTGCA CCGAC AGTGG TTCTT TGACC TCCCA CTCGC CTGGA CAAGC GCGGC
CACCA CCGAG ACCCC TACCT GGAAT CCGAA AGAGC TGCTG GTGAC CTTCA
AGAAT GCTCA CGCAA AGAAA CAGGA AGTGG TGGTG CTGGG CAGCC AGGAG
GGAGC TATGC ACACT GCGCT GACCG GCGCT ACAGA GATAC AGAAC TCAGG
TGGCA CCAGC ATCTT TGCGG GGCAC CTGAA GTGCC GTCTG AAGAT GGACA
AACTG GAGCT GAAAG GCATG AGTTA TGCTA TGTGC ACTAA CACCT TGGTG
CTGAA GAAGG AGGTG AGCGA AACCC AGCAT GGCAC AATCC TGATC AAGGT
CGAAT ACAAA GCGGA AGAGG CCCCC TGTAA GATAC CGTTC TCTAC CGAGG
ACCGA CAAGG CAAGG CTCAC AATGG CAGAC TGATC ACCGC TAACC CAGTG
GTGAC GAAGA AGGAA GAACC TGTGA ACATT GAAGC CGAGC CACCT TTTGG
CGAGA GCAAC ATCGT GATGG GAATT GCGGA CAAGG CGCTT AAGAT CAATT
GGTAT AGGAA GGGCT CCTCA ATCGG CAAGA TGTIT GAGGC TACCG CAAGG
GGAGC AAGGA GGATG GCTAT ACTGG GGGAT ACCGC TTGGG ATTTT GGTAG
TGTG GAGGA GTTCT GAACA GCCTT GCGAA GATGG TTCAC CAGAT ATTGG
GCAGT GCCTA TACAG CTCGT TTCAG CCGAG TGAGC GAATT CTCAT AAGGT
ACC

