

NINA ROCHA DUTRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO EM CÉLULAS VERO DOS CANDIDATOS
VACINAIS PCID2ETD2PRM E PCID2ETD3PRM DE DNA RECOMBINANTE
PARA O VÍRUS DENGUE-2**

Dissertação 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 *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

D978a
2009

Dutra, Nina Rocha, 1981-

Avaliação de expressão em células vero dos candidatos
vacinais pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM de DNA
recombinante para o vírus dengue-2 / Nina Rocha Dutra.
– Viçosa, MG, 2009.
xii, 72f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 66-73.

1. Dengue - Vacina. 2. Clonagem molecular. I. Universi-
dade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 614.58852

NINA ROCHA DUTRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO EM CÉLULAS VERO DOS CANDIDATOS
VACINAIS PCID2ETD2PRM E PCID2ETD3PRM DE DNA RECOMBINANTE
PARA O VÍRUS DENGUE-2**

Dissertação 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 *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 12 de fevereiro de 2009.

Prof. Clóvis Andrade Neves
(Co-orientador)

Prof. Joaquin Hernán Patarroyo
Salcedo
(Co-orientador)

Prof. Leandro Licursi de Oliveira

Prof. Luciano Gomes Fietto

Prof. Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Dedico:

Às pessoas mais importantes da minha vida:
meus pais Rogério e Fátima, minha irmã Gina
e meu amor Flávio, pelo apoio, carinho e
paciência incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar por perto a cada momento, a cada vitória e a cada queda, por me dar força e perseverança, e por fazer da Ciência algo tão maravilhoso.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e por ter me recebido de braços abertos e dado total condição para a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, ao coordenador do curso, Prof. José Eduardo Serrão, e aos professores da pós-graduação, pelos ensinamentos.

Ao Prof. Sérgio Oliveira de Paula, pela oportunidade de crescimento profissional, pela disponibilidade, paciência e companheirismo e por consentir que eu desse meus primeiros passos na pesquisa em seu laboratório. Muito obrigada!

Ao Prof. Clóvis e ao Prof. Patarroyo, pelo auxílio e co-orientação.

Às amigas Marília e Michelle, pelos ensinamentos de Biologia Molecular, pela disposição, pela boa vontade em aprender e ensinar, e pelas risadas e bons momentos que jamais serão esquecidos!

Aos companheiros do Laboratório de Immunovirologia Molecular, por tornarem o trabalho cada dia mais agradável: Marcelão, Carol, Rui, Aline, Ângelo, Kelly, Marilane, Alípio (obrigada pela ajuda com o RT-PCR!), Robertinho, Victor, Alice, Pâmela, Monique, Flavinha e todos os outros!

Aos meus pais e irmã, por acreditarem em mim, me apoiarem sempre e por me tornarem a pessoa de bem que sou hoje.

Ao meu amor e grande amigo Flávio, que esteve ao meu lado a cada etapa desse trabalho.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito desse trabalho, muito obrigada!

BIOGRAFIA

Nina Rocha Dutra, filha de Rogério Motta Dutra e Maria de Fátima Rezende Ferreira Rocha Dutra, nasceu no dia 11 de agosto de 1981 em Barbacena, Minas Gerais.

Em março de 2000 ingressou no curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, graduando-se como Farmacêutica - Bioquímica em 25 de janeiro de 2005.

Em fevereiro de 2005 ingressou no Programa de Residência em Análises Clínicas oferecido pelo Laboratório Central do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, formando-se especialista em Análises Clínicas em janeiro de 2007.

Em março de 2007 ingressou no curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, concentrando seus estudos na área de Imunovirologia Molecular.

Em fevereiro de 2009, submeteu-se à defesa de sua dissertação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
I – INTRODUÇÃO	1
1.1 Os vírus Dengue (DENV)	1
1.1.1 A família <i>Flaviviridae</i>	1
1.1.2 Sorotipos e Estrutura	1
1.1.3 Células-alvo	3
1.1.4 Epidemiologia	4
1.1.5 Transmissão	6
1.1.6 Sintomatologia	7
1.1.7 A busca pela vacina	9
II – OBJETIVOS	22
2.1 Objetivos gerais	22
2.2 Objetivos específicos	22
III – MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Aprimoramento do plasmídeo recombinante vacinal	23
3.1.1 Células e plasmídeos	23
3.1.2 Estoques virais	24
3.1.2.1 Estoque viral proveniente de cultura celular	24
3.1.2.2 Estoque viral proveniente de macerado de cérebro de camundongo	25
3.1.3 Extração do RNA viral	25
3.1.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)	26
3.1.5 Amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3	26
3.1.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	27
3.1.7 Preparação de bactérias competentes para a transformação	28

3.1.8 Clonagem dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no plasmídeo de clonagem pGEM-T	29
3.1.9 Transformação de células competentes DH5 α	30
3.1.10 Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas	30
3.1.11 Ensaios de restrição	31
3.1.12 Clonagem dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no plasmídeo de expressão pCID2Et	32
3.1.13 Sequenciamento dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3	34
3.2 Análise da expressão dos plasmídeos recombinantes	34
3.2.1 Transfecção com DNAs plasmidiais recombinantes	34
3.2.2 ELISA sanduíche	35
3.2.3 Imunoprecipitação	37
3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	37
3.2.5 Immunoblotting	38
3.2.6 Imunofluorescência indireta	39
3.2.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real	40
 IV. RESULTADOS	 42
4.1 Aprimoramento do plasmídeo recombinante vacinal	42
4.1.1 Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR)	42
4.1.2 Clonagem em vetor de clonagem pGEM-T	43
4.1.3 Clonagem em vetor de expressão pCID2Et	44
4.1.4 Sequenciamento dos insertos prM/DENV-2 e prM/DENV-3	46
4.2 Análise da expressão dos plasmídeos recombinantes	50
4.2.1 ELISA sanduíche	50
4.2.2 Imunoprecipitação seguida de eletroforese das proteínas (SDS-PAGE)	50
4.2.3 Imunoprecipitação seguida de “immunoblotting”	52
4.2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real	53
4.2.5 Imunofluorescência indireta	54

V – DISCUSSÃO	56
VI – CONCLUSÕES	62
VII – PERSPECTIVAS	63
VIII – GLOSSÁRIO	64
IX - REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Distribuição global aproximada da dengue e *Aedes aegypti*. 7

Figura 2. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). 30

Figura 3. Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador de DNA 100 pb (100 pb DNA Ladder, Invitrogen, Califórnia, EUA) e os fragmentos de aproximadamente 540 pb correspondentes a prM/DENV-2 e prM/DENV-3. 43

Figura 4. (A) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, controle positivo, controle negativo, clones apresentando os fragmentos de aproximadamente 540 pb correspondentes a prM/DENV-2. (B) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, controle positivo, controle negativo, clones apresentando os fragmentos de aproximadamente 540 pb correspondentes a prM/DENV-3. 44

Figura 5. (A) Gel de agarose 0,8% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador de DNA λ Hind III e os plasmídeos pCID2Et, de aproximadamente 5,3 kb, digeridos por *EcoRI* e *XhoI*. (B) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, 3 clones pGEM-T/ prM/DENV-2 duplamente digeridos e 3 clones pGEM-T/ prM/DENV-3 duplamente digeridos. 45

