

CARINE RIBEIRO PESSOA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA
VACINA DE DNA TETRAVALENTE COMBINADA COM ADJUVANTES
GENÉTICOS CONTRA OS VÍRUS DENGUE

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P725d
2016 Pessoa, Carine Ribeiro, 1976-
Desenvolvimento e avaliação da imunogenicidade de uma
vacina de DNA tetravalente combinada com adjuvantes
genéticos contra os vírus dengue / Carine Ribeiro Pessoa. –
Viçosa, MG, 2016.

xi, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 49-54.

1. Imunologia. 2. Dengue. 3. Vacina . I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 614.47

CARINE RIBEIRO PESSOA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UMA
VACINA DE DNA TETRAVALENTE COMBINADA COM ADJUVANTES
GENÉTICOS CONTRA OS VÍRUS DENGUE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de junho de 2016.

Rafael Freitas de Oliveira França

Rodrigo Siqueira Batista

Michelle Dias de Oliveira Teixeira

Leandro Licursi de Oliveira

Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Dedico este trabalho ao meu marido, Kennedy Martins Pedroso
e à minha filha, Ana Glória Ribeiro Pessoa Martins

AGRADECIMENTOS

Um projeto tão longo como o doutorado implica numa longa lista de agradecimentos...

Ao meu orientador Sérgio Oliveira de Paula, por me receber em seu laboratório e pela oportunidade e confiança para desenvolver o projeto.

Ao professor Leandro Licursi, por toda sua disponibilidade em atender as mais diferentes demandas.

Ao Roberto Sousa Dias e Michelle Dias de Oliveira, obrigada por tudo!!! Esse tudo é tão grande que nem sei se dá para enumerar. Posso dizer, com segurança, que eu não teria chegado ao fim sem o precioso acompanhamento de vocês, todas as sugestões, incentivo, nossas trocas de ideias no momento ócio criativo.

À Juliana e Ana Flávia pela grande ajuda nos ensaios com células em cultura.

Ao Javier por ter me ensinado bastante sobre citometria, FlowJo e pela disponibilidade de ajudar nos experimentos.

Ao Luan, meu primeiro IC, por me ensinar a deixar os outros fazerem alguma coisa e pela parceria na realização do trabalho.

À Mariana Xisto, pelo apoio e alegria incomparável no dia-a-dia do laboratório, tornando tudo mais possível.

A todos os amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular que tornaram a minha caminhada menos estressante, em especial Aneli, André, Franciele, Helena, Ítalo, João Lúcio, Lívia, Mary, Vinícius Duarte.

Ao professor Jorge Dergam e seus alunos Marina, Fred e Silvana pelo apoio no ensaio de IF.

Ao apoio financeiro da CAPES

À minha filha Ana Glória, por ser a minha grande companheira de todas as horas. É por você, minha filha, que tento ser uma pessoa mais alegre a cada dia.

Ao Kennedy pelo apoio em todas as horas, por acreditar na minha capacidade intelectual, amizade incondicional e companheirismo.

Aos meus pais, Edilson e Francisca por serem meu suporte de toda a vida. Vocês sempre proporcionaram a minha educação formal e pessoal e espero ter retribuído o investimento.

Às minhas irmãs, Aline e Caroline pelo apoio e torcida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 OBJETIVO GERAL.....	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1 CÉLULAS E PLASMÍDEOS.....	15
4.2 ANIMAIS.....	15
4.3 ESTOQUES VIRAIS.....	15
4.4 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO VACINAL E DE ADJUVANTES GENÉTICOS.....	15
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES <i>IN VITRO</i>	18
4.5.1 Transfecção de células Vero.....	18
4.5.2 Imunofluorescência indireta.....	19
4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e western blotting.....	19
4.5.4 Análise da presença do mRNA das citocinas.....	20
4.6 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	20
4.6.1 Processamento do baço e ensaio de linfoproliferação.....	21
4.6.2 Imunofenotipagem.....	21
4.6.3 Dosagem de citocinas.....	22
4.6.4 Ensaio de neutralização em placa (PRNT – <i>Plaque reduction neutralization test</i>).....	22
4.6.5 Ensaio de neutralização <i>in vivo</i>	22
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
5 RESULTADOS.....	23
5.1 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO VACINAL.....	23

5.2 CONSTRUÇÃO DOS ADJUVANTES GENÉTICOS E ANÁLISE DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE.....	27
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES <i>IN VITRO</i>	28
5.4 ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE DO PLASMÍDEO VACINAL TETRAVALENTE EM ASSOCIAÇÃO COM ADJUVANTES GENÉTICOS.....	32
5.4.1 Linfoproliferação <i>in vitro</i>	32
5.4.2 Dosagem das citocinas.....	33
5.4.3 Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos.....	37
5.4.4 Ensaio de neutralização <i>in vitro</i> (PRNT).....	39
5.4.5 Ensaio de neutralização <i>in vivo</i>	40
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÕES.....	47
8 PERSPECTIVAS.....	48
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Co-circulação dos sorotipos dos vírus da dengue nas áreas de incidência da doença.....	1
Figura 2 Esquema da construção do plasmídeo vacinal.....	23
Figura 3 Análise do plasmídeo recombinante pVAX-EDIII1-4.....	24
Figura 4 Análise do plasmídeo recombinante pVAX-EDIII1-4.....	24
Figura 5 Alinhamento no programa Clustal O entre o contig obtido a partir do sequenciamento e a construção predita do EDIII1-4.....	27
Figura 6 Análise dos plasmídeos recombinantes pVAX-IL7, pVAX-IL15 e pVAX-GMCSF.....	28
Figura 7 Análise da expressão <i>in vitro</i> do plasmídeo pVAX-EDIII1-4 por western blotting.....	29
Figura 8 Análise da expressão <i>in vitro</i> do plasmídeo pVAX-EDIII1-4 por Imunofluorescência Indireta.....	30
Figura 9 Análise da presença do mRNA correspondente às citocinas GM-CSF, IL-5, IL-15 nas células transfectadas com os plasmídeos pVAX-GMCSF, pVAX-IL7 e pVAX-IL15.....	31
Figura 10 Linfoproliferação.....	33
Figura 11 Dosagem da produção de citocinas.....	36
Figura 12 Fluxograma de análise utilizado na determinação das subpopulações de linfócitos.....	37
Figura 13 Imunofenotipagem dos linfócitos T.....	38
Figura 14 Ensaio de neutralização <i>in vitro</i> (PRNT).....	39
Figura 15 Neutralização <i>in vivo</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição dos primers.....	17
Tabela 2 Tamanho (pb) dos produtos de PCR.....	17
Tabela 3 Definição dos grupos experimentais.....	32
Tabela 4 Condições experimentais da avaliação da imunogenicidade.....	32
Tabela 5 Produção de citocinas (pg/mL) nos grupos experimentais.....	35

RESUMO

PESSOA, Carine Ribeiro, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2016. **Desenvolvimento e avaliação da imunogenicidade de uma vacina de DNA tetravalente combinada com adjuvantes genéticos contra os vírus dengue.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadora: Silvia Almeida Cardoso.

A dengue é a mais importante arbovirose que afeta o homem e o aumento crescente de casos nas áreas endêmicas bem como a possível expansão da área de risco de infecção tem causado preocupação em todo o mundo. Atualmente, as medidas de controle da doença são baseadas no controle do vetor, mosquitos do gênero *Aedes* sendo que estas não se mostraram eficientes, uma vez que o número de infecções aumentaram cerca de 30 vezes nos últimos 50 anos. Os vírus dengue possuem quatro sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 e uma infecção com um sorotipo promove imunidade protetora contra infecções com o mesmo sorotipo. Numa segunda infecção com um sorotipo heterólogo, os anticorpos não-neutralizantes produzidos na primeira infecção podem aumentar o número de células infectadas e assim, exacerbar a resposta imune. Esse fenômeno, conhecido por ADE (*antibody dependent enhancement*) está relacionado com as formas graves da doença e por essa razão, uma vacina eficiente contra dengue deve ser tetravalente. Este trabalho tem o objetivo de construir uma vacina de DNA tetravalente contra a dengue e, adicionalmente desenvolver adjuvantes genéticos para aprimorar a imunogenicidade dessa vacina. Para isso, as sequências de DNA correspondentes ao domínio III da proteína E dos quatro sorotipos dos vírus da dengue foram clonadas num mesmo vetor de expressão. Para o desenvolvimento de adjuvantes genéticos, genes das citocinas GM-CSF, IL-7 e IL-15 foram clonados separadamente em plasmídeo de expressão de modo que diferentes associações dos adjuvantes genéticos pudessem ser avaliadas com o plasmídeo vacinal. A avaliação da imunogenicidade da vacina de DNA tetravalente e sua associação com os diferentes adjuvantes mostrou que houve uma resposta linfoproliferativa contra as proteínas prM e E recombinantes de DENV-3, sendo os esplenócitos oriundos dos grupos que receberam pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL15, pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GMCSF e pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7 apresentaram maior resposta quando re-estimulados *in vitro*. Também foi observado um aumento no número de células B nos grupos vacinados com pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GMCSF e pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15. Na subpopulação de células T CD4 houve incremento no grupo imunizado com

pVAX-EDIII1-4 e GMCSF e as células T CD8, no grupo imunizado com pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7. Observou-se um aumento na subpopulação de linfócitos T CD8 CD44⁺ CD62L⁻ (T_{EM}-memória efetora) nos grupos imunizados com pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7 e pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7. Em relação à memória central (T_{CM} - CD44⁺ CD62L⁺) T CD4 e T CD8 o maior aumento se deu no grupo imunizado com pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15. As células naïve T CD4 e T CD8 também estão aumentadas no grupo imunizado com pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15. No ensaio de neutralização *in vivo* com DENV-2, observou-se 60% de proteção nos animais que tiveram o vírus neutralizado com o soro dos animais vacinados com o pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7; 40% de proteção nos animais que tiveram o vírus neutralizado pelo soro dos animais vacinados com o pVAX-EDIII1-4; pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7; pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15. No mesmo ensaio utilizando DENV-1, podemos observar que o grupo cujo vírus foi neutralizado com o soro dos animais vacinados com pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7 a sobrevivência foi de 80% e de 60% nos grupos que receberam o vírus neutralizado com o soro dos animais vacinados com apenas o pVAX-EDIII1-4, pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GMCSF, pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7 e pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15. Esses resultados mostram que a vacina foi capaz de induzir uma resposta imune e que os adjuvantes testados auxiliaram essa resposta.

ABSTRACT

PESSOA, Carine Ribeiro, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2016. **Development and evaluation of immunogenicity of a tetravalent DNA vaccine combined with genetic adjuvants against dengue virus.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-adviser: Silvia Almeida Cardoso.

Dengue is the most important arboviral disease that affects humans and the increasing number of cases in endemic areas and the possible expansion of the infection risk area has caused concern around the world. Currently, the disease control measures are based on the vector control, the genus *Aedes* mosquitoes and these were not effective, since the infection numbers have increased about 30 times in the last 50 years. Dengue viruses have four serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 and infection with one serotype promote protective immunity against infection with the same serotype. In a second infection with a heterologous serotype, non-neutralizing antibodies produced in the first infection may increase the number of infected cells and thus exacerbate immune response. This phenomenon, known as ADE (antibody dependent enhancement) is related to the severe forms of the disease and for this reason, an effective vaccine against dengue should be tetravalent. This work aims to build a tetravalent DNA vaccine against dengue and additionally develop genetic adjuvants to enhance the immunogenicity of the vaccine. For this, DNA sequences corresponding to the domain III of the E protein of all four serotypes of dengue virus were cloned into the same expression vector. For the development of genetic adjuvants, genes of cytokines GM-CSF, IL-7 and IL-15 were separately cloned into the expression plasmid so that different associations of genetic adjuvants could be evaluated with the plasmid vaccine. The evaluation of the immunogenicity of the tetravalent vaccine DNA and its association with different adjuvants showed that there was a lymphoproliferative response against the proteins prM and E of DENV-3, and the splenocytes coming from the groups that received pVAX-EDIII1-4 and pVAX-IL15, pVAX-EDIII1-4 and pVAX-GMCSF and pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF and pVAX-IL7 showed higher response when re-stimulated *in vitro*. It can also be seen that B cells were increased in the groups vaccinated with pVAX-EDIII1-4 and pVAX-GMCSF and pVAX-EDIII1-4, pVAX-IL15 and pVAX-GMCSF. CD4⁺ T cell subpopulation was increased in the group immunized with pVAX-EDIII1-4 and pVAX-GMCSF while CD8⁺ T cells, in the group immunized with pVAX-EDIII1-4 and pVAX-IL7. We observed an increase in lymphocyte

subpopulation of CD8 CD44⁺ CD62L⁻ (effector memory-T_{EM}) in the groups immunized with pVAX-EDIII1-4 and pVAX-IL7 and pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF and pVAX-IL7. Regarding the central memory (T_{CM} - CD44⁺ CD62L⁺) CD4 and CD8 T cells the largest increase was in the group immunized with pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF and pVAX-IL15. The naïve CD4 and CD8 T cells are also increased in the group immunized with pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF and pVAX-IL15. In the neutralization test in vivo with DENV-2, there was 60% protection in animals that had neutralized the virus with the serum of animals immunized with pVAX-EDIII1-4 and pVAX-IL7; 40% protection in animals in which the virus neutralized by the serum of animals immunized with pVAX-EDIII1-4; pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF and pVAX-IL7; pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF and pVAX-IL15. In the same assay using DENV-1, we can observe that the group which virus was neutralized with serum from animals vaccinated with pVAX-EDIII1-4 and pVAX-IL7 survival was 80% and 60% in the groups receiving the neutralized virus with serum from animals vaccinated with pVAX-EDIII1-4, pVAX-EDIII1-4 and pVAX-GMCSF, pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF and pVAX-IL7 and pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF and pVAX -IL15. These results showed that DNA vaccine was able to induce an immune response and this response was aided by adjuvants tested.

1 INTRODUÇÃO

A dengue é a mais importante arbovirose que afeta o homem. A incidência mundial da doença aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos. A Organização Mundial da Saúde estima que quase metade da população mundial esteja em áreas endêmicas de dengue e que ocorram entre 50 a 100 milhões de novas infecções pelos vírus da dengue, com 20.000 mortes devido à doença, por ano. Adicionalmente, há relatos de surtos de dengue em áreas antes não afetadas, o que corrobora uma preocupação com a expansão da área de incidência de dengue. Nas áreas de incidência também se observa a co-circulação dos quatro sorotipos do vírus como observado na figura 1 (WHO, 2012; MESSINA et al., 2014).

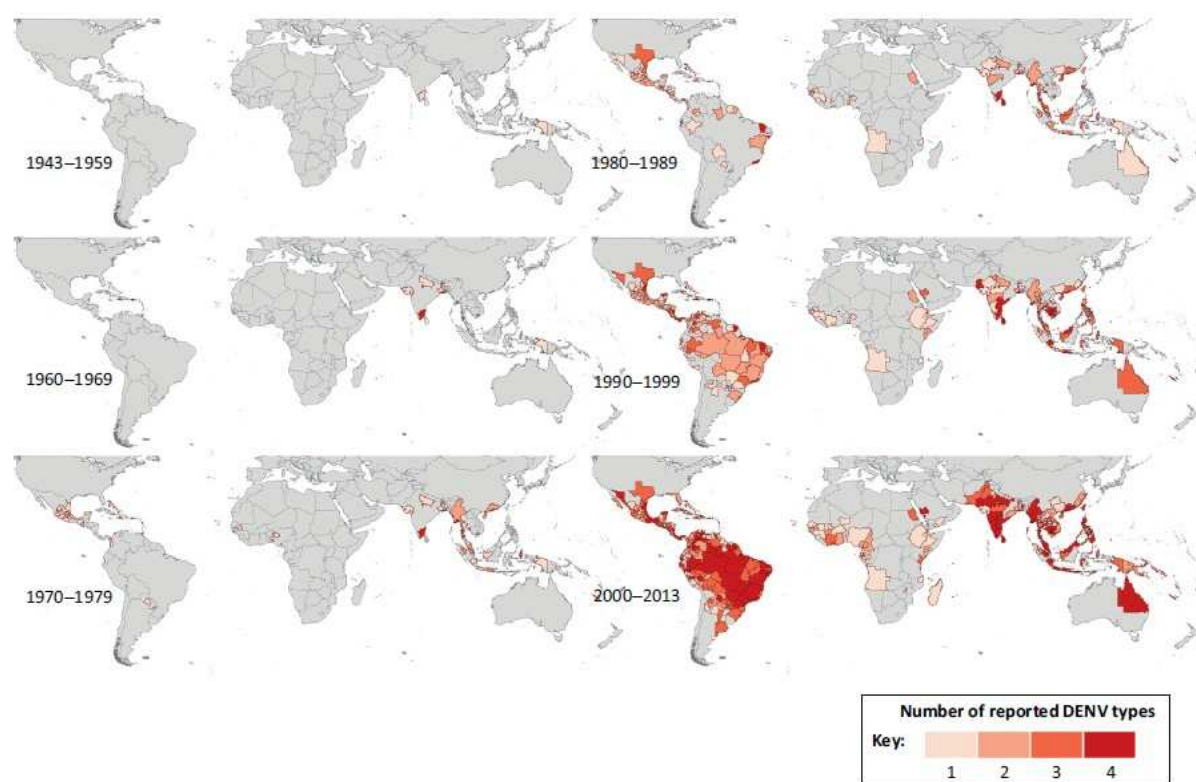


Figura 1. Co-circulação dos sorotipos dos vírus da dengue nas áreas de incidência da doença. Retirado de MESSINA et al., (2014).