Figura 6. (A) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, controle negativo, controle positivo, clones recombinantes pCID2EtD2prM (destaque para o clone de número 42). (B) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, controle positivo, controle negativo, clones recombinantes pCID2EtD3prM (destaque para o clone de número 26). 46

Figura 7. Alinhamento entre as duas seqüências (prM/DENV-2 e prM/DENV-3) para a detecção do grau de indentidade entre as duas seqüências, realizada pelo programa “BLAST two sequences”. 49

Figura 8. Alinhamento entre as duas seqüências de aminoácidos correspondentes às seqüências nucleotídicas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 para a detecção do grau de identidade entre ambas, realizada pelo programa “Clustal W”. 49

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 10% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de peso molecular de proteínas (“Molecular Weight Marker”, Sigma-Aldrich, Alemanha), controle negativo de imunoprecipitado de extrato celular de células transfectadas com o vetor pCI “vazio”, imunoprecipitado de células transfectadas com pCID2EtD2prM e imunoprecipitado de células transfectadas com pCID2EtD3prM. 52

Figura 10. “Imunoblotting” mostrando, da esquerda para a direita, marcador de peso molecular de proteínas (“Molecular Weight Marker”, Sigma-Aldrich, Alemanha), imunoprecipitado de células transfectadas com pCID2EtD2prM e imunoprecipitado de células transfectadas com pCID2EtD3prM e controle negativo de imunoprecipitado de extrato celular de células transfectadas com o vetor pCI. 53

Figura 11. Detecção por imunofluorescência indireta das proteínas virais prM/E em células Vero transfectadas. Aumento de 40x. (A) Imunofluorescência negativa para dengue (transfecção com pCI), (B) Imunofluorescência positiva para as proteínas prM/E do vírus dengue (transfecção com pCID2EtD2prM), (C) Imunofluorescência positiva para as proteínas prM e E do vírus dengue (transfecção com pCID2EtD3prM). 55

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Seqüência dos “primers” utilizados na amplificação dos fragmentos das regiões prM/DENV-2 e prM/DENV-3. 27

Tabela 2. Alinhamento dos nucleotídeos BLASTn, e alinhamento da seqüência traduzida tBLASTx dos insertos prM/DENV-2 e prM/DENV-3. 48

Tabela 3. Número de vezes do aumento da expressão do RNA mensageiro nas amostras de células Vero transfectadas em comparação com o controle. 54

RESUMO

DUTRA, Nina Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Avaliação da expressão em células Vero dos candidatos vacinais pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM de DNA recombinante para o vírus Dengue-2.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

Os dengue vírus são vírus de genoma RNA fita simples polaridade positiva que codifica as proteínas em uma longa “open reading frame”. Contém aproximadamente 11 kb, responsáveis pela codificação de três proteínas estruturais denominadas Capsidial (C), de Membrana (M), e Envelope (E), sendo esta última uma glicoproteína. Adicionalmente a estas proteínas estruturais, o genoma viral expressa ainda sete proteínas não-estruturais denominadas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, e NS5. Estes vírus pertencem à família *Flaviviridae*, sendo os patógenos humanos de maior importância desta família. São transmitidos através do mosquito *Aedes aegypti*, causando a dengue. As manifestações da dengue variam desde infecções assintomáticas até quadros graves de doença hemorrágica que são responsáveis pelos altos índices de morbidade e mortalidade. Ainda não há terapia antiviral específica. Vários pesquisadores têm se lançado à busca de uma vacina eficaz para o controle da dengue, e conseqüentemente, diversas estratégias têm sido levantadas para a produção da mesma, lançando mão de desde métodos clássicos como atenuação viral até a expressão de antígenos recombinantes em vetores de expressão, tais como vírus e bactérias. No entanto, os resultados obtidos no desenvolvimento destas vacinas têm frustrado a comunidade científica mundial. Uma nova estratégia vacinal, a

vacina de DNA, está atualmente sob intensa investigação. Neste contexto, foi construído um candidato vacinal contra o dengue, utilizando-se para tanto um plasmídeo pCI Vector expressando a proteína E truncada do vírus dengue-2, sem a expressão concomitante de prM, com a finalidade de reduzir o tamanho do inserto a ser clonado, facilitando a produção de uma vacina tetravalente em um único plasmídeo. Testes demonstraram que a proteína E truncada foi corretamente expressa pelo plasmídeo, porém em quantidade reduzida e que existe uma boa resposta específica contra o vírus da dengue gerada pelo clone recombinante, mas apenas uma pequena porcentagem de camundongos imunizados com o plasmídeo foi protegida quando desafiados com vírus dengue-2. Estes resultados justificam a busca de um aprimoramento deste candidato vacinal contra o dengue-2, a fim de aumentar a expressão da proteína E clonada no plasmídeo vacinal e assim proporcionar uma imunização mais eficaz. O presente trabalho visa o aprimoramento desse plasmídeo através da inserção das proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3, a fim de verificar se a presença de prM na construção vacinal aumentaria a expressão de E. Os novos plasmídeos recombinantes contruídos foram denominados pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM. Os resultados obtidos provaram a correta clonagem e expressão das proteínas prM/E por células Vero transfectadas, e indicam que houve um aumento de expressão relativo de 67,02% por pCID2EtD3prM com relação a pCID2EtD2prM, resultados esses que ainda deverão ser corroborados por testes absolutos.

ABSTRACT

DUTRA, Nina Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009.
Evaluation of the expression in Vero cells of the vaccine candidates pCID2EtD2prM and pCID2EtD3prM of recombinant DNA for the Dengue-2 virus. Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Clóvis Andrade Neves and Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

The dengue viruses have single-stranded, positive polarity RNA genome that encodes proteins in a long open-reading frame (ORF). This genome is about 11 kb-length and responsible by encoding three structural proteins called Capsid (C), membrane (M) and Envelope (E), this last one being a glycoprotein. In addition to these proteins, the viral genome expresses seven other non-structural proteins called NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b and NS5. The dengue viruses belong to the *Flaviviridae* family, and are the most important human pathogens of this family. They are transmitted by the bite of the *Aedes aegypti* mosquito, leading to the dengue disease. The manifestations of this disease vary from asymptomatic infections until severe hemorrhagic features which are responsible by the high morbidity and mortality rates of dengue. So far, there is not specific antiviral treatment. Many researchers have been working on the quest for an efficient dengue vaccine, and consequently, various strategies have been brought to view for its production, using simpler methods, such as the viral attenuation, as well as more complex ones, such as the expression of recombinant antigens in expression vectors, like viruses and bacteria. However, the results obtained in the development of these vaccines have been frustrating the world scientific community. A new vaccine strategy, the DNA vaccine, is currently under intense investigation. In this context, a

vaccinal candidate for the dengue-2 virus (DENV-2) has been constructed utilizing the pCI plasmid vector expressing the truncated E protein from DENV-2, without the concomitant expression of prM, aiming the size reduction of the insert to be cloned, facilitating the production of a tetravalent vaccine in a single plasmid vector. The testing demonstrated that the truncated E protein was correctly expressed by the plasmid, but in reduced quantity, and that a good specific response existed against the dengue-2 virus generated by the recombinant clone, but only a small percentage of the immunized mice was protected when challenged with DENV-2. These results justify the search for the improvement of this vaccine candidate against DENV-2, with the objective of increasing the expression of the E protein cloned into the vaccine plasmid, thus offering more efficient immunization. This present work aims the improvement of this plasmid by the insertion of the prM/DENV-2 and prM/DENV-3 proteins, to verify if the presence of these proteins in the vaccine construction would increase the expression of E. The new plasmids constructed were called pCID2EtD2prM and pCID2EtD3prM. The results achieved proved the correct cloning and expression of prM/E by transfected Vero cells, and indicated that there was a relative expression increase of 67,02% by pCID2EtD3prM in relation to pCID2EtD2prM, results that are still to be corroborated by absolute tests.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Os vírus dengue (DENV)