No Brasil, no ano de 2016, foram registrados 1.054.127 casos prováveis de dengue – casos notificados, incluindo todas as classificações, exceto descartados – até a semana epidemiológica 16 (3/1/2016 a 23/4/2016). Nos anos de 2014 e 2015, foram registrados 589.107 e 1.649.008 casos prováveis de dengue, respectivamente. Os casos graves confirmados no ano de 2015 foram 1.569 e 20.329 casos de dengue com sinais

de alarme. No ano de 2014, foram confirmados 764 casos de dengue grave e 8.436 casos de dengue com sinal de alarme. No ano de 2015 ocorreram 863 óbitos por dengue, um aumento de 82,5% em comparação a 2014 (473 óbitos). Até a semana epidemiológica 16 de 2016 foram confirmados 190 óbitos por dengue (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2016b).

A doença é transmitida aos homens através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, incluindo o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. As manifestações da dengue abrangem desde infecções assintomáticas até quadros graves que podem levar à morte, como a febre hemorrágica da dengue e a síndrome do choque da dengue. A fisiopatologia das formas mais graves da dengue ainda não é totalmente compreendida, mas a hipótese mais aceita é o agravamento mediado por anticorpo (ADE - *Antibody-Dependent Enhancement of infection*), segundo o qual os anticorpos contra os vírus dengue adquiridos em uma infecção com um determinado sorotipo não neutralizam um sorotipo heterólogo em uma infecção secundária. Esses anticorpos não-neutralizantes seriam capazes de aumentar a eficiência da infecção pelos vírus em macrófagos/monócitos, principais sítios de replicação do vírus, levando a uma ativação imune com ativação do complemento, aumento da produção de mediadores inflamatórios e a grandes danos teciduais causados pela replicação viral elevada (HALSTEAD, 1988; WHITEHEAD et al., 2007).

As primeiras células infectadas, após a inoculação do vírus pela picada do mosquito, são provavelmente, as células dendríticas na pele. Após a replicação inicial e migração para os linfonodos, os vírus aparecem na corrente sanguínea (viremia) durante a fase febril aguda, geralmente de duração de três a cinco dias. A origem dos sintomas sistêmicos na dengue não é bem estabelecida, mas, a liberação de citocinas como resultado da infecção viral nas células dendríticas, macrófagos e a ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham um papel importante. O interferon liberado pelos linfócitos T é responsável por uma redução na atividade da medula óssea, o que se reflete na diminuição na produção de células sanguíneas. As plaquetas, os granulócitos e os monócitos possuem taxa de renovação de 6-8 horas, 16-18 horas e 24 horas, respectivamente. De acordo com a taxa de renovação de cada linhagem celular, as características são observadas no paciente com dengue como petéquias e plaquetopenia, seguida de leucocitose. Da corrente sanguínea, os vírus são disseminados a órgãos como fígado, baço, nódulos linfáticos, medula óssea, podendo atingir, pulmão, coração e trato gastrointestinal. As lesões hepáticas são caracterizadas por necrose focal de hepatócitos,

tumefação, hiperplasia e necrose hialina de células de Kupffer. Com a lesão hepática, em decorrência da replicação viral nos hepatócitos, há comprometimento dos fatores de coagulação sanguínea, que associado à inibição da maturação de megacariócitos pode evoluir para um quadro hemorrágico grave (ROMANOS, 2008).

Os vírus da dengue pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e existem quatro sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Eles são vírus envelopados, com 50 nm de diâmetro, em média e possuem um genoma de RNA fita simples de polaridade positiva, de aproximadamente 11 Kb. O RNA viral é traduzido como uma única poliproteína que será processada por proteases celulares e virais, originando três proteínas estruturais, prM/M, C e E, e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (LINDENBACH & RICE, 2003).

Um importante alvo dos anticorpos neutralizantes contra os flavivirus é a proteína de envelope (E). As subunidades individuais de E consistem de três domínios barril-beta designados domínios E I (EDI), II (EDII) e III (EDIII). A proteína E nativa é um homodímero que recobre a superfície da membrana viral. A proteína E é responsável pela ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira e pela fusão entre as membranas viral e celular. Em estudos com anticorpos monoclonais, demonstrou-se que os epítomos presentes EDIII são sorotipo-específicos e promovem neutralização (CRILL & ROEHRIG, 2001; WAHALA et al., 2009). A resposta imune em humanos produz muitos anticorpos contra EDII, entretanto, esses anticorpos têm reatividade cruzada entre sorotipos e entre outros flavivirus além de pouca capacidade de neutralização (BELTRAMELLO et al., 2010). Nesse contexto, EDIII tem sido apontado como um alvo importante no desenvolvimento de uma vacina contra dengue, por suas características antigênicas.

O agravamento mediado por anticorpo (ADE) proposto como um fator importante na imunopatogenicidade da dengue determina um desafio para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a doença. Uma vacina eficiente, portanto, deve ser tetravalente e promover uma resposta imune protetora, duradoura e equilibrada contra os quatro sorotipos virais (SCHMITZ et al., 2011).

Atualmente muitas tecnologias têm sido empregadas para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue, incluindo vacinas de subunidade recombinante, vírus vivo atenuado, vírus inativado purificados, “virus-like particles” (VLPs), vetores virais e vacinas de DNA. Cada uma dessas tecnologias apresenta vantagens e desafios intrínsecos ao método. As vacinas de DNA tem a vantagem de serem potencialmente

mais seguras, termoestáveis e de baixo custo de produção quando comparadas a outros tipos de vacinas. Entre os principais desafios desse tipo de vacina está a melhoria da expressão e captação do DNA pelas células-alvo (SCHMITZ et al., 2011). Outra importante característica desse tipo de vacina é sua capacidade de gerar uma resposta imune celular com ativação de linfócitos T citotóxicos e ativação de resposta celular tipo Th1. Mas esse tipo de vacina também induz uma resposta tipo Th2, sendo, portanto, eficaz em produzir anticorpos (BĚLÁKOVÁ et al., 2007).

Associado ao desenvolvimento de vacinas de DNA tem-se buscado formas de aumentar a sua imunogenicidade, visto que os adjuvantes tradicionais não são compatíveis com o DNA. Nesse contexto, surgiu o uso de adjuvantes genéticos que são genes que codificam para citocinas, quimiocinas ou moléculas co-estimulatórias que podem ser administrados em plasmídeos separados ou clonados no próprio plasmídeo parental da vacina de DNA. Tais moléculas são capazes de fornecer às células T e dendríticas um segundo sinal estimulante independente de antígeno. Citocinas e quimiocinas parecem reforçar a resposta imune induzida pelas vacinas através do recrutamento de células apresentadoras de antígenos (APCs) para a região da inoculação, pela ativação de células T e B específicas para o antígeno e por induzirem a sobrevivência de células de memória CD4⁺ e CD8⁺ (BĚLÁKOVÁ et al., 2007).

Em estudos recentes, três citocinas têm chamado a atenção devido às funções exercidas na resposta imune: fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e interleucinas-7 (IL-7) e 15 (IL-15).

O GM-CSF é uma glicoproteína primeiramente descrita como fator de crescimento (METCALF, 1985), mas já se sabe que exerce variados efeitos em muitos tipos celulares. Em particular, atua na maturação de precursores das células dendríticas sendo importante na ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs) (TARR, 1996).

As interleucinas IL-7 e IL-15 parecem estar envolvidas na memória imunológica, uma das mais importantes propriedades do sistema imune. A interleucina-7 tem papel fundamental na homeostase de células CD4⁺ de memória, bem como na geração e sobrevivência dessas células (SEDDON et al., 2003; KONDRACK et al., 2003). Acredita-se que a IL-15 tenha ação semelhante a IL-7, porém atuaria em células CD8⁺, possuindo importante papel na proliferação e manutenção de células CD8⁺ efetoras e de memória (SCHLUNS et al., 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A dengue é uma doença de importância global cuja patogênese ainda não está totalmente esclarecida. O vírus é capaz de se replicar em diversos tipos celulares, sendo as células das linhagens monocíticas apontadas como os principais alvos da replicação viral (HALSTEAD, 1988). No entanto, estudos já demonstraram a presença de antígenos virais no fígado (células de Kupffer), no pulmão (macrófagos alveolares), no baço, nos rins, na medula óssea (células mielóides), fagócitos mononucleares da pele e monócitos e linfócitos de sangue periférico (GUZMÁN & KOURI, 2002; JESSIE et al., 2004). Estudos indicam que os vírus da dengue em estado imaturo infectam as células dendríticas e de Langerhans, podendo estas servir de sítios de replicação no início da infecção (HO et al., 2001; MAROVICH et al., 2001; WU et al., 2000). Um receptor celular específico para o vírus ainda não foi identificado, porém, estudos *in vitro* sugerem alguns candidatos para certos tipos celulares, como por exemplo, o receptor de manose em macrófagos (MILLER et al., 2008), o receptor DC-SIGN (CD209) em células dendríticas (NAVARRO-SANCHEZ et al., 2003; TASSANEETRITHEP et al., 2003) e o receptor heparan sulfato em células Vero (CHEN et al., 1997). Recentemente, foi demonstrado que células que não possuem receptores tipo selectina, os vírus utilizam receptores transmembrânicos TIM e TAM, ambos envolvidos na remoção dependente de fosfatidilserina de células que estão em apoptose. DENV liga-se diretamente a TIM enquanto TAM interage indiretamente com DENV através de duas proteínas, Gas6 e ProS (MEERTENS et al., 2012).

O agente etiológico da doença é o vírus da dengue, o qual compreende quatro sorotipos antigenicamente relacionados, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que são igualmente capazes de causar todas as manifestações clínicas da doença. A infecção pelos vírus da dengue pode resultar em diferentes sintomas clínicos, que vão de infecções assintomáticas até a febre da dengue, febre da dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue. Essas variações da doença são diferenciadas de acordo com o grau de permeabilidade vascular e manifestações hemorrágicas. A maioria das infecções sintomáticas se apresenta como a febre da dengue clássica, com um período de incubação que pode abranger de 3 a 14 dias, mas geralmente é de 4 a 7 dias. Esta variante da doença é caracterizada por febre acompanhada de dores de cabeça, dor retro-orbitária, mialgia e artralgia generalizadas, anorexia, dor abdominal e náuseas. O rash cutâneo é comum, e normalmente há uma completa recuperação do doente (WHITEHEAD et al., 2007).

Já as formas mais graves da doença, como a febre da dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue são caracterizadas por febre, trombocitopenia, manifestações hemorrágicas e aumentada permeabilidade vascular com vazamento do fluido intravascular no espaço intersticial. A viremia é cerca de 100 vezes maior do que na febre da dengue clássica. Estas formas mais graves são encontradas principalmente em áreas endêmicas nas quais os quatro sorotipos estão circulando. O choque hipovolêmico surge quando há grande vazamento do plasma no espaço intersticial. O curso do choque é curto, mas há risco de vida, com morte ou recuperação em 24 horas. Há relatos também de falha fulminante do fígado e manifestações neurológicas em indivíduos com dengue (WHITEHEAD et al., 2007).

A patogênese da febre da dengue hemorrágica e da síndrome do choque da dengue permanece indeterminada, mas acredita-se que uma massiva secreção de citocinas seja um dos principais fatores contribuintes (CHEN et al., 2008). Outros fatores como a virulência dos diferentes sorotipos e fatores genéticos do indivíduo também influenciam na patogênese (WHITEHEAD et al., 2007).

Em 2009, a OMS introduziu uma nova classificação para os casos de dengue, substituindo febre da dengue (DF) síndrome do choque dengue (DSS) e dengue hemorrágica (DHF) para dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta (dor abdominal, vômito persistente, acumulação de fluidos, sangramento de mucosas, letargia, hepatomegalia, aumento do hematócrito com diminuição das plaquetas) e dengue grave. As orientações revistas visam melhorar a triagem e tratamento adequado, uma vez que o reconhecimento precoce dos sinais de alerta deve orientar os médicos quanto ao prognóstico do paciente e permitir decisões de triagem e correto manejo dos pacientes. Vários estudos mostram aumento da sensibilidade para a identificação de casos graves com a nova classificação (WHO, 2012b; NARVAEZ et al., 2011).

A doença é transmitida para humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*, mas os vírus dengue também podem ser transmitidos por mosquitos *Aedes albopictus*. O controle da doença têm se concentrado no combate ao vetor, porém o aumento acentuado da dengue nos últimos anos é devido principalmente à expansão geográfica do *A. aegypti*, o que demonstra que esta estratégia é muito deficiente. Além do mais, o vírus é mantido por um ciclo de transmissão humano-mosquito-humano. Um ciclo silvestre de transmissão existe em florestas da Ásia e oeste da África entre primatas não-humanos e mosquitos *Aedes*, mas acredita-se

que a contribuição deste ciclo para a transmissão em epidemias urbanas seja mínima (WHITEHEAD et al., 2007).

O combate a dengue representa um enorme desafio político e sócio-econômico que requer uma resposta integrada em nível regional, nacional e mundial. A reincidência de epidemias na América Latina representa a necessidade não só do desenvolvimento de uma vacina eficaz, mas também de mudanças no campo político. Após o surto de dengue nos Estados Unidos em 1945, a Organização de Saúde Panamericana decretou uma resolução visando erradicar o *A. aegypti* em 1947. No período entre 1952 e 1965 dezenove países da América Latina foram certificados como livres do mosquito. No entanto, em 1967 o Brasil e a Guatemala foram reinfestados com o *Aedes aegypti* e em 1968 apareceram os primeiros casos. Em 2007, a doença tinha se apoderado de áreas nas quais tinha sido endêmica. Três fatores podem ser apontados como responsáveis pelo reaparecimento da doença nessa região. Nem todos os países possuíam uma política de erradicação do mosquito transmissor, e entre aqueles que a tinham, o interesse em manter tal erradicação foi baixo. Além do mais, uma vez o início da reinfestação, a reação para combater a nova ameaça foi lenta em vários países. De um ponto de vista econômico, os gastos com equipamentos, suprimentos e salários para aqueles envolvidos no combate ao mosquito foram um incentivo ao abandono dos programas de erradicação. Finalmente, o êxodo rural acompanhado de precárias condições sanitárias contribuiu fortemente para a propagação do vetor. Como consequência, a dengue é mais uma vez um grave problema de saúde pública na América Latina e no Caribe (TAPIA-CONYER et al., 2009; DICK et al., 2012).

O vírus da dengue têm aproximadamente 50 nm de diâmetro, é envelopado e possui um genoma de RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11 kb, que contém uma única *Open Reading Frame* (ORF) codificando uma longa poliproteína, a qual é processada por proteases virais e das células do hospedeiro. Tal processamento gera dez proteínas, das quais, três são estruturais, capsídeo (C), membrana (prM) e envelope (E), que constituem os componentes do vírion, e sete são não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, envolvidas na replicação do RNA viral (PERERA & KUHN, 2008).

A proteína E, uma glicoproteína de 53 a 54 kDa, é o principal componente proteico do envelope viral, sendo responsável por mediar a ligação do vírus aos receptores celulares e a sua fusão à célula (HENCHAL & PUTNAK, 1990). Sua estrutura molecular se apresenta como um homodímero, em que cada monômero possui

três domínios: um domínio central que organiza toda a estrutura (domínio I), um domínio de dimerização que contém o peptídeo de fusão, essencial para a fusão do vírus à célula (domínio II) e um domínio com estrutura semelhante a imunoglobulinas (domínio III) (ZHANG et al., 2003). O domínio III tem sido proposto como o sítio de ligação aos receptores celulares e como possuidor dos principais epítomos para a ligação de anticorpos contra o vírus da dengue, ou seja, o antígeno mais imunogênico do vírus (ROTHMAN, 2004; WHITEHEAD et al., 2007; ZHANG et al., 2003). Após a entrada dos virions através de endocitose mediada por receptor, há a fusão das membranas viral e do hospedeiro mediada pela proteína E sob as condições ácidas do endossomo (LI et al., 2008; WHITEHEAD et al., 2007).

Várias proteínas celulares e carboidratos que agem como fatores de ligação têm sido identificados, e estas moléculas interagem com a proteína E. Esses fatores de ligação auxiliam na concentração do vírus na superfície da célula, o que resulta em um aumento no acesso aos receptores celulares específicos. Infelizmente, um receptor celular para os vírus da dengue ainda não foi identificado (PERERA & KUHN, 2008).

Acredita-se que a proteína prM auxilie no dobramento da proteína E e que ambas estão integradas na bicamada lipídica do virion através de duas regiões transmembrana. Nos estágios finais da montagem viral no trans-Golgi, a prM é clivada por furinas, o que resulta em um rearranjo das proteínas M e E na superfície do virion. Esta mudança conformacional na proteína E é disparada pelo baixo pH (5,8-6,0) e ocorre antes da clivagem da proteína prM. O peptídeo “pr” clivado permanece na partícula madura associado à proteína E até que a partícula viral seja liberada no pH neutro do ambiente extracelular. Especula-se que o peptídeo “pr” funcione como um cap que protege o peptídeo de fusão presente na proteína E de uma fusão prematura antes da liberação viral (WHITEHEAD et al., 2007; PERERA & KUHN, 2008).

O tratamento da dengue é sintomático, uma vez que antivirais específicos não se encontram disponíveis. Com isso, a Organização Mundial de Saúde considera a criação de uma vacina eficaz contra esses vírus uma prioridade. A vacina ideal contra a dengue deveria ser livre de reatogenicidade significativa, deveria induzir um nível de proteção à infecção contra qualquer um dos quatro sorotipos selvagens além de fornecer proteção duradoura. Como muitas das regiões em que a dengue é endêmica são subdesenvolvidas, a vacina deve ser economicamente viável ou ser administrada em poucas doses ou dose única. Como a imunização com vírus vivos atenuados ou vírus inativados geralmente induzem uma menor quantidade de anticorpos do que a infecção

com o vírus selvagem, é provável que pelo menos, duas doses fossem necessárias. Então, a vacina ideal contra a dengue poderia ser uma vacina tetravalente administrada em duas doses com intervalo entre 3 e 6 meses entre elas, ou uma vacina de vírus não vivo, como vírus inativado, partículas subvirais, vetor vacinal ou mesmo uma vacina de DNA, dada em múltiplas doses para induzir altos níveis de anticorpos (WHITEHEAD et al., 2007).

Os desafios enfrentados para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue incluem a presença de vários sorotipos virais, a presença de proteção cruzada incompleta entre os sorotipos, a interferência viral entre os sorotipos, a ausência de modelo animal que reproduza a doença (ROTHMAN, 2011).

Vários princípios têm guiado o desenvolvimento de vacinas atenuadas. As respostas imunes celular e humoral induzidas por esse tipo de vacina devem ser duradouras e como mimetizam uma infecção natural, a resposta será ampla incluindo resposta imune contra proteínas estruturais e não-estruturais. A replicação do vírus atenuado precisa ser restrita para evitar o desenvolvimento de uma doença significativa e possuir baixa transmissibilidade pelos mosquitos, isso pode ser alcançado por baixa viremia do vírus atenuado. Além disso, o vírus deve ter alta infectividade em humanos e ter replicação eficiente em cultura de células. A resposta deve ser equilibrada para os quatro sorotipos virais e a base genética da atenuação de cada um dos componentes da vacina deve ser bem definida a fim de ser monitorada durante o processo de produção e uso em humanos. Além disso, as mutações que levam à atenuação devem ser estáveis (WHITEHEAD et al., 2007).

Métodos de biologia molecular também têm sido empregados na busca de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas (RAMANATHAN et al., 2009; KHANAM et al., 2006; RAVIPRAKASH et al., 2006; CHEN et al., 2007; LENG et al., 2009) e tais trabalhos abrangem desde a criação de quimeras até o desenvolvimento de vacinas de DNA. As vacinas de DNA são de fácil produção, estáveis e podem ser transportadas a temperatura ambiente, ainda há baixa probabilidade de haver interferência na replicação. No entanto, esse tipo de vacina requer múltiplas doses e necessidade de imunoestimulação e adjuvantes (WHITEHEAD et al., 2007).

Uma abordagem recente utilizada na elaboração de vacinas contra várias doenças infecciosas é a construção de vacinas de DNA, que consistem de um plasmídeo recombinante que codifica o antígeno de interesse engenheirado para a expressão em células eucarióticas.

Inicialmente os estudos sobre a ação das vacinas de DNA se concentraram na fonte de apresentação do antígeno, nas propriedades imunológicas do próprio DNA e no papel das citocinas induzidas nas respostas imunes (DONNELLY et al., 2005).

O tipo de célula transfectada depende do método de introdução do DNA. O bombardeamento da epiderme com partículas de ouro recobertas com o plasmídeo vacinal transfecta diretamente as células de Langerhans e os queratinócitos, que então migram para os linfonodos. A injeção intramuscular da vacina leva à transfecção de miócitos, sendo necessária a participação de células apresentadoras de antígenos profissionais, via MHC de classe I, para a indução de linfócitos T citotóxicos (DONNELLY et al., 2005).

As ferramentas de biologia molecular permitem a otimização das vacinas de DNA, como o aumento da expressão de certos antígenos através da remoção de alguns sites da sequência codificadora que facilitem a expressão na superfície da célula ou aumentem a secreção, ou mesmo modificações que visam uma melhoria da resposta imune induzida, como ocorre na fusão de antígenos com certas proteínas, como as proteínas do choque térmico ou mesmo a proteína VP22 do vírus herpes simplex, o que facilita a internalização de proteínas secretadas pelas células apresentadoras de antígenos e conseqüentemente aumentam a eficiência das vacinas de DNA inoculadas por rota intramuscular (DONNELLY et al., 2005).

Algumas características são essenciais para a criação de vacinas de DNA, como a presença de um promotor forte, uma origem de replicação para permitir a propagação dos plasmídeos em bactérias e a inserção de sequências de poliadenilação para a estabilização dos transcritos de RNA (BĚLÁKOVÁ et al., 2007).

Além disso, certas propriedades do plasmídeo desempenham um papel crítico na indução da resposta imune. DNA bacteriano contendo sequências CpG não metiladas agem como um ativador policlonal de células B *in vitro* e como adjuvante *in vivo*, e também pode estimular vários tipos de células do sistema imune, como monócitos, células dendríticas e células T (DONNELLY et al., 2005; GURUNATHAN et al., 2000).

Vários grupos têm desenvolvido vacinas de DNA contra os vírus da dengue, as quais expressam diversos antígenos virais. Muitas pesquisas se baseiam na expressão das proteínas E e prM, como descrito por De Paula e colaboradores. Neste caso as proteínas prM e E do vírus dengue-3 foram capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra o vírus dengue-3 e proliferação de células T frente ao estímulo com o vírus

selvagem. Além disso, a vacina conferiu uma sobrevivência de 80% em camundongos (DE PAULA et al., 2008).

Outras pesquisas buscam a criação de uma vacina contra a dengue através da expressão da proteína não estrutural NS1, como descrito por Costa et al., pois apesar da proteína E possuir os principais epítomos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes, tal proteína poderia induzir também anticorpos não neutralizantes envolvidos no fenômeno do agravamento da infecção mediada por anticorpo. Dentre os candidatos vacinais testados, os plasmídeos contendo os genes da proteína NS1 do vírus dengue-2 mais o peptídeo sinal t-PA e aquele contendo o gene da proteína NS1 do vírus dengue-2 mais a região C-terminal da proteína E foram capazes de induzir altos níveis de anticorpos neutralizantes e proteção contra esta enfermidade em camundongos (COSTA et al., 2007).

Vários trabalhos têm buscado a criação de vacinas de DNA tetravalentes através da expressão do domínio III da proteína de envelope E. Este domínio está envolvido na interação com o receptor da célula hospedeira e contém epítomos tipo- e subtipo-específicos que induzem somente anticorpos neutralizantes, o que seria essencial na criação de uma vacina. A remoção de outros epítomos que induzem anticorpos não-neutralizantes com reação cruzada poderia reduzir o risco da progressão da doença para as formas mais graves (LENG et al., 2009).

Chen e colaboradores (2007) obtiveram resultados satisfatórios ao criarem uma proteína recombinante composta pelos domínios III dos quatro sorotipos. Níveis significativos de anticorpos específicos foram induzidos nos soros de camundongos imunizados com a proteína para os sorotipos 1, 2 e 4 e uma proteção de 70% frente ao desafio com esses vírus foi observada, enquanto somente 18% dos animais sobreviveram após o desafio com DENV-3. Estes resultados sugerem que alguns determinantes antigênicos do domínio III do sorotipo 3 possivelmente permaneceram no interior da proteína.

A expressão do domínio III do vírus *dengue-2* por um vetor de adenovirus também mostrou-se satisfatória, tanto na indução de anticorpos neutralizantes quanto na proliferação de esplenócitos de camundongos imunizados *in vitro*, com produção de altos níveis de interferon γ , indicando um padrão de resposta Th1 (KHANAM et al., 2006).

A resposta imune a partir das diferentes formas de vacinação, principalmente vacinas de DNA, tem se caracterizado como sub-ótima. Visando uma melhora da

resposta imune, são utilizadas substâncias conhecidas como adjuvantes em combinação com os antígenos vacinais. Esses compostos apresentam efeito sinérgico ou aditivo e potencializam os efeitos imunogênicos (O'HAGAN, 2000). Recentemente, surgiu o uso de adjuvantes genéticos como meio alternativo para aumentar a eficiência das vacinas de DNA. Em geral, são genes que codificam para citocinas, quimiocinas ou moléculas co-estimulatórias. O cDNA pode ser administrado em plasmídeos separados ou clonados no próprio plasmídeo parental da vacina de DNA. Tais moléculas são capazes de fornecer a células T e dendríticas um segundo sinal estimulante independente de antígeno (BĚLÁKOVÁ et al., 2007). Citocinas e quimiocinas parecem reforçar a resposta imune induzida pelas vacinas através do recrutamento de células apresentadoras de antígenos (APCs) para a região da infecção, pela ativação de células T e B específicas para o antígeno (SEDEGAH et al., 2000) e por induzirem a sobrevivência de células de memória CD4⁺ e CD8⁺ (TOUGH et al., 2000).

Em estudos mais recentes, três citocinas têm chamado a atenção devido às funções exercidas na resposta imune: fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), e interleucinas-7 (IL-7) e -15 (IL-15).

O GM-CSF é uma glicoproteína primeiramente descrita como fator de crescimento (METCALF, 1985), mas já se sabe que exerce variados efeitos em muitos tipos celulares. Em particular, atua na maturação de precursores das células dendríticas (TARR, 1996), sendo importante na ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs).

As IL-7 e IL-15 parecem estar envolvidas na memória imunológica, uma das mais importantes propriedades do sistema imune. Segundo Seddon e colaboradores (2003), a IL-7 tem papel fundamental na homeostase de células CD4⁺ de memória e Kondrack e colaboradores (2003) relatam a importância dessa interleucina na geração e sobrevivência de CD4⁺ de memória. Acredita-se que a IL-15 tenha ação semelhante à IL-7, porém atua em células CD8⁺. Li, W. et al. (2008) indicam a melhora da resposta imune duradoura contra antígenos de HIV com o uso de IL-15 como adjuvante genético. Segundo Kutzler et al. (2005), observou-se que a IL-15 possui importante papel na proliferação e manutenção de células CD8⁺ efetoras e de memória, assim como estariam envolvidas na indução de forte resposta humoral.

Este trabalho teve o objetivo de construir uma vacina de DNA recombinante tetravalente contra a dengue e, adicionalmente desenvolver adjuvantes genéticos para aprimorar a imunogenicidade dessa vacina. Para isso as sequências de DNA

correspondentes aos domínios III dos quatro sorotipos dos vírus da dengue foram clonadas em vetor de expressão. Para o desenvolvimento de adjuvantes genéticos, os genes murinos das citocinas GM-CSF, IL-7 e IL-15 foram clonados em plasmídeos separados, construindo-se três adjuvantes distintos. Em seguida, foi avaliada a expressão *in vitro* dos plasmídeos recombinantes e a capacidade imunogênica da vacina e sua associação com os diferentes adjuvantes *in vivo*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Construir um vetor vacinal que expresse o domínio III da proteína E dos quatro sorotipos virais da dengue e plasmídeos que expressem os genes das citocinas murinas GM-CSF, IL-7 e IL-15 e avaliar o potencial imunogênico do candidato vacinal e sua associação com os diferentes adjuvantes genéticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Clonar os fragmentos de DNA responsáveis por codificar o domínio III da proteína E dos quatro sorotipos dos vírus DENV em vetor de expressão;

3.2.2 Clonar os genes responsáveis por codificar as citocinas GM-CSF, IL-7 e IL-15 de *Mus musculus* em vetor de expressão;

3.2.3 Avaliar a expressão *in vitro* dos plasmídeos recombinantes;

3.2.4 Avaliar a imunogenicidade do candidato vacinal e dos adjuvantes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CÉLULAS E PLASMÍDEOS

As células VERO foram mantidas à 37 °C e 5% CO₂, em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Esta linhagem celular já se encontrava estabelecida em nosso laboratório. O plasmídeo de clonagem pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific Inc.) e o plasmídeo de expressão pVAX1 (Invitrogen Life Technologies) foram usados durante o trabalho.

4.2 ANIMAIS

Os camundongos foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e mantidos no biotério do Laboratório de Immunovirologia Molecular da UFV. Durante todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em local com controle de temperatura, ventilação e fotoperíodo, sendo que a metodologia utilizada nesse projeto foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal de Viçosa, processo 69/2013.

4.3 ESTOQUES VIRAIS

Os vírus DENV-1 (Nauru Island), DENV-2 (New Guinea C), DENV-3 (H87) e DENV-4 (H241) foram inoculados por via intracraniana em camundongos neonatos. Após os sinais de infecção, letargia, tremores, fraqueza muscular, paralisia de membros posteriores, os animais foram eutanasiados. Os cérebros foram extraídos com seringa, macerados em tampão salina fosfato (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e centrifugado por 10 minutos a 500 x g. O sobrenadante foi coletado, adicionado soro fetal bovino (5% v/v) e estocado em ultra-freezer à -80 °C. Para confirmação da presença do vírus, o RNA da amostra foi extraído e submetido a uma reação com a transcriptase reversa seguido de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR).

4.4 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO VACINAL E DE ADJUVANTES GENÉTICOS

O RNA viral de cada sorotipo foi extraído a partir do sobrenadante de cérebro de camundongos. A extração de RNA total da medula óssea do camundongo *Mus musculus* foi feita a partir do osso femural. Para obtenção de RNA, todas as amostras foram

tratadas com TRI-Reagent® (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 750 µL de TRI Reagente foram adicionados e homogeneizados a 250 µL da amostra e deixados à temperatura ambiente por cinco minutos. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio, homogeneizado por inversão e deixados à temperatura ambiente por 15 minutos. Após essa etapa, procedeu-se uma centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos à 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo e acrescentou-se 500 µL de isopropanol. A solução foi homogeneizada e após 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 75%. A amostra foi misturada em agitador tipo vortex e centrifugada a 7.500 x g por 5 minutos à 4 °C. O RNA foi seco à temperatura ambiente e suspenso em água ultrapura livre de RNase. As amostras foram analisadas quanto a qualidade e concentração em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc.) A síntese de cDNA foi realizada com a enzima M-MLV RT (Sigma-Aldrich), usando primers randômicos e seguindo as recomendações do fabricante.

Os genes de interesse foram amplificados por PCR usando primers específicos descritos na tabela 1. O domínio III da proteína E de cada sorotipo viral foi amplificado a partir de um passo inicial de 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto seguidos por uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. As citocinas GM-CSF, IL-7 e IL-15 de *Mus musculus* foram amplificadas a partir de um passo inicial de 95 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 65 °C por 45 segundos 72°C por 1 minuto seguidos por uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR tem os tamanhos especificados na tabela 2. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose, as bandas de interesse foram excisadas do gel e purificadas com o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

Tabela 1. Descrição dos primers.

Primer	Sequência
D1 DIII NheI	5' - CCCGCTAGCATGCACACTGCGTTGACTGGA -3'
D1 DIII AflII	5' - GGGCTTAAGCTGCTTCCCTTCTTGAACCAG -3'
D2 DIII AflII	5' - CCCCTTAAGGTGCAGGCTGAGAATGGACA -3'
D2 DIII KpnI	5' - GGGGGTACCTCGCCCAAATGGCCATTC -3'
D3 DIII KpnI	5' - CCCGGTACCGGGAGCAATGCATACAGCAC -3'
D3 DIII PstI	5' - GGGCTGCAGATCGAGCTTCCCTTCTGTAC -3'
D4 DIII PstI	5' - CCCCTGCAGGGACTCCGGTGATGGAAATC -3'
D4 DIII XhoI	5' - GGGCTCGAGGGAATCCCTTTCTGAAC -3'
mGM-CSFs	5' - GGGAAATTCATGTGTGGTCTACAGCCTCTCAGCAG -3'
mGM-CSFas	5' - GGGGTACCTTACAAAGGGGATATCAGTCAGAAAGGT -3'
mIL-7s	5' - GGCTCGAGATGTTCCATGTTTCTTTTAGATA -3'
mIL-7as	5' - GGGGTACCTTATATACTGCCCTTCAAAT -3'
mIL-15s	5' - GGGAAATTCATGAAAATTTTGAAACCATATATGA -3'
mIL-15as	5' - GGGGTACCTTAGGACGTGTTGATGAACATTTG -3'

A sequência sublinhada refere-se ao sítio da enzima de restrição introduzido no produto de PCR.

Tabela 2. Tamanho (pb) dos produtos de PCR.

Produto amplificado	Tamanho (pb)
DIII D1	425
DIII D2	411
DIII D3	435
DIII D4	400
GM-CSF	368
IL-7	465
IL-15	489

A ligação dos produtos amplificados ao vetor de clonagem pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific Inc.) foi feita com a enzima T4 DNA ligase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.) seguindo as recomendações dos fabricantes. A reação de ligação foi usada para transformar, por choque térmico, bactérias *Escherichia coli* TOP10F quimiocompetentes. Os plasmídeos recombinantes foram confirmados por PCR, usando os primers específicos para cada produto. Ao final, foram obtidos quatro plasmídeos recombinantes, cada um contendo a região codificadora do domínio III da proteína E de

cada sorotipo e três plasmídeos contendo o gene murino de cada uma das citocinas GM-CSF, IL-7 e IL-15.