1.1.1 A família Flaviviridae

A família *Flaviviridae* compreende vários gêneros de vírus transmitidos por artrópodes (“arthropod-born viruses”) de grande importância na medicina, incluindo o vírus dengue, febre amarela e encefalite japonesa. Todos os membros desta família possuem características morfológicas comuns, assim como estrutura genômica, estratégias de replicação e tradução (Wilder-Smith *et al*, 2008; Halstead *et al*, 2007).

1.1.2 Sorotipos e Estrutura

Os dengue vírus apresentam quatro sorotipos antigenicamente relacionados denominados dengue-1 (DENV-1), dengue-2 (DENV-2), dengue-3 (DENV-3) e dengue-4 (DENV-4). Suas partículas virais maduras consistem de um genoma de RNA fita simples polaridade positiva, que funciona como RNA mensageiro após a entrada do mesmo no citosol. Esta molécula de RNA é circundada por um nucleocapsídeo icosaédrico de 30 nm de diâmetro, recoberto com um envelope lipídico de cerca de 10 nm de espessura derivado da membrana da célula hospedeira (Fields, 2001).

Seu genoma de aproximadamente 11Kb contém um CAP 5' mas não apresenta cauda poliA. Possui uma única ORF (“open reading frame”) que codifica uma poliproteína precursora, que é posteriormente processada e clivada por proteases virais e celulares, dando origem a três proteínas estruturais (proteínas C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (proteínas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Lindenbach e Rice, 2003).

A proteína NS1 é uma glicoproteína cujas funções ainda não foram plenamente elucidadas, no entanto, estudos indicam que a mesma encontra-se relacionada com o processo de replicação viral e com a virulência (Costa *et al.*, 2007). Esta proteína é encontrada em células de mamíferos infectadas com o vírus dengue associada à membrana plasmática e na forma de um multímero solúvel, secretada na circulação (Costa *et al.*, 2007, Marianneau *et al.*, 1998). NS2a e NS2b têm sido relacionadas com o processamento da poliproteína, enquanto NS3 é provavelmente a protease viral e pode estar envolvida com a duplicação e a transcrição do genoma (Chambers *et al.*, 1990). A região NS4 codifica duas pequenas proteínas hidrofóbicas NS4a e NS4b que parecem estar relacionadas com a estabilização do complexo de replicação do RNA e na maturação da partícula viral. A proteína codificada pelo gene NS5 tem um peso molecular de 105 KDa e é a mais conservada entre as proteínas dos Flavivírus. NS5 é a RNA polimerase viral (Fields, 2001).

As proteínas estruturais incluem uma proteína capsidial (C) rica em resíduos de lisina e arginina, uma proteína precursora Pré-Membrana (prM) e a proteína do Envelope (E) (Kuhn *et al.*, 2002).

A proteína capsidial contém 100 resíduos de aminoácidos, apresenta tamanho de 12 a 14 KDa e, devido a seu caráter básico, interage com o RNA viral, envolvendo-o e constituindo assim um nucleocapsídeo. A proteína C contém um domínio hidrofóbico interno conservado nos flavivírus. Este domínio encontra-se associado à membrana do retículo endoplasmático, no interior da célula hospedeira infectada. A prM é uma glicoproteína de 18,1 a 19,1 KDa que origina a proteína M quando clivada em sua região N-terminal. Por sua vez, M contém 495 resíduos de aminoácidos e um peso molecular de 8,2 a 8,5 KDa, e

participa juntamente com a proteína E da constituição do envelope viral (Kuhn *et al*, 2002; Chambers *et al*, 1990).

No entanto, as principais funções biológicas deste vírus residem na proteína E, tais como: tropismo celular, fusão de membranas, indução da produção de anticorpos neutralizantes pelo organismo hospedeiro e hemaglutinação. Esta glicoproteína apresenta 495 resíduos de aminoácidos e um peso molecular de 56 a 57 KDa (Kuhn *et al*, 2002; Ocazionez e Fonseca, 2001).

Análises estruturais da proteína E revelam a existência de três domínios distintos ligados por ligações S-S, denominados domínios I, II e III. (Matsui *et al*, 2009; Halstead *et al*, 2005; Kuhn *et al*, 2002). O domínio I compreende a região entre os resíduos 50-125 na porção N terminal e está envolvido na endocitose da partícula viral pela célula hospedeira. O domínio II encontra-se entre os resíduos 200 e 250 e contém os epítomos neutralizantes específicos de sorotipo e de reação cruzada com outros membros da família, enquanto o domínio III é composto de um “loop” livre de ligações S-S e nele encontra-se o sítio de glicosilação da proteína, no resíduo 157 da cadeia polipeptídica (Kuhn *et al*, 2002; Chambers *et al*, 1990).

1.1.3 Células-alvo

Os vírus da dengue são capazes de se replicar em diversos tipos celulares. As células das linhagens monocíticas têm sido apontadas desde o princípio como os principais alvos da replicação viral. Antígenos virais têm sido encontrados em células de Kupffer, macrófagos alveolares, fagócitos mononucleares da pele e monócitos circulantes (Guzmán e Kouri, 2002). Estudos indicam que DENV em estado imaturo infectam as células dendríticas

e de Langerhans, podendo estas servir de sítios de replicação no início da infecção.

1.1.4 Epidemiologia

A emergência e re-emergência da dengue pode ser atribuída a diversas causas. Entre elas se incluem mudanças populacionais e sociais, como o crescimento acelerado e não-planejado da população em centros urbanos (o que leva ao mal ou não atendimento das necessidades sanitárias básicas para todo esse contingente populacional), a atual maior facilidade de movimentação de pessoas entre áreas geográficas distintas, a falta de sucesso abrangente das medidas preventivas de controle do mosquito vetor e por último, mas não menos importante, os recursos limitados que são destinados para a infraestrutura da saúde pública (Guzmán e Kouri, 2004). Todos esses fatores contribuem para a disseminação da dengue e a consolidação desta como uma das principais enfermidades que acometem a humanidade. Sua distribuição é mais intensa em áreas tropicais e sub-tropicais, sendo o Sudeste da Ásia, os países a Oeste do Pacífico e as Américas as regiões mais afetadas (Halstead, 2007; Guzmán e Kouri, 2004).