Os fragmentos de DNA clonados foram submetidos à digestão com as respectivas enzimas de restrição indicadas na tabela 1. Após eletroforese em gel de agarose, os insertos digeridos foram excisados e purificados com o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). A subclonagem foi feita usando-se T4 DNA ligase (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A reação de ligação foi utilizada para transformar por choque térmico, bactérias *E. coli* TOP10F competentes. Os insertos do domínio III da proteína E de cada sorotipo viral foram ligados ao plasmídeo pVAX1, de modo sequencial, com sucessivos passos de digestão de cada produto clonado no vetor pTZ57R/T e subclonagem no pVAX1. Os fragmentos de DNA que codificam para as citocinas foram ligados ao plasmídeo pVAX1 separadamente. Os clones que cresceram no meio com antibiótico (Kanamicina 50 µg/mL de meio) foram confirmados por PCR quanto a presença do inserto. Os insertos foram posteriormente confirmados por sequenciamento.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

IN VITRO

4.5.1 Transfecção de células Vero

Células Vero (1×10^5 células/poço) foram cultivadas à 37 °C e 5% CO₂ em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina e antibióticos em placas de 12 poços até aproximadamente 80% de confluência. Cada plasmídeo recombinante, pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF, pVAX-IL7, pVAX-IL15 e o vetor vazio foram utilizados para transfectar as células Vero usando-se o reagente Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, em um microtubo foi acrescentado 100 µL de meio MEM sem soro fetal bovino ao volume de DNA correspondente a 600 ng. Em outro microtubo, foi adicionado o reagente Lipofectamine® 2000 (1 µL do reagente para cada 1 µg de DNA) a 100 µL de meio MEM sem soro fetal bovino. Após 5 minutos, o complexo de transfecção foi misturado ao DNA e esperou-se 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, o meio MEM foi retirado do poço, acrescentou-se 800 µL de meio MEM contendo 2% de soro fetal bovino e 200 µL do DNA complexado à Lipofectamine® 2000. Após 24 horas, os poços foram lavados 5 vezes com PBS e as células foram coletadas com PBS para verificar a produção da proteína ou TRI-Reagent

(Sigma Aldrich) para extração de RNA e verificação quanto a presença do mRNA correspondente às citocinas.

4.5.2 Imunofluorescência indireta

As células Vero (2×10^5 células por poço) foram cultivadas sobre lamínulas circulares em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina e antibióticos à 37 °C e 5% de CO₂ até atingirem aproximadamente 80% de confluência. No dia do experimento, o meio de cultura foi trocado 2 horas antes do início do protocolo. Em um microtubo 10 µg de DNA do plasmídeo vacinal foi adicionado a 60 µL de CaCl₂ 2M e água ultrapura para completar o volume de 480 µL. O volume deste microtubo foi adicionado lentamente a 480 µL de HBS 2X (NaCl 280 mM, HEPES 50 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, pH 7,2). Após 45 minutos à temperatura ambiente e sob agitação lenta, a suspensão foi adicionada ao poço. Após 4 horas e 30 minutos, o meio contendo a suspensão de DNA foi retirado e adicionado um meio de cultura fresco. As células foram cultivadas por mais 24 horas, o meio foi então retirado e o poço foi lavado 2 vezes com PBS. Adicionou-se 300 µL de acetona para fixação das células e após 15 minutos sob agitação, os poços foram lavados com PBS. Adicionou-se o anticorpo primário diluído 1:100. Nesta etapa, utilizou-se anticorpo policlonal contra cada um dos sorotipos dos vírus dengue. Após 1 hora à 37°C, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T (PBS-Tween 20 0,5%) por 5 minutos. As lamínulas foram então cobertas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a FITC diluído 1:500 e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS-T por 5 minutos, as células foram coradas com DAPI por 5 minutos e novamente lavadas com PBS. As lamínulas foram montadas em sacarose 50% e armazenadas em geladeira, protegidas da luz, para posterior análise em microscópio de fluorescência (Olympus BX53).

4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e western blotting

As células transfectadas com o plasmídeo recombinante pVAX-EDIII1-4 foram lisadas mecanicamente e recolhidas em PBS. Este lisado celular, contendo todo o conteúdo protéico, foi dosado pelo método do ácido bicinconínico e cerca de 5 µg foi misturado ao tampão redutor e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) e

analisado por western blotting. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e foi feito o bloqueio durante dezesseis horas à temperatura ambiente com PBS contendo 5% de gelatina. Após lavagens com PBS-Tween 20 0,5%, a membrana foi incubada com soro policlonal de cada um dos sorotipos dos vírus dengue diluído 1:1000 em PBS contendo 0,5 M de NaCl por 4 horas à temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T e incubada por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo anti-IgG camundongo marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:2000 em PBS. Após lavagens com PBS-Tween 20 0,5%, a membrana foi revelada com DAB (Sigma-Aldrich) em Tris-HCl 50 mM conforme as especificações do fabricante para a visualização das bandas de interesse.

4.5.4 Análise da presença do mRNA das citocinas

Células Vero foram transfectadas com os plasmídeos recombinantes pVAX-GMCSF, pVAX-IL7, pVAX-IL15 e após 24 horas os poços foram lavados com PBS e foi adicionado TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). Seguiu-se, então, a extração de RNA e síntese de cDNA que foi então usado (600 ng) em reação de PCR para verificar a presença do mRNA correspondente de cada citocina.

4.6 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

O plasmídeo recombinante vacinal pVAX-EDIII1-4 e suas associações com os adjuvantes genéticos foram avaliados quanto à sua capacidade de induzir resposta imune contra os vírus dengue em camundongos BALB/c. Grupos de 4 animais com 5 semanas de vida foram imunizados por via intramuscular com 100µg dos diferentes plasmídeos em sacarose 25%. Os grupos experimentais foram: pVAX; pVAX-EDIII1-4; pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GM-CSF; pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7; pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL-15; pVAX-EDIII1-4, pVAX-GM-CSF e pVAX-IL7; pVAX-EDIII1-4, pVAX-GM-CSF e pVAX-IL15. Foram realizadas três imunizações com intervalo de 15 dias. O sangue dos animais foi coletado antes de cada imunização e após 15 dias a última imunização. O sangue foi processado por centrifugação para a obtenção do soro e estocado à -20°C até sua utilização nos ensaios de neutralização *in vitro* e *in vivo*. Após 15 dias da última imunização, os animais foram eutanasiados e o baço foi coletado.

4.6.1 Processamento do baço e ensaio de linfoproliferação

Os baços dos camundongos imunizados foram coletados e divulsionados em meio RPMI-1640 incompleto. O meio contendo as células foi transferido para um tubo tipo falcon e centrifugado a 500 x g por 5 minutos à 4 °C. As células foram então suspensas em tampão de lise de hemácias (solução de NH₄Cl 0,16 M e Tris-HCl 0,17 M pH 7,3 na proporção 9:1). Após 7 minutos, as células foram centrifugadas a 500 x g e o precipitado foi lavado com meio RPMI incompleto. As células foram suspensas em meio RPMI completo e contadas em câmara de Neubauer. Cada poço de uma placa de 96 poços recebeu 5 x 10⁵ células do “pool” de esplenócitos dos animais do mesmo grupo. As células foram estimuladas com 10 µg das proteínas prM/M e E recombinantes produzidas em *Pichia pastoris* no nosso laboratório. Para controle negativo foi utilizado meio RPMI-1640 completo e para controle positivo, concanavalina-A (Con-A, 7,5 µg/mL). Após 44 horas de incubação à 37 °C, o sobrenadante foi coletado para dosagem de citocinas e foi adicionado MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich) em PBS com período de incubação de 4 horas à 37 °C. Após esse período, foi adicionado isopropanol ácido (0,1 M de HCl em isopropanol) para a solubilização do produto do metabolismo do MTT (cristais de formazan). A leitura da densidade óptica foi feita a 560 nm.

4.6.2 Imunofenotipagem

Para a avaliação da imunofenotipagem após as imunizações, o volume correspondente a 1 x 10⁶ células de esplenócitos de cada animal foi transferido para um microtubo e foi adicionado 500 µL de FACS buffer (PBS, 2% de soro fetal bovino e 1 mM EDTA). As células foram centrifugadas a 500 x g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 50 µL da mistura de anticorpos que continha anti-CD4 – APC.Cy7 (clone RM4-5), anti-CD8 – PE.Cy7 (clone 53-6.7), anti-CD19 – PerCP.Cy5.5 (clone 1D3), anti-CD44 – PE (clone IM7), anti-CD62L – APC (clone MEL-14). Após 30 minutos de incubação, foram acrescentados 300 µL de FACS buffer às amostras, submetidos a centrifugação a 500 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e essa lavagem foi repetida. As células foram suspensas em 300 µL de FACS buffer e analisadas no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences).

4.6.3 Dosagem de citocinas

As dosagens das citocinas foram realizadas a partir do sobrenadante dos linfócitos re-estimulados *in vitro* utilizando o BD™ Cytometric Bead Assay Mouse Th1/Th2/Th17 kit seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences) e analisadas no software FCAP Array™ v3.0.1

4.6.4 Ensaio de neutralização em placa (PRNT – *Plaque reduction neutralization test*)

Os "pools" de soros de camundongos imunizados foram testados para detecção de anticorpos neutralizantes, usando a técnica descrita por Russell e Nisalak (Russell & Nisalak, 1967), com modificações. Diluições dos soros foram incubadas com uma diluição do estoque viral contendo 100 unidades formadoras de placas (pfu) à 37 °C por 1 hora e 30 minutos. As soluções de soro e vírus foram adicionadas às células Vero e incubadas por 1 hora em roscador. Após esse tempo, foi adicionado meio MEM contendo 3% de CMC (carboximetilcelulose). As placas permaneceram em estufa à 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por 5 a 6 dias. Após este período, as monocamadas de células foram fixadas com paraformaldeído 3%, coradas com cristal violeta (cristal violeta 5%, NaCl 0,25%, formol 1,75%, etanol 50%) e as placas de lise contadas. A última diluição do soro que apresentou uma redução de 50% no número de placas de lise é considerada como título de detecção de anticorpo neutralizante.

4.6.5 Ensaio de neutralização *in vivo*

Neste ensaio uma solução foi preparada contendo 1 volume do "pool" do soro inativado dos animais previamente imunizados com 1 volume de vírus correspondente à DL50 e incubada à 37 °C por 90 minutos. Após esse tempo, seguiu-se a inoculação por via intracraniana de 10 µL da solução em animais neonatos com 5 dias de vida. Os animais foram observados por 21 dias diariamente e observações sobre morbidade e mortalidade foram registradas. Os animais que morreram nas primeiras 24 horas não foram considerados.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram feitas usando 1-way-ANOVA e pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism 6.

5 RESULTADOS

5.1 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO VACINAL

Para obtenção da vacina de DNA tetravalente contra a dengue, o DNA referente ao domínio III da proteína E de cada sorotipo foi clonado no pTZ57R/T separadamente. Os EDIII dos quatro sorotipos foram subclonados no vetor de expressão pVAX como representado na figura 2.

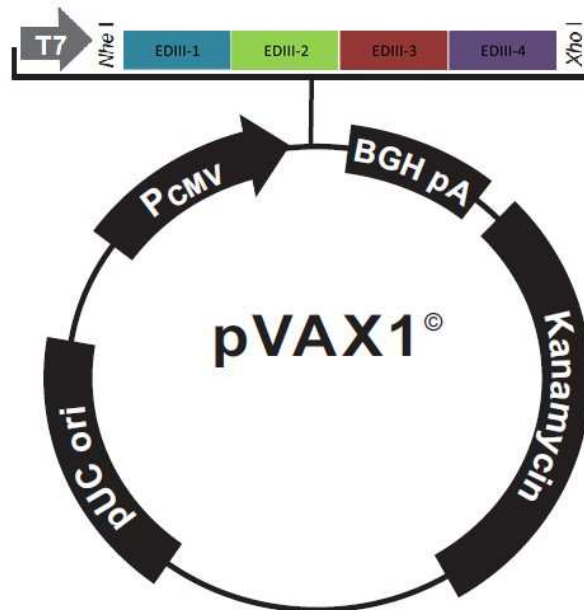


Figura 2. Esquema da construção do plasmídeo vacinal.

A análise do plasmídeo recombinante foi feita por PCR após a extração de DNA plasmidial da bactéria transformada. Na figura 3 observamos a amplificação do EDIII de cada um dos sorotipos com os respectivos primers específicos descritos na tabela 1. Na figura 4, podemos verificar a ordenação dos EDIII no plasmídeo vacinal de acordo com esquema proposto.

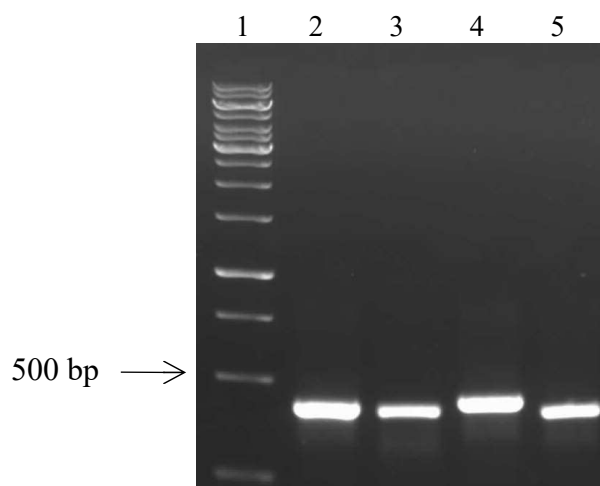


Figura 3. Análise do plasmídeo recombinante pVAX-EDIII1-4. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Coluna 1 marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb (Fermentas); coluna 2, EDIII-1 (425 bp); coluna 3, EDIII-2 (411 bp); coluna 4: EDIII-3 (435 bp) e coluna 5, EDIII-4 (400 bp).

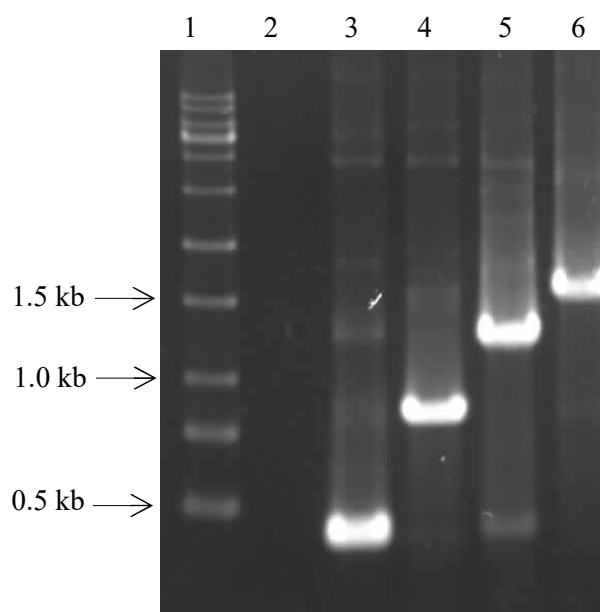


Figura 4. Análise do plasmídeo recombinante pVAX-EDIII1-4. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Coluna 1: Marcador de peso molecular 1 kb (Ludwig Biotec). Coluna 2: controle negativo pVAX com primers D1 DIII NheI e D4 DIII XhoI. Coluna 3: EDIII-1 (primers D1 DIII NheI e D1 DIII AflII) Coluna 4: EDIII 1-2 (primers D1 DIII NheI e D2 DIII KpnI). Coluna 5: EDIII 1-3 (primers D1 DIII NheI e D3 DIII PstI). Coluna 6: EDIII 1-4 (primers D1 DIII NheI e D4 DIII XhoI) .

EDIII1-4	GTAACAGAAAAGGACAGTCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCTCCATTTCGGAGACAGCTAC	705
contig	GTAACAGAAAAGATAGCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCTCCATTTCGGAGACAGCTAC	689
	***** ** ** *****	
EDIII1-4	ATCATCATAGGAGTGAACCCAGGACAATTGAAGCTGGACTGGTTCAAGAAAGGAAGTTCC	765
contig	ATCATCATAGGAGTAGAGCCGGACAATTGAAGCTCAACTGGTTTAAAGAAAGGAAGTTCT	749
	***** ** ** ***** ***** *****	
EDIII1-4	ATCGGCCAAATGTTTGAGACAACAATGAGGGGAGCGAAAAGAATGGCCATTTTGGGCGAG	825
contig	ATCGGCCAAATGTTTGAGGCAACAATGAGGGGAGCGAAGAGAATGGCCATTTTGGGCGAG	809
	***** ***** ***** *****	
EDIII1-4	GTA-----CCGGGAGCAATGCATACAGCACTGACAGGAGCT	861
contig	GTACCTCGCGAATGCATCTAGATTGTACCGGGAGCAATGCATACAGCACTGACAGGAGCT	869
	*** *****	
EDIII1-4	ACAGAGATCCAAACCTCAGGAGGCACAAGTATTTTGCGGGGCACTTAAATGTAGACTC	921
contig	ACAGAGATCCAAACCTCACGAGGCACAAGTATTTTGCGGGGCACTTAAATGTAGACTC	929
	***** *****	
EDIII1-4	AAGATGGACAAATTGAACTCAAGGGGATGAGCTATGCAATGTGCTTGAATACCTTTGTG	981
contig	AAGATGGACAAATTGAACTCAAGGGGATGAGCTATGCAATGTGCTTGAATACCTTTGTG	989

EDIII1-4	TTGAAGAAAGAAGTCTCCGAAACGCAGCATGGGACAATACTCATTAAAGTTGAGTACAAA	1041
contig	TTGAAGAAAGAAGTCTCCGAAACGCAGCATGGGACAATACTCATTAAAGTTGAGTACAAA	1049

EDIII1-4	GGGGAAGATGCACCCTGCAAGATTCCTTTCTCCACGGAGGATGGACAAGGGAAAGCTCAC	1101
contig	GGGGAAGATGCACCCTGCAAGATTCCTTTCTCCACGGAGGATGGACAAGGGAAAGCTCAC	1109

EDIII1-4	AATGGCAGACTGATCACAGCCAATCCAGTGGTGACCAAGAAGGAGGAGCCTGTCAACATT	1161
contig	AATGGCAGACTGATCACAGCCAATCCAGTGGTGACCAAGAAGGAGGAGCCTGTCAACATT	1169

EDIII1-4	GAGGCTGAACCTCCTTTTGGGAAAGTAATATAGTAATTGGAATTGGAGACAAAGCCCTG	1221
contig	GAGGCTGAACCTCCTTTTGGGAAAGTAATATAGTAATTGGAATTGGAGACAAAGCCCTG	1229

EDIII1-4	AAAATCAACTGGTACAGGAAGGGAAGCTCGATCTGCAGGGACTCCGGTGATGGAAATCAC	1281
contig	AAAATCAACTGGTACAGGAAGGGAAGCTCGATCTGCAGGGACTCCCGTGATGGAAATCAC	1289
	***** *****	
EDIII1-4	ATGTTTGCAGGACATCTTAAGTGCAAAGTC-CGTATGGAGAAATTGAGAATCAAGGGAAT	1340
contig	ACGTTTGCAGCACATCTCAAGTGCAAAGTCCTTATGGAGAAATTGAGAATCAAGGGAAT	1349
	* ***** ***** * *****	
EDIII1-4	GTCATACACGATGTGTTTCAGGAAAGTTTCAATTGACAAAGAGATGGCAGAAACACAGCA	1400
contig	GTCATACACGATGTGTTTCAGGAAAGTTTCAATTGACAAAGAGATGGCAGAAACACAGCA	1409

EDIII1-4	TGGGACAACAGTGGTGAAGTCAAGTATGAAGGTGCTGGAGCTCCGTGTAAGTCCCCAT	1460
contig	TGGGACAACAGTGGTGAAGTCAAGTATGAAGGTGCTGGAGCTCCGTGTAAGTCCCCAT	1469

EDIII1-4	AGAGATAAGAGATGTAACAAGGAAAAAGTGGTTGGGCGTATCATCTCATCCACCCTTT	1520
contig	AGAGATAAGAGATGTAACAAGGAAAAAGTGGTTGGGCGTATCATCTCATCCACCCTTT	1529

EDIII1-4	GGCTGAGAATACCAACAGTGTAAACCAACATAGAATTAGAACCCCTTTGGGGACAGCTA	1580
contig	GGCTGAGAATACCAACAGTGTAAACCAACATAGAATTAGAACCCCTTTGGGGACAGCTA	1589

```

EDIII1-4      CATAGTGATAGGTGTTGGAAACAGCGCATTAACTCCATTGGTTCAGGAAAGGGAGTTC      1640
contig        CATAGTGATAGGTGTTGGAAACAGCGCATAACATTCCCCCT-----            1629
*****      * * * * * * * * * *
EDIII1-4      CC          1642
contig        --          1629

```

Figura 5. Alinhamento no programa Clustal O entre o contig obtido a partir do sequenciamento e a construção predita do EDIII1-4.

5.2 CONSTRUÇÃO DOS ADJUVANTES GENÉTICOS E ANÁLISE DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

O RNA murino foi extraído a partir da medula óssea do fêmur. Após a extração de RNA e confecção do cDNA, as sequências dos genes das citocinas IL-7, IL-15 e GM-CSF foram amplificadas com primers específicos descritos na tabela 1 e clonados separadamente no pTZ57R/T. Após essa etapa, as sequências codificadoras dos genes das citocinas foram subclonadas no vetor de expressão pVAX1.

Após a transformação das bactérias, os plasmídeos recombinantes foram extraídos e analisados por PCR e por perfil de digestão com as enzimas de restrição usadas na subclonagem dos genes de interesse como mostrado nas figuras 6. Os produtos de PCR foram sequenciados e a análise no programa blastn (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mostrou que as sequências analisadas de GM-CSF, IL-7 e IL-15 apresentam 98, 97 e 99% de identidade com as sequências dessas citocinas no GenBank (números de acesso NM_009969.4, NM_008371.4 e NM_008357.2, respectivamente).

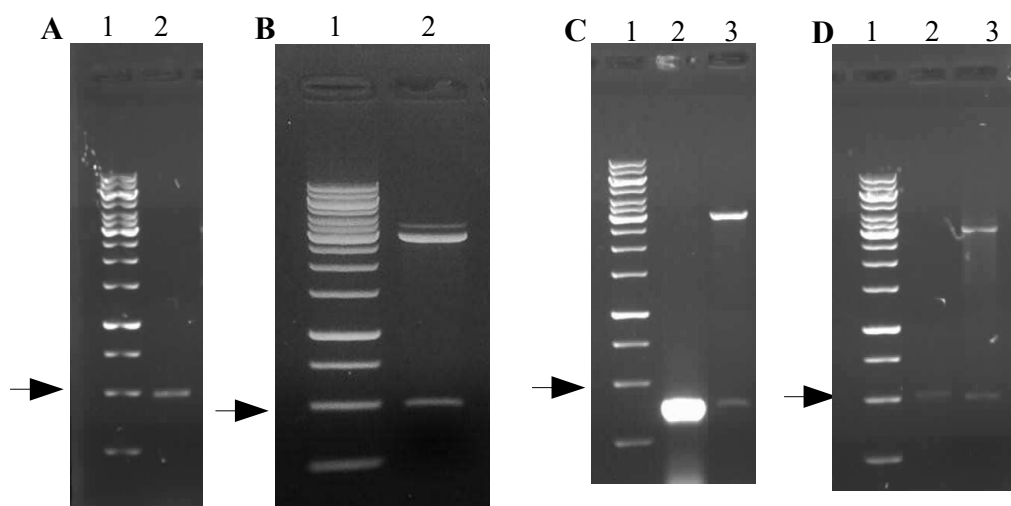


Figura 6. Análise dos plasmídeos recombinantes pVAX-IL7, pVAX-IL15 e pVAX-GMCSF. **A:** coluna 1: marcador de peso molecular 1 kb, coluna 2: amplificação do gene IL-7 (465 pb). **B:** coluna 1: marcador de peso molecular 1 kb, coluna 2: digestão do plasmídeo pVAX-IL7. **C:** coluna 1: marcador de peso molecular 1 kb, coluna 2: amplificação do gene GMCSF (368 pb), coluna 3: digestão do plasmídeo pVAX-GMCSF. **D:** coluna 1 marcador de peso molecular 1 kb, coluna 2: amplificação do gene IL-15 (489 pb), coluna 3: digestão do plasmídeo pVAX IL-15. A seta aponta a banda de 500 pb do marcador de peso molecular 1 kb (GeneRuler Fermentas Thermo Scientific)

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES *IN VITRO*

Após construção e confirmação dos plasmídeos usados nesse estudo, seguiu-se a análise da expressão desses plasmídeos *in vitro*. O plasmídeo pVAX-EDIII1-4 assim como os plasmídeos contendo os genes das citocinas foram transfectados em células Vero e analisados após 24 horas.

O plasmídeo vacinal tetravalente foi avaliado por imunofluorescência indireta e western blotting. No ensaio de western blotting (figura 7) foi possível verificar a presença de uma banda de aproximadamente 64 kDa, compatível com o peso molecular determinado *in silico* de 59,88 kDa da construção EDIII1-4, quando usado o anticorpo policlonal de cada um dos sorotipos virais (figura 7, A, B, C e D, poços 1). A banda detectada não é vista nas células transfectadas com o pVAX vazio. Essa diferença entre o peso molecular predito e o que foi observado no ensaio pode ser pela presença de resíduos glicosilados. A análise da sequência protéica predita de EDIII1-4 no programa NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>) mostra que os resíduos 2, 5, 8,

11, 15, 16, 19, 96, 285, 288, 292, 469, 504 podem ser glicosilados. Na figura 8, temos o resultado da imunofluorescência indireta onde podemos observar a marcação das células transfectadas com o pVAX-EDIII1-4 que não é observada nas células transfectadas com o vetor vazio. Em torno do núcleo das células transfectadas com o plasmídeo vacinal, é possível verificar um adensamento do sinal emitido por FITC, enquanto nas células transfectadas com o vetor vazio, temos apenas um background da marcação. Este mesmo padrão é observado nas células transfectadas com o plasmídeo vacinal quando utilizados os anticorpos policlonais anti-DENV-1, anti-DENV-2, anti-DENV-3 ou anti-DENV-4.

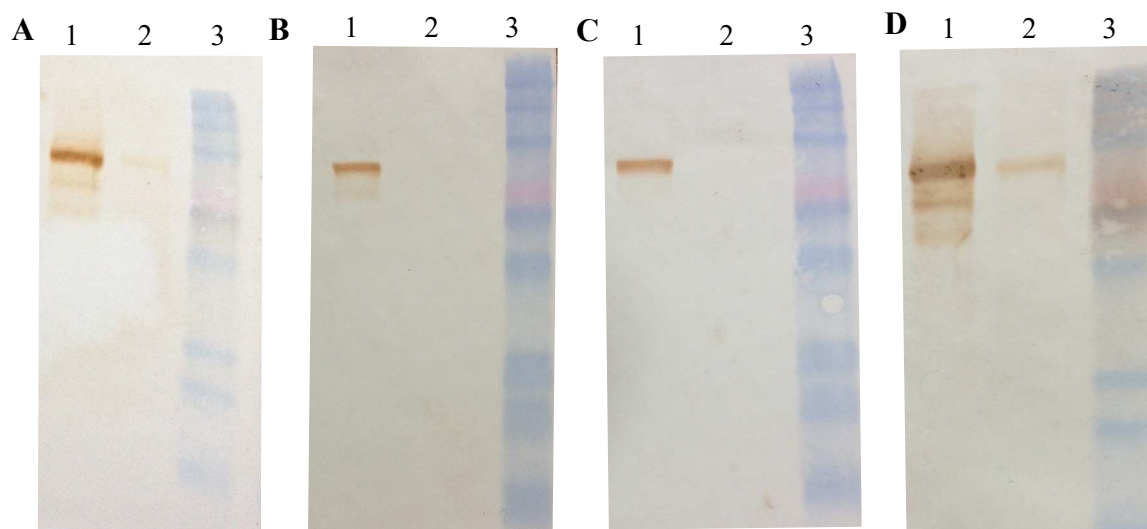


Figura 7. Análise da expressão *in vitro* do plasmídeo pVAX-EDIII1-4 por western blotting. Células Vero foram transfectadas com pVAX-EDIII1-4 (A, B, C e D, poços 1) e pVAX vazio (A, B, C e D, poços 2) e a expressão de EDIII1-4 foi detectada com o anticorpo policlonal específico contra cada um dos sorotipos dos vírus dengue (A: anti-DENV-1, B: anti-DENV-2, C: anti-DENV-3, D: anti-DENV-4). Marcador BenchMarker™ Pre-stained protein standard (Thermo Fisher Scientific) (A, B, C e D, poços 3, a banda rosa é de 64 kDa).

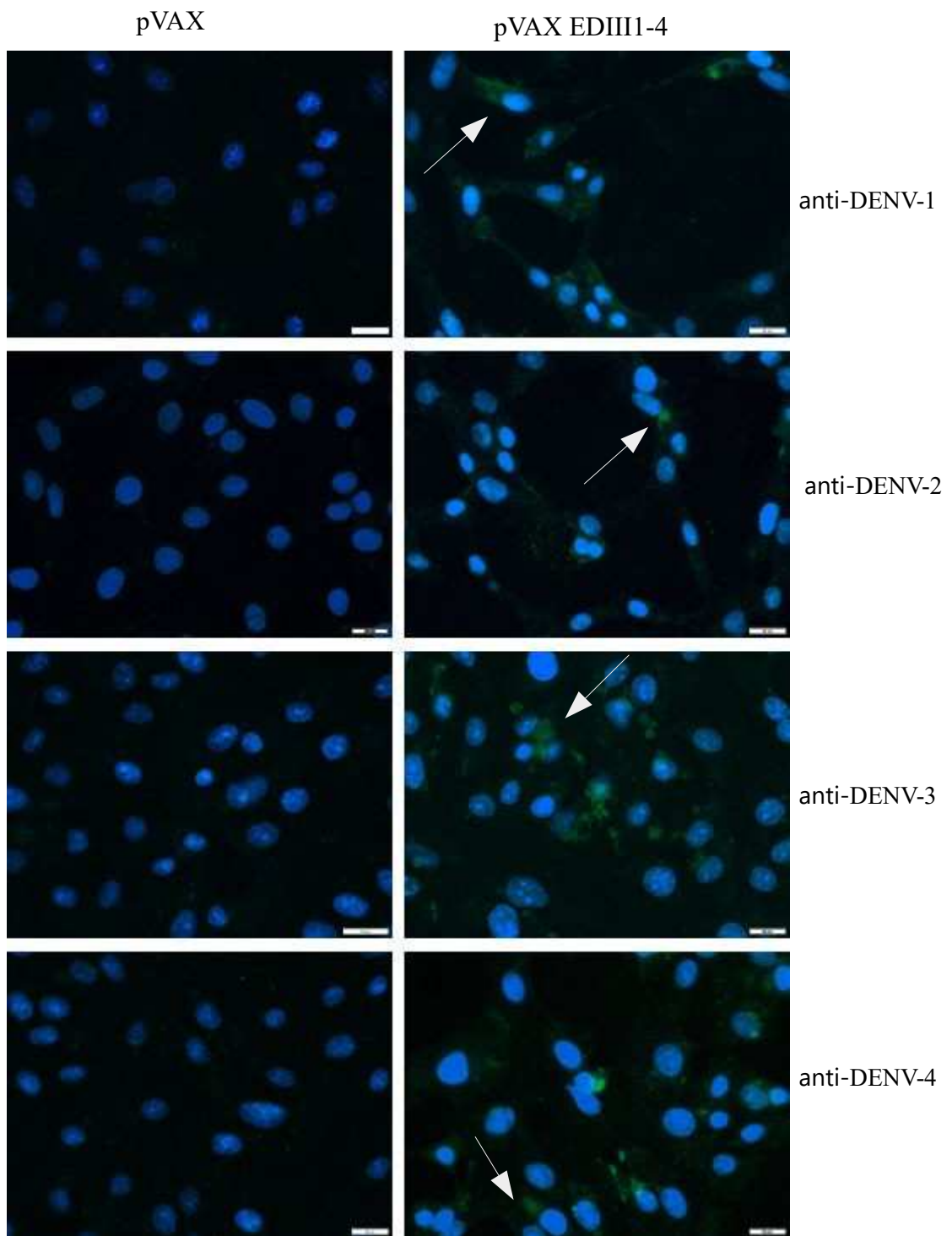


Figura 8. Análise da expressão *in vitro* do plasmídeo pVAX-EDIII1-4 por Imunofluorescência Indireta. As células foram transfectadas usando cloreto de cálcio com plasmídeo recombinante e pVAX vazio e após 24 horas foram fixadas, incubadas com anticorpo policlonal específico contra cada sorotipo dos vírus dengue e estes conjugados ao anticorpo marcado com FITC. Os núcleos foram contra-corados com DAPI. As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX35, fotografadas em câmara Olympus XM10 e adquiridas em software CellSens.

As células transfectadas com os plasmídeos correspondentes aos adjuvantes genéticos foram coletadas com reagente Purezol (Bio-Rad). Seguiu-se à extração de RNA e confecção do cDNA para análise da presença do mRNA correspondente a cada citocina por PCR. Uma análise qualitativa em gel de agarose, revelou a presença dos produtos de PCR correspondentes a cada um dos genes das citocinas, como visto na figura 9. Em A, B e C, nos poços 4 observa-se o fragmento amplificado correspondente ao mRNA de GM-CSF (369 pb), IL-7 (465 pb) e IL-15 (489 pb) respectivamente. Nos poços 2 de A, B e C não temos produtos de PCR como esperado pois as células foram transfectadas com o vetor vazio (controle negativo) e nos poços 3 de A, B e C observamos os produtos de PCR dos insertos dos plasmídeos correspondentes aos adjuvantes genéticos (controle positivo).