Mais de 100 países, atualmente, apresentam quadros endêmicos de infecção pelos DENV, e a FHD já foi relatada em mais de 60 dentre esses. Relatos globais do aparecimento da FHD sofreram aumentos da ordem de 20 vezes (Gubler, 2002). As epidemias de dengue podem variar amplamente em magnitude e severidade. Em 1998, a maior epidemia de dengue da história aconteceu na Ásia e Américas, com mais de um milhão e duzentos mil casos de DF e FHD reportados à organização mundial de saúde (Fonte: OMS, 2007). No início do século XXI, a dengue figura como a principal arbovirose humana

no mundo. Somente entre 2000 e 2007, pelo menos 8 áreas anteriormente livres da dengue experimentaram epidemias, incluindo Hong Kong, Nepal, Macau, Butão, Madagascar, Galápagos e as Ilhas de Páscoa. De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde, o ano de 2007 foi o pior em registros de dengue desde 1985, com 918.495 casos de DF e FHD na Américas (Wilder-Smith e Gubler, 2008).

A ineficiência de programas de controle do vetor tem contribuído para o aumento da incidência da dengue ao redor do mundo, por diversos fatores, como a falta de iniciativa de órgãos políticos competentes e também da própria sociedade. Somado a isso, poucos métodos novos e eficientes de controle do vetor foram desenvolvidos nos últimos 30 anos. As estratégias de controle do vetor são frequentemente limitadas a somente uma abordagem, como o uso de larvicidas ou captura de insetos adultos. O controle do vetor, entretanto, deveria ser integrado, e incluir a redução de locais para reprodução de larvas e uso métodos para o controle do mosquito adulto, como o uso de predadores naturais ou de substâncias químicas, obviamente desde que inócuas para o ser humano (Halstead, 2007).

Tendo em vista a ineficácia das ações de controle dos mosquitos vetores atualmente, por todo o mundo, percebe-se uma grande necessidade para a prevenção de novas infecções pelos DENV. Dentre as medidas preventivas de doenças infecciosas, a mais eficiente é a imunização de pessoas que vivem ou vistam áreas de risco. Vacinas contra a dengue são urgentemente necessárias, e têm sido consideradas como alta prioridade pela Organização Mundial de Saúde por décadas, visto que uma vacinação efetiva poderia ser usada em uma imunização universal de crianças em áreas endêmicas como a Ásia,

América latina e Caribe, na proteção de viajantes e das forças militares e no controle de epidemias (Chambers *et al*, 1997).

1.1.5 Transmissão

Os DENV são transmitidos principalmente através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, caracterizando-se por ser predominantemente urbano em sua distribuição (Halstead, 2007). Epidemias de dengue também já foram relatadas com transmissão por *Aedes albopictus*, como a epidemia do Havaí entre 2001-2002, porém este vetor é ineficiente e de movimento lento quando comparado às grandes epidemias provocadas pela transmissão do vírus pelo vetor *A.aegypti* (Halstead, 2007). O *A.aegypti* é encontrado geograficamente entre 30° de latitude norte e 20° de latitude sul. Esta localização é altamente relacionada com as regiões onde se encontram as maiores incidências da dengue (Halstead, 2007; Rico-Hesse, 1997). Após picar e alimentar-se de um indivíduo infectado durante a fase de viremia, que pode ser de 4 a 5 dias após a entrada do vírus no indivíduo, o mosquito adquire o vírus e poderá transmiti-lo a outras pessoas, enquanto esse se multiplica no interior de suas glândulas salivares. O *A. aegypti* infectado torna-se capaz de transmitir o vírus durante toda sua vida, inclusive através da infecção vertical (transovariana) de sua progênie (McBride e Bielefeld-Ohmann, 2000).

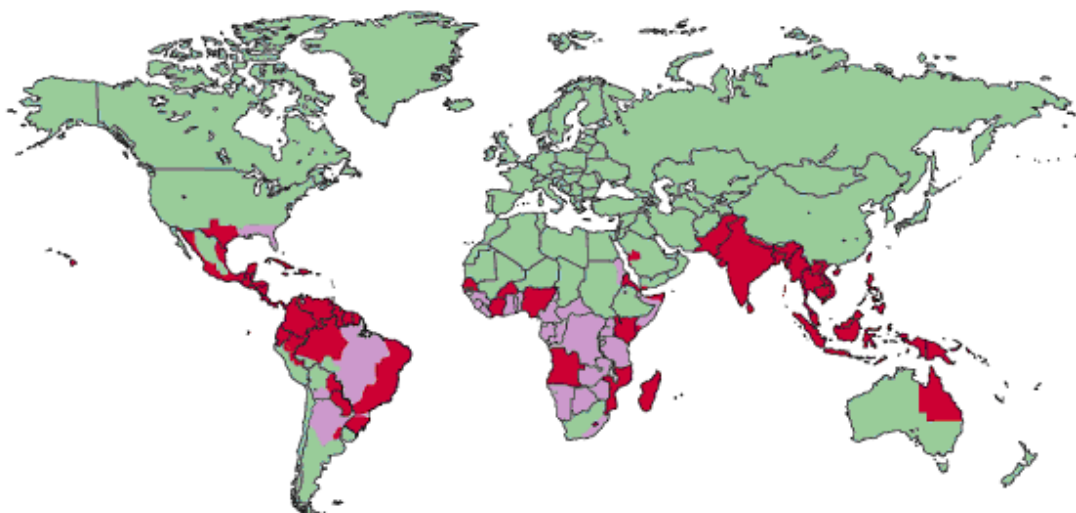


Figura 1. Distribuição global aproximada da dengue e *Aedes aegypti* (Halstead, 2007). Áreas em vermelho = regiões com transmissão recente de dengue. Áreas em lilás = regiões infestadas com *Aedes aegypti*.

1.1.6 Sintomatologia

As infecções pelos DENV podem variar desde a ausência de sintomas, passando por quadros febris brandos a graves (dengue clássica ou DF - “dengue fever”) ou com tendências hemorrágicas (dengue hemorrágica ou DHF - “dengue hemorrhagic fever”). O período de incubação do vírus é de 4 a 6 dias. O quadro da dengue clássica é caracterizado por febre, dores de cabeça, mialgias, artralgias e “rash” maculopapular cutâneo. Entretanto, após 3 ou 4 dias da instalação da febre, e geralmente quando a febre cede, alguns pacientes podem apresentar manifestações de sangramento, trombocitopenia e hemoconcentração. Hepatomegalia também pode ser observada. Em casos mais severos, essas manifestações hemorrágicas podem inclusive levar a quadros de choque hipovolêmico (“DSS – “dengue shock syndrome”), seguido de morte em 5% a 10% dos casos quando a reidratação é insuficiente ou atrasada (Lei *et al*, 2001; Kautner *et al*, 1997).