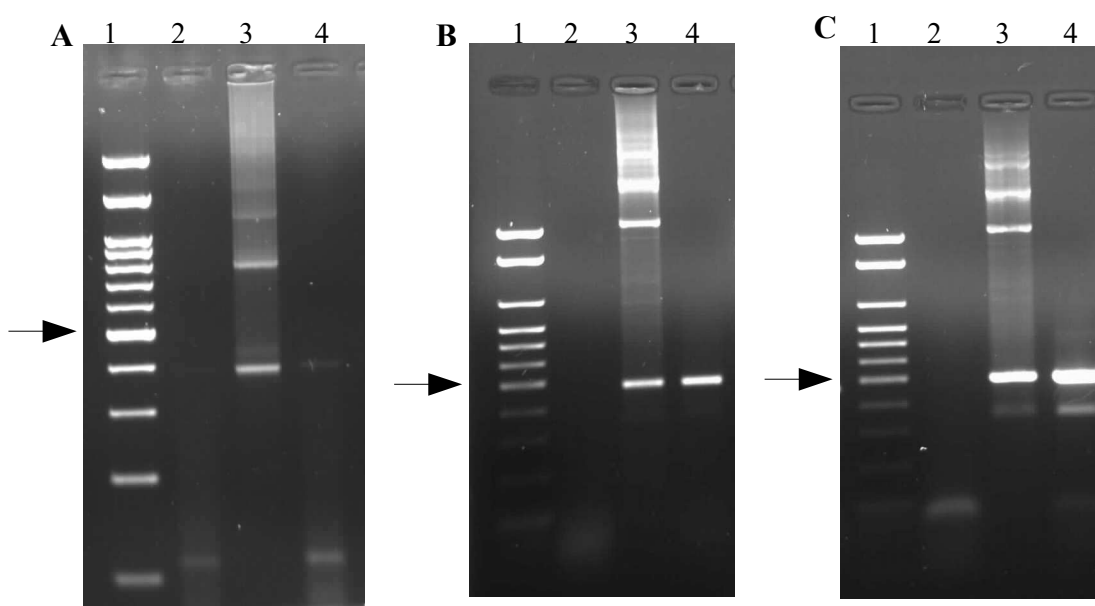


Figura 9. Análise da presença do mRNA correspondente às citocinas GM-CSF, IL-5, IL-15 nas células transfectadas com os plasmídeos pVAX-GMCSF, pVAX-IL7 e pVAX-IL15. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. O marcador de peso molecular 100 bp LowRanger (Norgen) está presente no poço 1 de A, B e C, a seta indica a banda de 500 pb.

5.4 ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE DO PLASMÍDEO VACINAL TETRAVALENTE EM ASSOCIAÇÃO COM ADJUVANTES GENÉTICOS

Os grupos experimentais foram definidos de acordo com a tabela 3. Foi feita a associação de cada adjuvante com o candidato vacinal tetravalente e alternativamente, dois adjuvantes com a vacina. Os parâmetros experimentais, as datas da coleta de sangue e do baço estão apresentados na tabela 4.

Tabela 3. Definição dos grupos experimentais

Grupo	Nome
1	pVAX
2	PVAX-EDIII1-4 (tetra)
3	pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7
4	pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL15
5	pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GMCSF
6	pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7
7	pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15

Tabela 4. Condições experimentais da avaliação da imunogenicidade

Total de grupos experimentais	7
Nº animais por grupo	4
Quantidade de DNA utilizada	100 µg por plasmídeo
Imunizações	Dias 0, 15 e 30
Via de inoculação	Intramuscular
Coleta de sangue	Dias 0, 15, 30 e 45
Coleta do baço	Dia 45

5.4.1 Linfoproliferação *in vitro*

O objetivo desse ensaio foi avaliar a capacidade do candidato vacinal pVAX-EDIII 1-4 bem como sua associação com os adjuvantes genéticos, em induzir uma resposta linfoproliferativa específica contra os vírus dengue. Para tal, o pool dos esplenócitos dos camundongos imunizados de cada grupo foi cultivado e estimulado

com 10 µg das proteínas prM e E de DENV-3 ou na presença de meio (controle negativo) ou concavanalina A (ConA, controle positivo).

Na figura 10, podemos observar que as imunizações com o candidato vacinal sozinho e em associação aos adjuvantes genéticos mostrou que estes foram capazes de induzir uma resposta linfoproliferativa contra as proteínas prM e E de DENV-3, sendo os esplenócitos oriundos dos grupos que receberam pVAX-EDIII1-4 (tetra) com pVAX-IL15, pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GMCSF e pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7 os que apresentaram maior proliferação quando re-estimulados *in vitro*. Os outros grupos imunizados apresentaram uma resposta linfoproliferativa uma pouco maior que o controle.

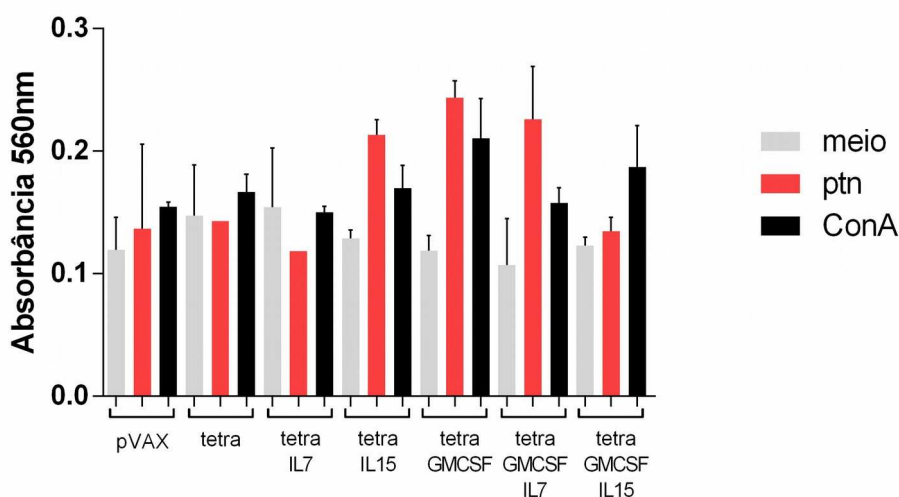


Figura 10. Linfoproliferação. O “pool” de esplenócitos de cada grupo imunizado com a vacina tetravalente (pVAX-EDIII1-4) sozinho ou em associação com os adjuvantes genéticos foi re-estimulado *in vitro* com 10 µg das proteínas prM e E de DENV-3 (barras vermelhas), apenas com meio (barras cinzas) ou 7,5 µg/mL de Concavanalina A (controle positivo, barras pretas)

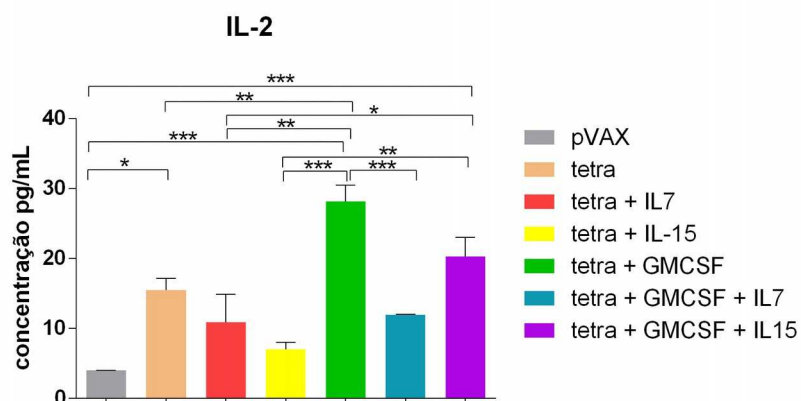
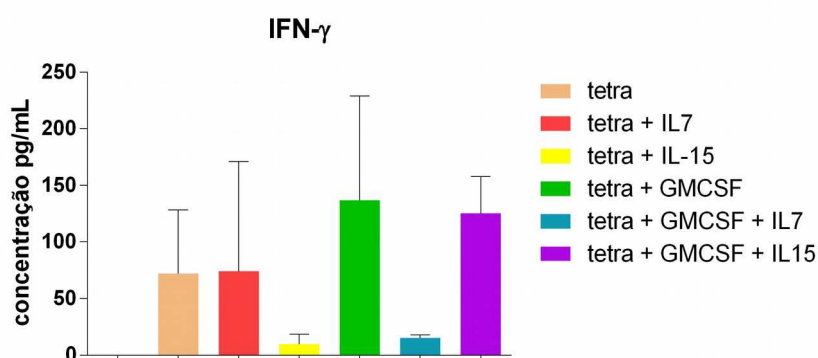
5.4.2 Dosagem das citocinas

O sobrenadante da cultura de linfócitos foi recuperado por centrifugação para dosagem das citocinas produzidas a partir da re-estimulação *in vitro* dos linfócitos. Podemos observar que os diferentes grupos experimentais não tiveram uma resposta uniforme em relação a um padrão de resposta do tipo Th1 ou Th2 (Figura 11, Tabela 5). O grupo que recebeu apenas o plasmídeo vacinal pVAX-EDIII1-4, produziu IL-10 (84,23 pg/mL) e IL-6 (58,47 pg/mL) em quantidade próxima às citocinas do padrão Th1

INF- γ (71,98 pg/mL) e TNF (58,93 pg/mL), e a razão entre a produção dessas citocinas (INF- γ /IL-10) mostra um desvio para o padrão Th2. O grupo imunizado com pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7 produziu em maior quantidade IFN- γ (74,23 pg/mL) sendo a quantidade produzida das citocinas TNF (39,61 pg/mL), IL-6 (41,86 pg/mL), IL-10 (38,10pg/mL) aproximadas, a razão INF- γ /IL-10 calculada demonstra que esse grupo tem o maior desvio para o padrão Th1. O grupo vacinado com pVAX-EDIII 1-4 e pVAX-IL-15 produziu quantidades aproximadas de IL-6 (40,84 pg/mL) e IL-10 (38,52 pg/mL) sendo estas maiores que a produção de TNF (28,56 pg/mL) e IFN- γ (9,91 pg/mL), mostrando uma tendência a produção de citocinas do padrão Th2. O grupo experimental que foi imunizado com os plasmídeos pVAX-EDIII 1-4 e pVAX-GMCSF produziu em maior quantidade a citocina INF- γ (136,87 pg/mL), sendo a produção de IL-6 (81,97 pg/mL) e IL-10 (81,35 pg/mL) muito próximas, a razão INF- γ /IL-10 demonstra um desvio para o padrão Th1. O grupo que foi imunizado com o plasmídeo vacinal e os plasmídeos pVAX-GMCSF e pVAX-IL7 produziu maior quantidade das citocinas do padrão Th2 IL-6 (52,21 pg/mL) e IL-10 (61,66 pg/mL) que as citocinas do padrão Th1 TNF (38,29 pg/mL), INF- γ (15,08 pg/mL) e IL-2 (11,96 pg/mL). O grupo que foi imunizado com o plasmídeo vacinal e os adjuvantes pVAX-GMCSF e pVAX-IL15 produziu maior quantidade da citocina TNF (102,59 pg/mL) entre todos os grupos, e a segunda maior produção de INF- γ (125,22 pg/mL) entre os grupos experimentais. Este mesmo grupo produziu a maior quantidade de IL-10 (114,79 pg/mL) seguida da segunda maior produção IL-6 (77,88 pg/mL) entre os grupos experimentais, a razão INF- γ /IL-10 de 1,09 mostra que a produção de citocinas Th1 é muito próxima àquelas do padrão Th2. A produção de IL-2 em todos os grupos foi em pequena quantidade variando de 7,04 pg/mL no grupo que recebeu o plasmídeo vacinal e pVAX-IL15 a 28,17 pg/mL no grupo que foi imunizado com o plasmídeo pVAX-EDIII 1-4 e pVAX-GMCSF. Não houve produção de IL-4 em nenhum grupo experimental. A razão IFN- γ /IL-10 (tabela 3) indica que 2 grupos tem uma resposta polarizada para o padrão Th1: pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL-7, pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GMCSF.

Tabela 5. Produção de citocinas (pg/mL) nos grupos experimentais.

	TNF	IFN- γ	IL-2	IL-6	IL-10	IFN- γ /IL-10
pVAX	33,4	0	4	32,29	34,23	0
tetra	58,93	71,98	15,49	58,47	84,23	0,85
tetra + IL7	39,61	74,23	10,88	41,86	38,52	1,92
tetra + IL15	28,56	9,91	7,04	40,84	38,52	0,25
tetra + GMCSF	49,92	136,87	28,17	81,97	81,35	1,68
tetra + GMCSF+ IL7	38,29	15,08	11,96	52,21	61,66	0,24
tetra + GMCSF + IL15	102,59	125,22	20,31	77,88	114,79	1,09



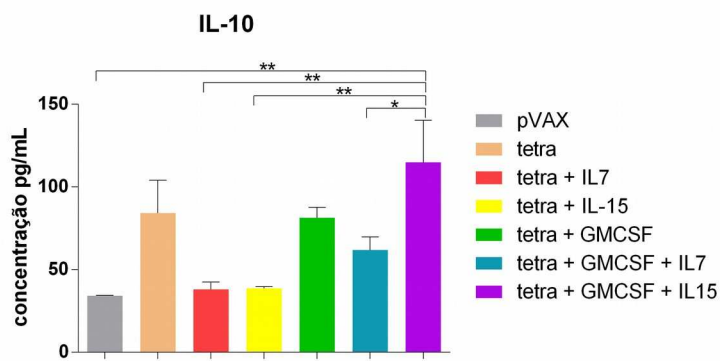
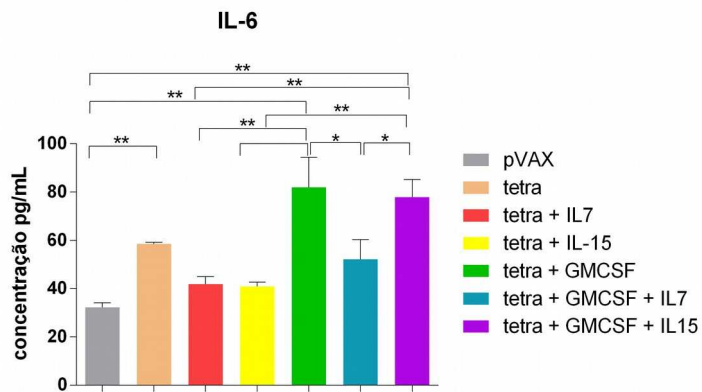
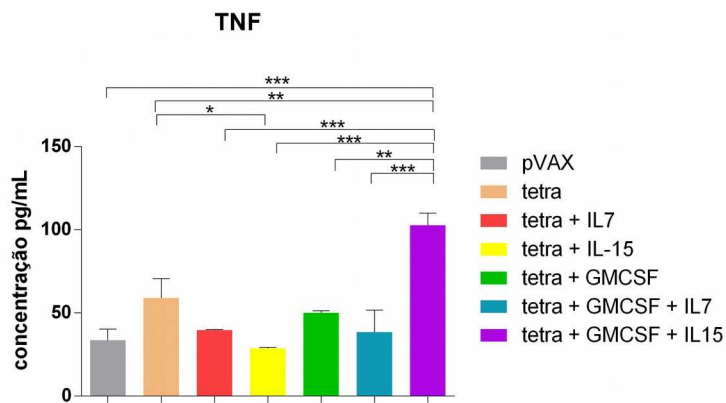


Figura 11. Dosagem da produção de citocinas a partir do sobrenadantes oriunda da re-estimulação *in vitro* do pool dos esplenócitos dos animais vacinados. A produção de citocina foi medida com o BD™ Cytometric Bead Assay Mouse Th1/Th2/Th17 kit seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences) e analisadas no software FCAP Array™ v3.0.1.

5.4.3 Imunofenotipagem das subpopulações de linfócitos

Os linfócitos dos animais vacinados foram marcados com anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD44 e anti-CD62L e os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences). Os dados foram analisados no programa FlowJo X 10.0.7 seguindo o fluxograma de análise mostrado na figura 12.

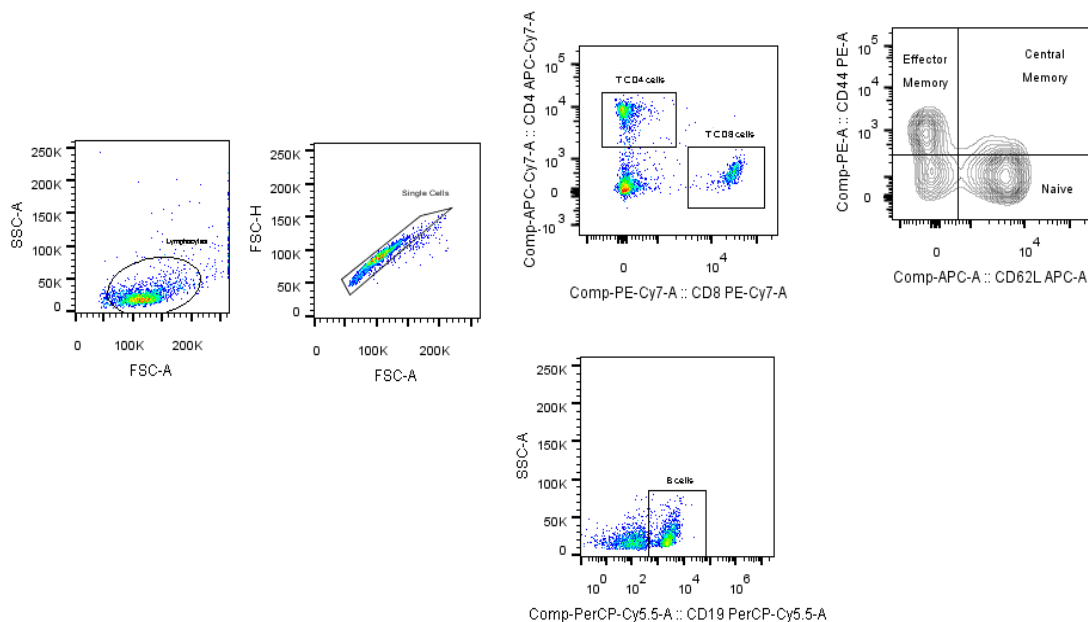


Figura 12. Fluxograma de análise utilizado na determinação das subpopulações de linfócitos.

A análise das subpopulações de linfócitos demonstrou um pequeno aumento na quantidade de células B nos grupos vacinados com o pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GMCSF e pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15, mas não foi um aumento estatisticamente significativo. Também foi observado um pequeno aumento na subpopulação de células T CD4 no grupo imunizado com pVAX-EDIII1-4 e GMCSF em relação ao controle, grupo imunizado com o pVAX. Na subpopulação de células T CD8 pode-se observar um discreto aumento no grupo imunizado com pVAX-EDIII 1-4 e pVAX-IL7. Observa-se um aumento na subpopulação de linfócitos T CD8 CD44⁺ CD62L⁻ (T_{EM} - memória efetora) em relação ao controle no grupo que recebeu pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7 bem como no grupo imunizado com pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7. Em relação à memória central (T_{CM} - CD44⁺ CD62L⁺) T CD4 e T CD8 o maior aumento se deu no grupo imunizado com pVAX-EDIII1-4, pVAX-

GMCSF e pVAX-IL15. Este aumento é estatisticamente significativo entre as células T CD4 CD44⁺ CD62L⁺ em relação ao grupo controle (pVAX). As células naïve T CD4 e T CD8 também estão aumentadas no grupo que foi imunizado com pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15, sendo esta diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o controle em ambas subpopulações (Figura 13).

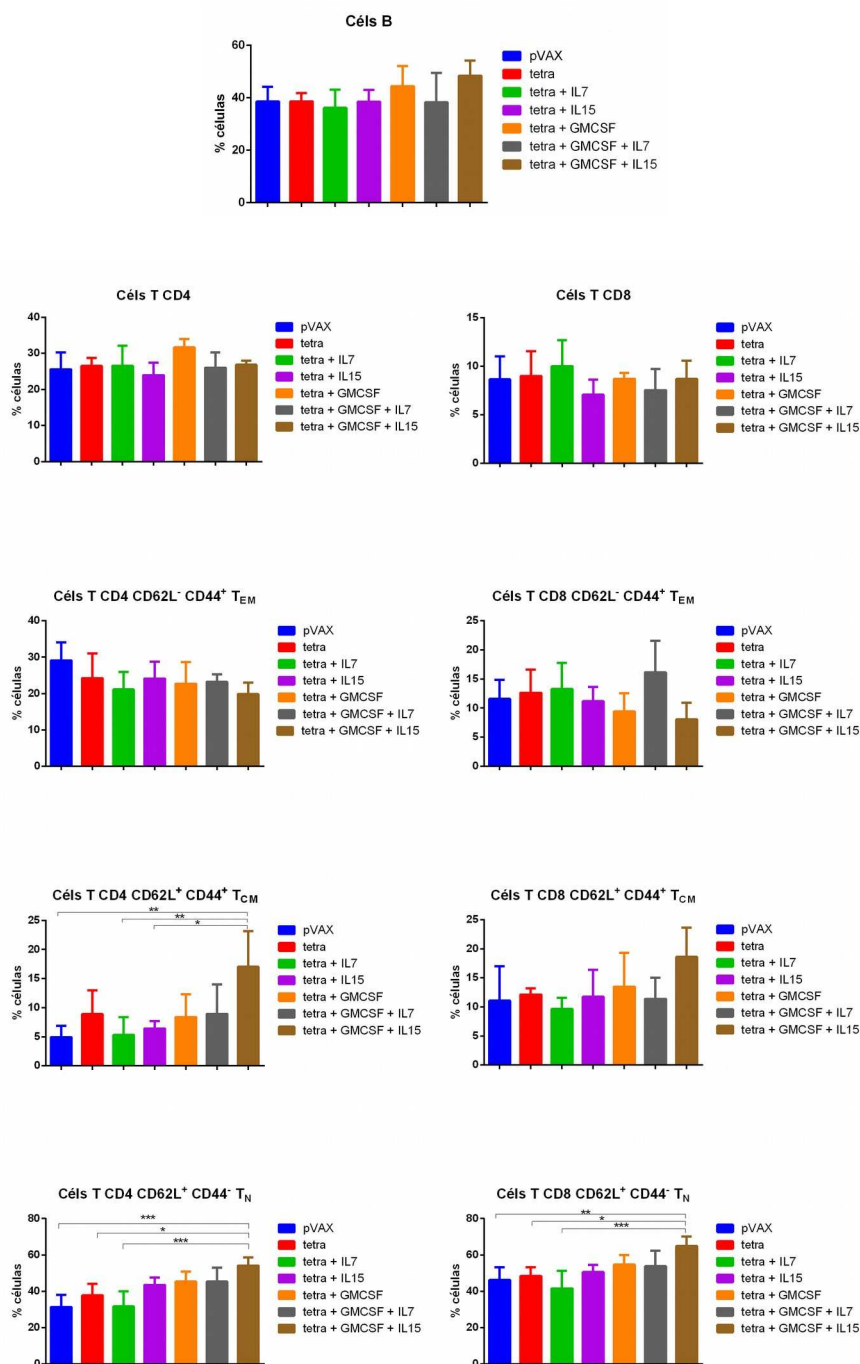


Figura 13. Imunofenotipagem dos linfócitos T. Os dados representam a média da porcentagem dos linfócitos dos indivíduos de cada grupo experimental.

5.4.4 Ensaio de neutralização *in vitro* (PRNT)

Neste ensaio, o soro dos animais vacinados quinze dias após a última imunização foi utilizado neste ensaio. O soro foi diluído de 1:2 até 1:1024 e usado para neutralizar 100 PFU dos vírus DENV-1, DENV-3 e DENV-4. Nas figuras 14, a média do percentual de neutralização de todas as diluições utilizadas está representada. Podemos observar que para todos os grupos experimentais houve um percentual de neutralização alto, todos acima de 50% e por isso o título do PRNT 50 não pode ser determinado. Ao comparar a capacidade dos diferentes adjuvantes utilizados em induzir a neutralização dos vírus, podemos observar que não há uma resposta de um mesmo adjuvante para os sorotipos virais utilizados. A neutralização de DENV-1 foi maior no grupo imunizado com pVAX-EDIII1-4, seguido do grupo que recebeu pVAX-EDIII1-4 e pVAX-GMCSF. O ensaio realizado com DENV-3 mostrou que houve maior neutralização com os grupos imunizados com pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7 e pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF pVAX-IL7. Já a neutralização de DENV-4, foi maior nos grupos que receberam pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL15 e pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15.

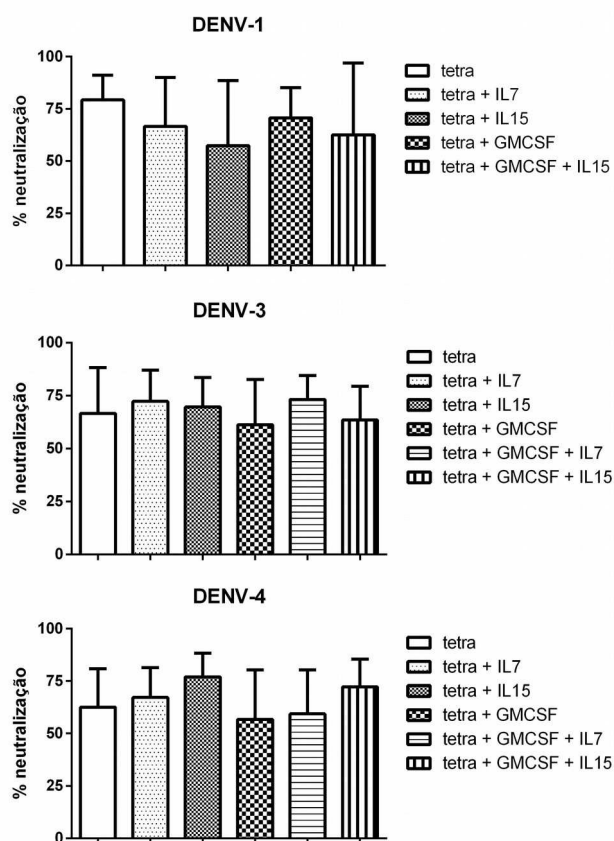
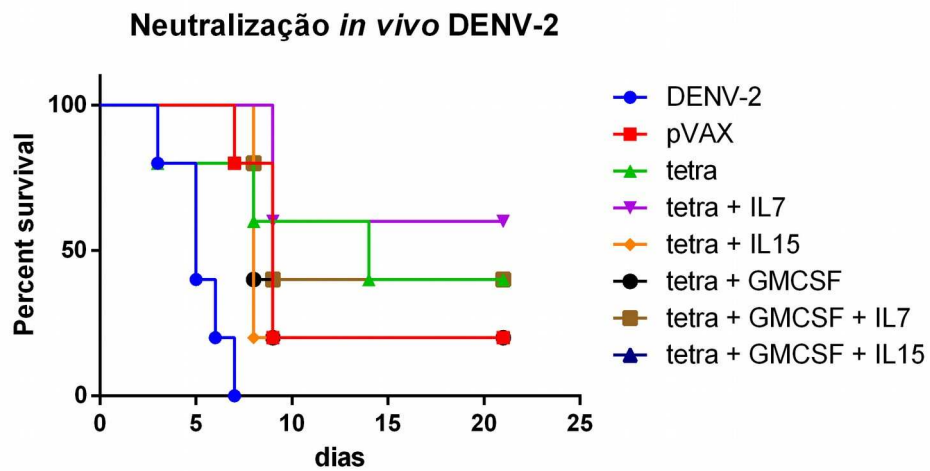


Figura 14. Ensaio de neutralização *in vitro* (PRNT)

5.4.5 Ensaio de neutralização *in vivo*

A figura 15 mostra o resultado do ensaio de neutralização *in vivo* que demonstrou que o soro dos animais previamente vacinados foi capaz de proteger os animais no desafio contra os vírus DENV-2 por via intracerebral. Observou-se 60% de proteção nos animais que tiveram o vírus neutralizado com o soro dos animais vacinados com o plasmídeo vacinal e pVAX-IL7; 40% de proteção nos animais que tiveram o vírus neutralizado pelo soro dos animais vacinados com o pVAX-EDIII1-4, pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7 assim como no grupo que recebeu os plasmídeos pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15. Na neutralização *in vivo* com DENV-1, a dose utilizada no grupo controle (DENV-1) não matou todos os animais, apenas 50% mas podemos observar que o grupo que recebeu o plasmídeo vacinal e pVAX-IL7 a sobrevivência foi de 80% e de 60% nos grupos que receberam apenas o pVAX-EDIII 1-4, pVAX-EDIII 1-4 e pVAX-GMCSF, pVAX-EDIII 1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL7 e pVAX-EDIII 1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL15.



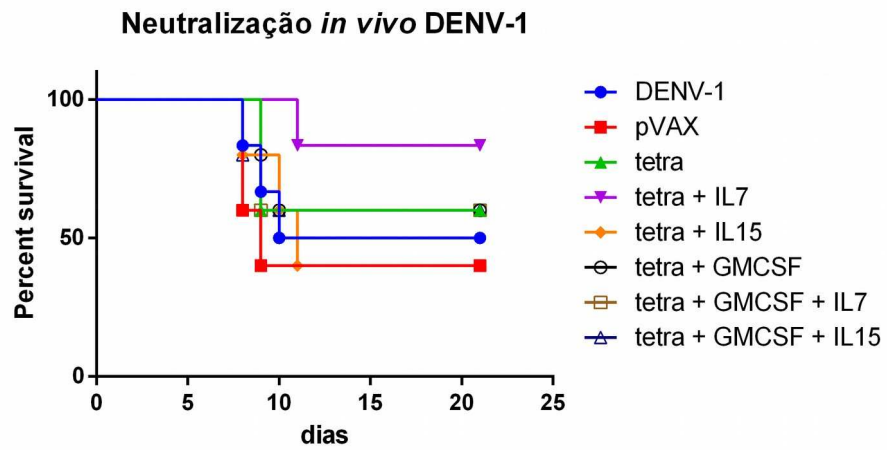


Figura 15. Neutralização *in vivo*. O soro dos animais previamente vacinados, 45 após a última imunização, foi misturado em igual volume a quantidade de vírus correspondente a dose letal para 100% dos indivíduos e incubado a 37°C por 1h. 10 µL dessa mistura foi inoculada por via intracerebral em animais com 5 dias de vida. Os animais foram observados por 21 dias.

6 DISCUSSÃO

A dengue é uma doença que apresenta números crescentes de casos nas últimas décadas. Além disso, a área de risco de infecção tem se expandido e a co-circulação dos quatro sorotipos do vírus é uma realidade nas áreas endêmicas. Atualmente, os esforços para controlar a doença estão centrados no combate ao vetor *Aedes aegypti* e essa estratégia tem se mostrado ineficiente. Nesse contexto, o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra dengue é essencial para a prevenção e controle da doença, sendo o objetivo de diversos grupos de pesquisa em todo o mundo.

A vacina tetravalente desenvolvida neste trabalho consiste de um vetor de expressão pVAX contendo o DIII da proteína E dos quatro sorotipos virais. As funções desempenhadas pela proteína E na adsorção e fusão de membrana, essenciais à infecção viral, fazem dela um alvo potencial para vacina. Vários candidatos vacinais têm usado o domínio III da proteína E dos vírus dengue em suas formulações. Chen e colaboradores (2007) usaram uma proteína recombinante com os quatro EDIII separados por um linker de oligonucleotídeos com o objetivo de imunizar camundongos e avaliar a produção de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos. Eles demonstraram que a produção de anticorpos neutralizantes para os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 foi mais expressiva que DENV-3. Essa diferença refletiu-se no ensaio de proteção em camundongos neonatos (neutralização *in vivo*) em que a proteção foi de 70% para DENV-1, DENV-2 e DENV-4 e 18% para DENV-3. A opção de acrescentar um linker entre o DIII dos sorotipos virais não conferiu nenhuma vantagem na expressão de EDIII, podendo até mesmo ter promovido um dobramento que escondeu EDIII-3, o que se refletiu nos resultados apresentados. Ramanathan e colaboradores (2009) usaram uma vacina de DNA com os quatro EDIII separados por sítios de clivagem proteolítica para induzir a produção de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos virais. O trabalho mostra que o EDIII dos quatro sorotipos foi expresso em bactérias mas após a vacinação do plasmídeo contendo a construção universal (pDV-U DIII), houve maior produção de anticorpos neutralizantes contra DENV-2 e DENV-4 e menor produção contra DENV-3 e DENV-1. Estes dados demonstram que a escolha por espaçadores ou sítios de clivagem proteolítica entre o EDIII dos sorotipos virais que, em teoria, favorecem a expressão igualitária dos mesmos, não garante uma resposta imune equilibrada contra os diferentes sorotipos virais. Os nossos resultados demonstram que o plasmídeo vacinal expressou o EDIII dos diferentes sorotipos e que a opção por uma construção *in tandem* não interferiu nesse resultado. O anticorpo policlonal contra os

quatro sorotipos virais foi capaz de reconhecer a proteína expressa nas células transfectadas com o plasmídeo pVAX-EDIII1-4. Assim como apontado nesses trabalhos, observou-se produção de anticorpos neutralizantes contra DENV-1, DENV-3 e DENV-4 em decorrência da imunização dos animais vacinados com pVAX-EDIII1-4, em níveis aproximados como mostrado pelo ensaio de neutralização *in vitro* (PRNT) e proteção dos animais testados no ensaio de neutralização *in vivo*.

Estes e outros trabalhos (BLOCK et al., 2010; ETEMAD et al., 2008, KHANAM et al., 2009) corroboram que o EDIII seja um bom candidato vacinal capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes e a proteção aos animais quando desafiados; entretanto, essa resposta não é equilibrada entre os diferentes sorotipos. Até mesmo a vacina aprovada para comercialização desenvolvida pela Sanofi-Pasteur que usa um arcabouço da vacina de febre amarela 17D, um vírus vivo atenuado e substitui a sequência de prM/E desta linhagem pela sequência correspondente de prM/E de cada sorotipo do vírus dengue, usando na imunização uma formulação com quatro vírus diferentes mostrou que apesar de induzir anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos, a proteção contra a infecção de DENV-2 foi de apenas 9,2% e para os outros sorotipos foi superior a 50% (SABCHAREON et al., 2012). Trabalhos posteriores sobre essa vacina mostraram uma eficácia de 56,5% e 60,8% contra a doença em ensaio clínico de fase III na Ásia e América Latina, respectivamente. A proteção específica da vacina para os diferentes sorotipos virais variou nesses ensaios (VILLAR et al., 2014; CAPEIDING et al., 2014).

A busca de adjuvantes compatíveis com vacinas de DNA tem sido uma constante. Pelo seu papel desempenhado na sobrevivência e homeostase nas células de memória CD4 e CD8, IL-7 e IL-15 tem sido utilizada como adjuvantes. Diversos trabalhos mostram que ambas as citocinas usadas como adjuvantes podem auxiliar a resposta imune. Park e colaboradores, (2010) utilizaram uma vacina de DNA multigênica contra HCV (Hepatitis C virus) em associação com um plasmídeo contendo o gene humano de IL-7 em macacos *Cynomolgus*. A resposta de células T foi maior no grupo imunizado com IL-7 em relação ao grupo controle e ao grupo imunizado sem o adjuvante IL-7. Além disso, a resposta imune iniciou-se antes, já a partir da segunda dose, daquela vista no grupo imunizado apenas com a vacina multigênica. Houve aumento também na quantidade de anticorpos anti-E2 produzidos no grupo imunizado com a vacina multigênica e p-hIL-7. Os nossos dados também apontam que pVAX-IL7 aumentou a quantidade de células T CD8 após as imunizações.