Várias hipóteses para o desenvolvimento da doença hemorrágica através da infecção pelo vírus da dengue têm sido levantadas. Entre elas, a otimização da infecção dependente de anticorpos (ADE - “antibody-dependent enhancement”) há muito tempo figura como possuidora de papel central. Anticorpos que apresentam reação cruzada entre sorotipos, produzidos em infecções prévias, se ligam aos vírions, mas não têm a capacidade de neutralizá-los e funcionam como opsonizadores, “otimizando” a entrada dos vírus em suas células-alvo, aumentando dessa forma o número de células infectadas. Como resultado, numa infecção secundária, o nível de ativação de linfócitos T cresce pronunciadamente. Essas células T produzem citocinas como o IFN- γ , IL-2 e TNF- α , e lisam monócitos infectados pelo DENV. As proteínas do complemento são ativadas por complexos vírus-anticorpo a liberar C3a e C5a, que por sua vez também têm efeitos diretos na permeabilidade vascular. Os efeitos sinérgicos de IFN- γ , TNF- α e proteínas do complemento ativadas desencadeiam um vazamento de plasma sangüíneo entre as células endoteliais numa infecção secundária pelo vírus dengue (Kubelka *et al*, 2001). Entretanto, vários aspectos permanecem ainda não explicados por essa teoria. Por exemplo, nem todos os casos de dengue hemorrágica são causados por infecções secundárias. A ativação do complemento pode ser resultado de doença severa, e não a causa da doença hemorrágica. Principalmente, a doença hemorrágica se desenvolve rapidamente, usualmente em questão de horas, e pode se resolver dentro de 1 a 2 dias em pacientes que recebem reposição hidroeletrólítica adequada (Kubelka *et al*, 2001; Lei *et al*, 2001).

A virulência da cepa viral é uma hipótese alternativa para a produção de doença hemorrágica pelos DENV. As diferentes intensidades de manifestações

podem ser causadas por variantes dos DENV com diferentes graus de virulência. Aparentemente, também o título alto da carga viral contribui para o aparecimento da doença hemorrágica, e pode ser reflexo da maior virulência da cepa viral. O risco de doença hemorrágica em infecções secundárias parece ser mais alto para o sorotipo 2 (DENV-2) em comparação com os outros (Lei *et al*, 2001).

Não existe ainda um tratamento antiviral específico. No caso da dengue clássica os pacientes geralmente se recuperam após tratamento com reposição de líquidos e eletrólitos. Em se tratando dos casos de dengue hemorrágica, o rápido reconhecimento dos sintomas e o início imediato da terapia de reposição são de importância crucial na redução da taxa de mortalidade (Guzmán e Kouri, 2002).

1.1.7 A busca pela vacina

Grandes esforços têm sido feitos na tentativa de se desenvolver uma vacina para a dengue, e é consenso que uma vacina tetravalente é necessária. A caracterização de uma resposta imune protetora contra a dengue ainda é incompleta e, no presente momento, nenhuma proteção imune formal foi identificada para os candidatos vacinais (Thomas *et al*, 2009).

Enquanto uma vacina contra o dengue não estiver disponível, a única forma de reduzir as infecções será o controle do vetor, prática que tem se mostrado sobremaneira insuficiente, haja vista o grande número de casos de dengue no Brasil e no mundo a cada estação de altos índices pluviométricos e temperaturas igualmente altas, que propiciam a reprodução dos mosquitos vetores. Desse modo, devido à importância adquirida pela doença ao considerar-se sua morbidade, mortalidade e grande distribuição mundial o

desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o dengue tem sido considerado de alta prioridade pela OMS (Costa *et al*, 2007).

Diferentes tipos de estratégias têm sido avaliados, envolvendo desde os métodos mais clássicos de confecção de candidatos vacinais, como a atenuação viral, até métodos para a expressão de antígenos virais recombinantes em vetores de expressão (vírus e bactérias). Entretanto, até então, esses esforços não têm obtido sucesso na produção de um candidato vacinal que seja capaz de produzir imunidade protetora duradoura (Guzmán e Kouri, 2002).

Os candidatos vacinais existentes atualmente incluem vírus vivos atenuados, quimeras vivas baseadas nas estruturas atenuadas de DENV ou YF (vírus da febre amarela), vacinas de DNA, vetores de adenovírus, subunidades protéicas ligadas a adjuvantes, ou a combinação de várias tecnologias (Guy e Almond, 2008).

A vacina ideal contra os DENV deve conferir imunidade duradoura contra infecção por qualquer um dos 4 sorotipos e ser livre de reatogenicidade. Deve ser passível de uso em crianças e conferir resposta imunogênica que não aumente os riscos de desenvolvimento de dengue hemorrágica a partir de exposição concomitante ou subsequente ao DENV selvagem, em nenhum momento do processo de imunização. A vacina ideal também deve induzir tanto uma resposta imune humoral (anticorpos neutralizantes) quanto celular (resposta Th1/CTL). Vacinas vivas atenuadas seriam as de escolha com relação a esse aspecto. Cepas atenuadas devem ser capazes de se replicarem suficientemente bem *in vivo* para provocar uma resposta imunogênica (de preferência contra os 4 sorotipos de DENV ao mesmo tempo), porém de

maneira sistemicamente restrita para evitar o acometimento de sintomas associados à dengue como febre, dor de cabeça e artralgia. Idealmente, as cepas atenuadas não podem produzir viremia e devem ser geneticamente estáveis, pois em caso de uma reversão genética para uma forma virulenta, poderia haver uma transmissão auxiliada pelo mosquito vetor. A transmissão pelo vetor é improvável se não houver viremia, porém a inserção de mutações que restrinjam a replicação da cepa no mosquito também é desejável.

Vacinas de vírus atenuados através de mutações têm sido investigadas como uma alternativa viável. Dois princípios básicos têm norteado pesquisadores na busca do desenvolvimento de vacinas de vírus atenuados. O primeiro deles é o fato de que a vacina deverá ser capaz de induzir respostas imunes humoral e celular duradoura, mimetizando as características de uma infecção viral. Segundo, estes vírus atenuados deverão apresentar uma replicação seguramente restrita a fim de evitar o surgimento de sintomas. Terceiro, os vírus deverão apresentar uma transmissibilidade pelo mosquito vetor reduzida, o que pode ser alcançado reduzindo-se o período de viremia. Quarto, a vacina viral deverá apresentar alta infectividade em humanos para que, em uma pequena dose, o vírus seja capaz de replicar e produzir uma resposta imunológica eficiente e duradoura no indivíduo, além de conseguir replicar-se com facilidade em culturas celulares, diminuindo os custos de produção e transporte. Quinto, a estabilidade genética deverá ser confiável e passível de acompanhamento durante as etapas de produção e de testes da vacina. As mutações responsáveis por conferir atenuação ao vírus deverão ser estáveis mesmo após a replicação viral (Whitehead *et al*, 2007). Wuyang Zhu e colaboradores conduziram um estudo no qual foram construídos vírus

atenuados através da deleção de partes da cauda hidrofóbica da proteína Capsidial envolvidas na montagem das partículas virais infecciosas. Seus resultados demonstraram que os vírus foram capazes de induzir uma alta produção de anticorpos em camundongos e naquelas partículas com maiores deleções, a indução da produção de anticorpos foi consideravelmente reduzida, indicando uma possível alternativa para atenuação viral e produção de vacinas eficazes contra o vírus dengue (Zhu *et al*, 2007).