Em outro estudo, Su e colaboradores (2012) demonstraram que o uso de plasmídeos contendo os genes de IL-7 ou IL-15 com uma vacina de DNA contendo o gene VP1 de FMDV (*foot-mouth disease virus*) como reforço da dose inicial feita com a vacina e um plasmídeo expressando IL-6 foi capaz de induzir aumento da resposta celular e humoral, maturação de células dendríticas e macrófagos e aumentar a frequência de células de memória T CD4 em camundongos. Os nossos dados mostram que o grupo imunizado com a vacina e os adjuvantes pVAX-GMCSF e pVAX-IL15 teve maior aumento nas células de memória central tanto CD4 como CD8.

Assim como IL-15 e IL-7, GM-CSF tem sido bastante avaliada quanto a sua capacidade de auxiliar a resposta imune de vacinas de DNA. Um estudo comparativo sobre a capacidade adjuvante de diferentes citocinas e quimiocinas a uma vacina de DNA contra HIV revelou que entre as citocinas testadas, GM-CSF aumentou a proliferação de células T antígeno-específica e aumentou a proporção de células T CD8 antígeno-específica. Ainda demonstrou que a associação de GM-CSF e IL-12 à vacina de DNA aumentou a proliferação de células T CD4 antígeno-específicas e melhorou a proteção de camundongos no experimento de desafio (XU et al., 2008). Outro estudo realizado por Chen e colaboradores (2015) observou um efeito variável de GM-CSF usado como adjuvante de vacinas de DNA contra DENV ou HCV. Quando um plasmídeo contendo o gene de GMCSF foi usado em associação com uma vacina de DNA contendo os genes prM e E de DENV-1 ou DENV-2, houve menor produção de anticorpos e menor sobrevivência no ensaio de proteção quando comparado ao grupo que recebeu apenas a vacina sem adjuvante. Já quando o adjuvante foi associado a uma vacina de DNA contendo o gene E1 de HCV foi mais eficiente em induzir a produção de anticorpos quando comparado ao grupo que recebeu apenas a vacina. Esses e outros trabalhos corroboram os nossos dados que mostram que os adjuvantes testados modificaram a resposta imune induzida por pVAX-EDIII1-4.

As vacinas de DNA são especialmente capazes de aumentar células T CD8⁺ (BĚLÁKOVÁ et al., 2007). Os dados obtidos na imunofenotipagem mostram um discreto aumento nessa subpopulação de células no grupo imunizado com o pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7 em relação ao grupo controle (pVAX). Nenhuma outra subpopulação de linfócitos se destaca neste grupo experimental. Mas é também nesse grupo que observamos a maior polarização na produção de citocinas para o padrão Th1 dada pela razão IFN- γ /IL-10. Corroborando esses resultados, o soro desses animais foi o

que melhor neutralizou DENV-1 e DENV-2 nos ensaios de proteção, resultando em maior sobrevivência nos animais testados.

Outro grupo experimental que se destacou foi aquele imunizado com pVAX-EDIII1-4, pVAX-GMCSF e pVAX-IL-15. Os linfócitos B, T_{CM} CD4, T_{CM} CD8, T_N CD4 e T_N CD8 nesse grupo estão em maior quantidade quando comparados aos outros grupos. A razão IFN- γ /IL-10 nesse grupo indica uma polarização para uma resposta Th1, embora menor que o grupo pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL-7 e tiveram segundo melhor resultado de sobrevivência no ensaio de neutralização *in vivo*. Provavelmente a boa performance no ensaio de neutralização *in vivo* desses dois grupos destacados deva-se pela resposta de células T e polarização na produção de citocinas para o perfil Th1. De acordo com esses dados, Zellweger e colaboradores (2013) demonstraram que a resposta de células T é essencial à proteção de camundongos contra DENV-2 e que este ramo da resposta imune deve ser alvo das estratégias de vacinação.

Mesmo com a aprovação de uma vacina contra dengue, o problema ainda não está totalmente resolvido. Com a recente introdução do ZIKV no Brasil e outros países (<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/9-june-2016/en/>) a vacina de dengue tem que ser pensada à luz dessa nova realidade. Paul e colaboradores (2016) mostraram que anticorpos anti-DENV (anticorpos monoclonais contra o peptídeo de fusão da proteína E de DENV-2) reconhecem a proteína E de ZIKV. Estes anticorpos que neutralizam os quatro sorotipos de DENV não neutralizaram a infecção por ZIKV em células LLC-MK2 e ainda, aumentaram a infecção por ZIKV em mais de 100 vezes em células K562 com FcR, um ensaio que simula ADE. O soro de quatro pacientes que se recuperaram de infecção por dengue também foi testado a fim de saber se haveria aumento da infecção por zika. Todos os soros anti-DENV, neutralizaram a infecção por DENV mas apenas dois soros neutralizaram a infecção por ZIKV e todos os soros testados aumentaram a infecção de ZIKV em células com FcR.

A determinação de quais anticorpos podem efetivamente aumentar a infecção por ZIKV pode mudar a abordagem para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue. Anticorpos com atividade sorotipo-específica contra DENV, como proposto para os anticorpos contra DIII e que seja também espécie-específicos podem garantir que não haja reação cruzada, sendo necessário ainda avaliar a participação desses anticorpos na ADE. Esta região parece ter maiores diferenças entre ZIKV e outros flavivírus (KOSTYUCHENKO et al., 2016).

A busca de adjuvantes compatíveis com vacinas de DNA não pode ser abandonada, mesmo com resultados variando entre os diferentes estudos. O que já se pode demonstrar é que essa estratégia pode melhorar a resposta de uma vacina de DNA e os mecanismos pelos quais essa resposta é diferente para um mesmo adjuvante precisam ser elucidadas.

7 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- A vacina de DNA tetravalente expressa o DIII de quatro sorotipos virais;
- O mRNA correspondente às citocinas IL-7, IL-15 e GM-CSF foi detectado em células transfectadas com os plasmídeos recombinantes;
- A vacina tetravalente foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes e proteção no ensaio de neutralização *in vivo*;
- Os adjuvantes testados aumentaram a resposta imune da vacina de DNA tetravalente;
- A imunização com pVAX-EDIII1-4 e pVAX-IL7 aumentou a quantidade de células T CD8, houve polarização da resposta imune para padrão Th1 e melhor protegeu os animais no ensaio de neutralização *in vivo*

8 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para a continuação desse trabalho, podemos tentar aumentar a quantidade de anticorpos a serem produzidos na imunização com a vacina tetravalente alterando o esquema de imunização e aplicar reforços com EDIII dos quatro sorotipos produzidos em sistema de expressão heterólogo. Desse modo, podemos aumentar a resposta humoral e preservar a boa resposta celular observada nessa estudo, principalmente com o uso do adjuvante pVAX-IL7. Adicionalmente podemos associar este adjuvante a outras vacinas de DNA existentes no nosso laboratório. Também podemos testar a capacidade EDIII1-4 em testes diagnóstico de dengue.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BĚLÁKOVÁ, J.; HORYNOVÁ, M.; K\VRUPKA, M.; WEIGL, E.; RAŠKA, M. DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future? **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 6, p. 387–398, 2007.
- BELTRAMELLO, M.; WILLIAMS, K. L.; SIMMONS, C. P.; et al. The Human Immune Response to Dengue Virus Is Dominated by Highly Cross-Reactive Antibodies Endowed with Neutralizing and Enhancing Activity. **Cell Host & Microbe**, v. 8, n. 3, p. 271–283, 2010.
- BLOCK, O. K. T.; RODRIGO, W. W. S. I.; QUINN, M.; et al. A tetravalent recombinant dengue domain III protein vaccine stimulates neutralizing and enhancing antibodies in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 51, p. 8085–94, 2010. Elsevier Ltd.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 3, p. 1–10, 2016a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 20, p. 1–10, 2016b.
- CAPEDING, M. R.; TRAN, N. H.; HADINEGORO, S. R. S.; et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: A phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1358–1365, 2014. Elsevier Ltd.
- CHEN, H.; GAO, N.; WU, J.; et al. Variable effects of the co-administration of a GM-CSF-expressing plasmid on the immune response to flavivirus DNA vaccines in mice. **Immunology Letters**, v. 162, n. 1, p. 140–148, 2015. Elsevier B.V.
- CHEN, S.; YU, M.; JIANG, T.; et al. Induction of tetravalent protective immunity against four dengue serotypes by the tandem domain III of the envelope protein. **DNA and cell biology**, v. 26, n. 6, p. 361–7, 2007.
- CHEN, S.-T.; LIN, Y.-L.; HUANG, M.-T.; et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 672–676, 2008.
- CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; HILEMAN, R. E.; et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 866–871, 1997.
- COSTA, S. M.; AZEVEDO, A. S.; PAES, M. V.; et al. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene : The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. , v. 358, p. 413–423, 2007.
- 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. , v. 75, n. 16, p. 7769–7773, 2001.

- DICK, O. B.; SAN MARTÍN, J. L.; MONTOYA, R. H.; et al. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–593, 2012.
- DONNELLY, J. J.; WAHREN, B.; LIU, M. A. DNA Vaccines: Progress and Challenges. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 2, p. 633–639, 2005.
- EEMAD, B.; BATRA, G.; RAUT, R.; et al. An envelope domain III-based chimeric antigen produced in *Pichia pastoris* elicits neutralizing antibodies against all four dengue virus serotypes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 3, p. 353–63, 2008.
- GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA V ACCINES : Immunology , Application , and Optimization. **Annual review of immunology**, v. 18, p. 927–974, 2000.
- GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 33–42, 2002. Elsevier.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4839, p. 476–81, 1988.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. , v. 3, n. 4, p. 376–396, 1990.
- HO, L. J.; WANG, J. J.; SHAIQ, M. F.; et al. Infection of Human Dendritic Cells by Dengue Virus Causes Cell Maturation and Cytokine Production. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1499–1506, 2001.
- JESSIE, K.; FONG, M. Y.; DEVI, S.; LAM, S. K.; WONG, K. T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 2004.
- KHANAM, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. Induction of neutralizing antibodies and T cell responses by dengue virus type 2 envelope domain III encoded by plasmid and adenoviral vectors. , v. 24, p. 6513–6525, 2006.
- KHANAM, S.; PILANKATTA, R.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. An adenovirus type 5 (AdV5) vector encoding an envelope domain III-based tetravalent antigen elicits immune responses against all four dengue viruses in the presence of prior AdV5 immunity. **Vaccine**, v. 27, n. 43, p. 6011–21, 2009.
- KONDRACK, R. M. Interleukin 7 Regulates the Survival and Generation of Memory CD4 Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 12, p. 1797–1806, 2003.
- KOSTYUCHENKO, V. A.; LIM, E. X. Y.; ZHANG, S.; et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, 2016.
- KUTZLER, M. A.; ROBINSON, T. M.; CHATTERGOON, M. A.; et al. Coimmunization with an Optimized IL-15 Plasmid Results in Enhanced Function and

Longevity of CD8 T Cells That Are Partially Independent of CD4 T Cell Help. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 112–123, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LENG, C. H.; LIU, S. J.; TSAI, J. P.; et al. A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 288–295, 2009. Elsevier Masson SAS.

LI, L.; LOK, S.-M.; YU, I.-M.; et al. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1830–1834, 2008.

LI, W.; LI, S.; HU, Y.; et al. Efficient augmentation of a long-lasting immune responses in HIV-1 gag DNA vaccination by IL-15 plasmid boosting. , v. 26, p. 3282–3290, 2008.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23–61, 2003.

MAROVICH, M.; GROUARD-VOGEL, G.; LOUDER, M.; et al. Human Dendritic Cells as Targets of Dengue Virus Infection. **APC. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3, p. 219–224, 2001. Elsevier Masson SAS.

MEERTENS, L.; CARNEC, X.; LECOIN, M. P.; et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 4, p. 544–557, 2012. Elsevier Inc.

MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; SCOTT, T. W.; et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138–46, 2014. Elsevier Ltd.

METCALF, D. The Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 229, p. 16–22, 1985.

MILLER, J. L.; DEWET, B. J. M.; MARTINEZ-POMARES, L.; et al. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. 11, 2008.

NARVAEZ, F.; GUTIERREZ, G.; P??REZ, M. A.; et al. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 11, p. 1–8, 2011.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; ALTMAYER, R.; AMARA, A.; 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 Rep**, v. 4, n. 7, p. 723–728, 2003.

- O'HAGAN, D. T. **Vaccine Adjuvants**. New Jersey: Humana Press, 2000.
- DE OLIVEIRA SANTOS, N. S.; ROMANOS, M. T. V; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. Guanabara Koogan, 2008.
- PARK, S.-H.; SONG, M.-Y.; NAM, H. J.; IM, S. J.; SUNG, Y.-C. Codelivery of IL-7 Augments Multigenic HCV DNA Vaccine-induced Antibody as well as Broad T Cell Responses in Cynomolgus Monkeys. **Immune network**, v. 10, n. 6, p. 198–205, 2010.
- PAUL, L. M.; CARLIN, E. R.; JENKINS, M. M.; et al. Dengue Virus Antibodies Enhance Zika Virus Infection. **bioRxiv**, 2016.
- DE PAULA, S. O.; LIMA, D. M.; DE OLIVEIRA FRANÇA, R. F.; GOMES-RUIZ, A. C.; DA FONSECA, B. A. L. A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. **Archives of Virology**, v. 153, n. 12, p. 2215–2223, 2008.
- PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369–377, 2008.
- RAMANATHAN, M. P.; KUO, Y.-C.; SELLING, B. H.; et al. Development of a novel DNA SynCon tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6444–53, 2009.
- RAVIPRAKASH, K.; APT, D.; BRINKMAN, A.; et al. A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. , v. 353, p. 166–173, 2006.
- ROTHMAN, A. L. Dengue: Defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 946–951, 2004.
- ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 532–543, 2011. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.
- SABCHAREON, A.; WALLACE, D.; SIRIVICHAYAKUL, C.; et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1559–67, 2012.
- SCHLUNS, K. S.; WILLIAMS, K.; MA, A.; ZHENG, X. X.; LEFRANCOIS, L. Cutting Edge: Requirement for IL-15 in the Generation of Primary and Memory Antigen-Specific CD8 T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 4827–4831, 2002.
- SCHMITZ, J.; ROEHRIG, J.; BARRETT, A.; HOMBACH, J. Next generation dengue vaccines : A review of candidates in preclinical development. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7276–7284, 2011. Elsevier Ltd.

- SEDDON, B.; TOMLINSON, P.; ZAMOYSKA, R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. , v. 4, n. 7, p. 680–686, 2003.
- SEDEGAH, M.; WEISS, W.; SACCI, J. B.; et al. Improving Protective Immunity Induced by DNA-Based Immunization: Priming with Antigen and GM-CSF-Encoding Plasmid DNA and Boosting with Antigen-Expressing Recombinant Poxvirus. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5905–5912, 2000.
- SU, B.; WANG, J.; ZHAO, G.; et al. Sequential administration of cytokine genes to enhance cellular immune responses and CD4+ T memory cells during DNA vaccination. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 8, n. 11, p. 1659–1667, 2012.
- TAPIA-CONYER, R.; MÉNDEZ-GALVÁN, J. F.; GALLARDO-RINCÓN, H. The growing burden of dengue in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. SUPPL. 2, p. 3–6, 2009.
- TARR, P. E. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and the immune system. , v. 1, p. 133–140, 1996.
- TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 7, p. 823–9, 2003.
- TOUGH, D. F.; SUN, S.; ZHANG, X.; SPRENT, J. Stimulation of memory T cells by cytokines. , v. 18, p. 1642–1648, 2000.
- VILLAR, L.; DAYAN, G. H.; ARREDONDO-GARCÍA, J. L.; et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p. 141103114505002, 2014.
- WAHALA, W. M. P. B.; KRAUS, A. A.; HAYMORE, L. B.; ACCAVITTI-LOPER, M. A.; DE SILVA, A. M. Dengue virus neutralization by human immune sera: Role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 103–113, 2009. Elsevier Inc.
- WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518–28, 2007.
- WHO. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. , 2012a.
- WHO. **Handbook for clinical management of dengue**. 2012b.
- WU, S.-J. L.; GROUARD-VOGEL, G.; SUN, W.; et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat Med**, v. 6, n. 7, p. 816–820, 2000.
- XU, R.; MEGATI, S.; ROOPCHAND, V.; et al. Comparative ability of various plasmid-based cytokines and chemokines to adjuvant the activity of HIV plasmid DNA vaccines. **Vaccine**, v. 26, n. 37, p. 4819–4829, 2008.

ZELLWEGER, R. M.; MILLER, R.; EDDY, W. E.; et al. Role of Humoral versus Cellular Responses Induced by a Protective Dengue Vaccine Candidate. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.

ZHANG, W.; CHIPMAN, P. R.; CORVER, J.; et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 11, p. 907–912, 2003.