Há uma formulação produzida e atualmente em testes pela Aventis-Pasteur cujos vírus DENV-1, 2 e 4 foram atenuados pela passagem seriada em células primárias de rim canino e DENV-3 foi atenuado em células VERO e células pulmonares fetais de macacos *rhesus*. Foram completados os ensaios clínicos para as fases 1 e 2 e, mais recentemente, um ensaio na Tailândia com 103 crianças de 5 a 12 anos de idade , às quais foram administradas duas doses da vacina, com intervalo de 3 a 5 meses, e uma dose de reforço quase aos 12 meses após a segunda dose. Até o presente essa vacina tem mostrado certa reatogenicidade, incluindo febre, dor de cabeça e erupções cutâneas, que são reduzidas drasticamente com a segunda e a terceira doses. Em termos de imunogenicidade, a vacina se mostrou fracamente imunogênica depois da primeira dose (Guy e almond, 2008; Sabchareon *et al*, 2002).

Uma abordagem diferente foi adotada pelo Laboratório de Doenças Infecciosas (Bethesda), baseada em genética reversa. Nesse caso, a atenuação foi feita criando uma deleção de 30 pb de comprimento na região não-traduzida 3' (3'-UTR) dos 4 sorotipos de DENV. Essa estratégia parece ter funcionado bem para os sorotipos DENV-1 e DENV-4, mas não tão bem para os sorotipos DENV-2 e DENV-3 (Whitehead *et al*, 2007). Por isso, candidatos

vacinais para DENV-2 e DENV-3 foram construídos com base em quimeras utilizando o DENV-4 atenuado, porém expressando as proteínas prM e E de DENV-2 e DENV-3 (Whitehead *et al*, 2003). Embora a formulação tetravalente dessas cepas pareça ser efetivamente atenuada e imunogênica em macacos, ainda há necessidade de testes em humanos.

As vacinas quiméricas, uma nova série de candidatos vacinais para a dengue, tem como grande pesquisador o grupo Sanofi Pasteur/Acambis. A abordagem realizada por esse grupo explora a cepa vacinal para febre amarela 17D-YF como um vetor para a expressão de proteínas prM e E de DENV em reposição às mesmas proteínas do YF (Whitehead *et al*, 2003). Dessa forma, quimeras foram construídas para cada um dos sorotipos de DENV, e a formulação foi comercialmente denominada *ChimeriVaxTM CYD1-4*. Essa formulação está atualmente em fase I de testes clínicos (Guy e Almond, 2008). As cepas *ChimeriVax* crescem bem em culturas de células Vero e aparentam ser suficientemente atenuadas e imunogênicas em testes pré-clínicos. Entretanto, algumas reações adversas já foram relatadas, como febre, dor de cabeça, fadiga, mal-estar e reações no local da injeção, sem falarmos no risco teórico de desenvolvimento de encefalite, particularmente em crianças, devido a um nível residual de neurotropismo da cepa 17D-YF.

A dificuldade inerente do desenvolvimento de cepas com um nível seguro de atenuação e que são ao mesmo tempo imunogênicas e com baixa interferência mútua de indução de anticorpos quando administradas como uma formulação tetravalente levou alguns outros grupos de pesquisadores a concentrar seus esforços na produção de cepas inativadas. Embora menos capazes de induzir resposta imune celular quando comparadas às vacinas

vivas atenuadas, as vacinas inativadas oferecem, em teoria, uma forma mais segura de se atingir uma resposta imunogênica equilibrada contra cada um dos 4 sorotipos de DENV, uma vez que uma das cepas não se sobreporá em replicação com relação às outras, o que pode diminuir o risco de indução de FHD como efeito indesejável da vacinação contra a dengue (Putnak *et al*, 2005). Proteínas do envelope viral recombinantes preparadas numa ampla variedade de sistemas de expressão também têm sido descritas como candidatos vacinais. Talvez a mais promissora de todas essas são as proteínas E truncadas, descritas por Guzmán e colaboradores (Khanam *et al*, 2006; Putnak *et al*, 2005), que, em altas doses e acompanhadas de adjuvantes, obtiveram sucesso na proteção contra infecção em macacos, mas ainda também não apresentaram resultados publicados de testes em humanos.

Uma das alternativas buscadas tem sido a criação de vacinas de subunidades utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Antígenos virais tais como as proteínas E e NS1 têm sido produzidos em sistemas de expressão a fim de se construir uma vacina de subunidade. A maioria das preparações induziu produção de anticorpos de média eficiência em camundongos imunizados (Whitehead *et al*, 2007).

Vázquez e cols. (2002) demonstraram que peptídeos sintéticos da proteína do Envelope (proteína E) foram capazes de induzir a proteção em camundongos, no entanto, ainda não foram publicados resultados de estudos posteriores para validar este candidato vacinal em primatas, e em uma fase mais avançada em humanos, já que nem sempre os resultados obtidos em experimentos *in vitro* e com camundongos são compatíveis em testes com primatas.

A expressão das proteínas prM, E e NS1 do vírus dengue por baculovírus (Deubel *et al*, 1991), pelo vírus da vaccinia (Fonseca *et al*, 1994) e pela *Salmonella typhimurium* (Cohen *et al*, 1990) tem sido utilizada, entretanto, os resultados não têm sido coerentes, ou seja, existe na literatura uma discrepância em relação aos dados obtidos nos experimentos de análise da eficácia de tais vacinas. Wen-Tssann Liu e colaboradores construíram uma vacina recombinante utilizando uma cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* expressando a proteína não estrutural NS1 do vírus dengue-2. No entanto, os resultados demonstraram que esta construção não obteve êxito em conferir proteção efetiva em camundongos vacinados oralmente e desafiados com o vírus dengue-2. Testes subsequentes demonstraram que a co-administração de anfotericina B e a vacina recombinante mudaram este quadro, levando ao desenvolvimento de imunidade contra o dengue-2 em camundongos co-inoculados. O uso do vírus da vaccinia como vetor tem sido associado ao aparecimento de reações adversas e efeitos colaterais que podem ser de baixa a alta severidade, inclusive podem levar a óbito (Liu *et al*, 2006).

Desse modo, recentemente, métodos de biologia molecular têm sido empregados na busca de novas estratégias para o desenvolvimento de candidatos vacinais, e não tem sido diferente para os vírus dengue. As vacinas de DNA têm o apelo de serem potencialmente mais seguras, menos termolábeis e mais facilmente administráveis, além de serem relativamente de fácil produção em larga escala. Entre esses métodos tem se destacado a pesquisa por estratégias de vacinação para o vírus dengue utilizando vacinas de DNA, que se baseia na inserção de genes provenientes do vírus em vetores plasmidiais, com o intuito de expressar esses genes nas células do receptor,

culminando com a produção de determinantes antigênicos capazes de indução de resposta imune protetora (Gurunathan *et al*, 2000).

As vacinas de DNA consistem de um plasmídeo bacteriano que possui características de vetores para expressão *in vitro*, visando a expressão de genes dos vírus *in vivo*. Estes plasmídeos incluem uma origem de replicação disponível para sua produção na bactéria, um gene de resistência a antibiótico que auxilia na seleção da bactéria transformada com o plasmídeo e as seqüências promotora e de poliadenilação/terminal do RNA mensageiro para direcionar a expressão da proteína em células de mamíferos. Após transfecção *in vitro* da célula com o plasmídeo recombinante, esta irá expressar o gene, e a proteína viral sintetizada é submetida às vias de processamento existentes no interior da célula. O resultado deste processo inclui o transporte de peptídeos imunogênicos até a membrana celular, ligados a moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade – classe I/II (MHC-I/II), e a secreção da proteína no espaço extracelular. Essa localização celular da proteína expressa permite a ativação do sistema imune produzindo-se uma resposta de tipo celular e humoral (Dean *et al*, 2005; McDonnell *et al*, 1996, Donnelly *et al*, 1994). A demonstração de que inoculação direta com DNA plasmidial pode estimular imunidade protetora, tanto celular quanto humoral, promete transformar este método numa poderosa estratégia para o desenvolvimento de vacinas.

Assim, uma nova forma de vacinação, a vacina de DNA, está atualmente sob intensa investigação no que concerne à imunização contra dengue. Ela utiliza um DNA plasmidial que contém o gene de interesse antigênico inserido. A base teórica para um modelo de vacinação por moléculas de DNA reside no fato de que a transferência gênica direta de um DNA recombinante tanto *in vivo*

quanto *in vitro* resulta em expressão protéica (Gurunathan *et al*, 2000). Wolf e colaboradores demonstraram que a inoculação intramuscular de plasmídeos de DNA codificando genes repórter induzia a produção daquelas proteínas exógenas em células musculares sem a integração do DNA nas células hospedeiras (Wolff *et al*, 1992). A vacinação de DNA apresenta vantagens importantes em relação às outras vacinas. As principais vantagens seriam, em primeiro lugar, as capacidades de mimetização dos efeitos das vacinas atenuadas no que tange à indução da resposta imune celular e, em segundo, as vacinas de DNA poderiam ser produzidas em larga escala com redução de custo, além de serem de fácil estocagem, transporte e aplicação. A introdução do DNA em células do receptor pode ser feita por injeção intramuscular ou através da biobalística, utilizando micro-partículas de ouro cobertas com o DNA recombinante, que são injetadas no tecido subcutâneo por um revólver de imunização (“gene guns”). Este método de imunização genética baseia-se na capacidade das células em receber, incorporar e expressar DNA exógeno, diferente do DNA celular. A imunização ativa é então alcançada quando o produto da expressão é imunogênico (Gurunathan *et al*, 2000).

Notadamente, as vacinas de DNA também contêm seqüências de nucleotídeos específicas que têm papel crucial na imunogenicidade dessas vacinas. Essas seqüências específicas consistem de dinucleotídeos não-metilados citosina-fosfato-guanidina (CpG) com regiões flanqueadoras compostas de 2 purinas na região 5' e 2 pirimidinas na região 3', e são de 16 a 20 vezes mais comuns em DNA de bactérias do que no DNA de mamíferos. Funcionalmente, esses motivos CpG podem estimular diretamente vários tipos de células do sistema imune, incluindo monócitos, macrófagos, células

dendríticas, linfócitos B e T. A habilidade dos motivos CpG de induzir células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais a produzir citocinas como IL-12, TNF- α , e IFN- α é crítica na otimização da resposta imune celular induzida pelas vacinas de DNA (Gurunathan *et al*, 2000). Dessa forma, os vetores por si próprios, e não só a proteína exógena expressa graças a sua incorporação pelas células, podem ser também responsáveis pela efetividade da resposta imune, pois apresentam propriedades imunoestimulantes, atuando como adjuvantes, aumentando a magnitude da resposta imune e influenciando o padrão da resposta celular.

Após a administração por via intramuscular, o DNA nu pode ser incorporado aos miócitos ou às células mononucleares como macrófagos ou células dendríticas (Gurunathan *et al*, 2000). O mecanismo de transfecção celular com DNA nu ainda não é completamente entendido, entretanto sabe-se que ele atinge o núcleo celular onde permanece de forma episossomal, sem se incorporar ao genoma das células hospedeiras. As vias metabólicas da célula hospedeira são utilizadas para os processos de transcrição do gene que codifica um determinado antígeno, presente na vacina de DNA, em RNA mensageiro e conseqüentemente em na proteína de interesse. Os antígenos expressos endogenamente são processados e apresentados no contexto de moléculas MHC classe I para o reconhecimento e ativação específica de linfócitos T CD8+ citotóxicos. No entanto, parte dos antígenos produzidos pode ser secretada e estimular linfócitos B a produzirem anticorpos específicos. As células apresentadoras de antígenos podem também ser diretamente transfectadas ou capturar o antígeno secretado por outra célula, processando e apresentando-os no contexto de moléculas MHC classe II, para o

reconhecimento e ativação de células T CD4+ auxiliares (Th1). As vacinas de DNA são, portanto, capazes de induzir ambos os tipos de resposta imune (celular e humoral), com estimulação tanto de linfócitos T CD8+ citotóxicos quanto T CD4+ auxiliares (Dean *et al*, 2005).

Vários pesquisadores têm trabalhado na busca do desenvolvimento de uma vacina de DNA contra o dengue. Costa e colaboradores construíram plasmídeos recombinantes expressando a proteína NS1 do vírus dengue-2 e obtiveram resultados satisfatórios em experimentos de imunização e desafio de camundongos (Costa *et al.*, 2007, Costa *et al*, 2006).

Um plasmídeo vacinal quimérico com o vírus DENV-2 e o vírus da encefalite japonesa foram desenvolvidos por um grupo de pesquisadores liderado por Chang. Após desafio com DENV-2 os camundongos inoculados com o plasmídeo apresentaram proteção satisfatória (Chang *et al*, 2003).

Blair e colaboradores descreveram a construção e a eficácia de uma vacina de DNA recombinante contra o vírus DENV-3, constituída de um plasmídeo contendo os genes de prM e E deste mesmo vírus. Seus resultados indicam uma boa expressão da proteína E. Em cinco dos seis macacos *Aotus nancymae*, nos quais o plasmídeo recombinante foi inoculado, houve produção significativa de anticorpos IgG anti-DENV-3 e os animais demonstraram uma proteção parcial contra este sorotipo viral, sendo que um deles apresentou proteção total quando desafiado com DENV-3 (Blair *et al*, 2006).

Devido ao grande potencial desta nova linha de pesquisa, nós decidimos produzir e aprimorar uma vacina recombinante para os DENV. Visando essas pesquisas, foi construído, por nosso grupo (Ocazionez e Fonseca, 2001), um candidato vacinal contra o vírus dengue, utilizando um plasmídeo pCI Vector

(Promega) expressando a proteína E truncada do vírus DENV-2, sem a expressão concomitante da proteína prM, com a finalidade de redução do tamanho do inserto a ser clonado, facilitando a produção de uma vacina tetravalente em um único plasmídeo. Assim, o plasmídeo recombinante expressava a seqüência sinal da proteína E e 94% de seus nucleotídeos, e foi denominado pCID2Et. Vale ressaltar que experimentos prévios demonstraram que a expressão da proteína E integral levava a baixos níveis de detecção de E secretada, e a hipótese levantada foi a de que a presença da seqüência-sinal para ancoramento da proteína à membrana, localizada na região carboxi-terminal da proteína estaria levando a esse tipo de resultado. Desta forma, foi decidido que a proteína E truncada (com ausência da região carboxi-terminal) seria inserida ao plasmídeo vacinal. Esse plasmídeo foi construído a partir da ligação da seqüência nucleotídica responsável por codificar a proteína E truncada do vírus DENV-2 no vetor de expressão pCI, entre os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* (“upstream”) e *KpnI* (“downstream”). Testes demonstraram que a proteína E truncada foi corretamente expressa pela células transfectadas, porém em baixa quantidade, e que existia boa resposta específica contra o vírus da DENV-2 em camundongos imunizados gerada pelos plasmídeos recombinantes, mas apenas uma pequena porcentagem de camundongos imunizados com a preparação plasmidial foi protegida quando desafiados com o vírus DENV-2 (Ocazionez e Fonseca, 2002)..

No presente trabalho, a estratégia levantada para tentar contornar esse problema foi a inserção do gene da proteína prM “upstream” ao da proteína E do candidato vacinal pré-existente (pCID2Et). Isso se justifica pelo fato de que a proteína prM está intimamente relacionada com a síntese e o processamento

de E durante a replicação viral nas células infectadas (Ocazonez e Fonseca, 2001). A ausência da proteína prM no plasmídeo recombinante parece ter prejudicado os eventos de síntese e processamento de E, levando a uma redução na sua expressão, ou acarretando a modificação de algumas de suas características biológicas envolvidas na indução de resposta imune, ou ambos os fatores.

II. OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

Construção de cassetes de expressão contendo os genes responsáveis por codificar as proteínas prM/DENV-2 ou prM/DENV-3 “upstream” ao gene E/DENV-3 truncado já inserido no candidato vacinal pCID2Et, dessa forma aprimorando o candidato vacinal pré-existente; avaliar a expressão das novas construções em células Vero, analisando o efeito da inserção de cada um desses genes na expressão da proteína E truncada.

2.2 *Objetivos específicos*

- Amplificar os genes de prM/DENV-2 e prM/DENV-3.
- Clonar os genes de prM/DENV-2 e prM/DENV-3 em vetor de clonagem.
- Clonar os genes de prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no candidato vacinal (pCID2Et).
- Selecionar os clones recombinantes.
- Avaliação da expressão da proteína E truncada.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 APRIMORAMENTO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE VACINAL

3.1.1 Células e Plasmídeos

Células C6/36 foram mantidas em meio L15 (Leibovitz) a 28 °C e células Vero foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina, antibióticos e aminoácidos não-essenciais, a 37 °C. As células citadas constituem linhagens celulares já estabelecidas e em uso em nosso laboratório (Laboratório de Immunovirologia Molecular/Departamento de Biologia Geral/ Universidade Federal de Viçosa).

Plasmídeos de clonagem pGEM-T foram adquiridos junto à Promega Corporation, Madison, Wisconsin para inserção dos genes de prM e transformação de células *E.coli* DH5 α competentes.

Os plasmídeos pCI Vector (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) modificados para a expressão dos genes dos dengue vírus, contém uma potente região promotora (“enhancer”) derivado do citomegalovírus (CMV), um intron quimérico, um sinal de poliadenilação derivado do vírus SV40 (Simian vírus 40), um replicon de alto número de cópias, e uma região contendo um sítio de clonagem múltipla. É importante ressaltar que esses plasmídeos contém seqüências de dinucleotídeos não metilados ligados por ligações fosfodiésteres (motivos CpG), importantes no estímulo da resposta imune (Krieg *et al*, 1998). Yamamoto foi o primeiro a mostrar que oligodeoxinucleotídeos sintéticos (ODNs) com seqüências oriundas daquelas encontradas no DNA bacteriano poderiam ativar as células “natural killer” a secretarem interferon γ . Foi demonstrado que esta seqüência específica, que

consiste em um dinucleotídeo citidina-fosfato-guanosina (CpG) não metilado, encontrada de 16 a 20 vezes mais frequentemente no DNA bacteriano, era capaz de induzir uma resposta imune caracterizada pela produção de interleucinas (IL-6 e IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon- γ (Gurunathan *et al*, 2000). O plasmídeo utilizado nesse trabalho já expressava a seqüência sinal da proteína E e 94% de seus nucleotídeos, e foi denominado pCID2Et. Esse plasmídeo foi construído a partir da ligação da seqüência nucleotídica responsável por codificar a proteína E truncada do vírus DENV-2 no vetor de expressão pCI, entre os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* (“upstream”) e *KpnI* (“downstream”).

3.1.2 Estoques virais

Os vírus da dengue utilizados neste estudo foram pertencentes às cepas New Guinea C (DEN-2) e H87 (DENV-3) em uso corrente no nosso laboratório. O estoque viral foi produzido em células C6/36 crescidas em meio L15 contendo 10% de SFB, assim como provenientes de macerado de cérebros de camundongo.

3.1.2.1 Estoque viral proveniente de cultura celular

Garrafas de 50 cm³ foram semeadas com células C6/36 (células de linhagem contínua provenientes de *Aedes albopictus*) e crescidas a 28°C em meio L15 (GIBCO, New York, USA), suplementado com soro fetal bovino (2 a 10%), triptose (10%) e antibióticos (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1 mg/mL). Quando a camada celular atingiu confluência, as células foram infectadas com 25 μ L do vírus DENV-2 e 25 μ L do vírus DENV-3

(separadamente) e depois incubadas pelo período de 7 dias a mesma temperatura.

3.1.2.2 Estoque viral proveniente de macerado de cérebro de camundongo

Grupos de camundongos Swiss recém-nascidos, obtidos junto ao Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFV, foram inoculados por via intra-cerebral com o DENV-2 e DENV-3. Após aproximadamente 5 dias da infecção, quando os animais começaram a apresentar sinais de encefalite e paralisia, estes foram eutanasiados, congelados e os cérebros foram extraídos utilizando seringas de insulina (1 mL), macerados em PBS com albumina bovina a 7,5% e estocados a -70 °C.

3.1.3 Extração do RNA viral

Para a extração do RNA foi utilizado o reagente TRIzol® (Invitrogen, USA). Após adição de 750µl do reagente TRIzol®, foi adicionado 500µl do macerado de cérebro com DENV-2, que foi misturado por agitação ao tubo eppendorf, por 30 segundos, e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos.

Após este procedimento, foram adicionados 150µl de clorofórmio e a reação foi submetida a uma centrifugação a 12000 g por 15 minutos. A camada aquosa foi então retirada, precipitada com 500 µl de isopropanol e centrifugada a 12000 g por 15 minutos. O precipitado resultante foi então suspenso em etanol 75% gelado, estocado a -70°C por 12 horas e centrifugado a 12000 g por 5 minutos. O precipitado formado foi seco a temperatura ambiente, suspenso em 200 µl de água deionizada e estocado a -70°C.

3.1.4 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Após extração do RNA total das amostras, a primeira fita do cDNA foi confeccionada usando-se o kit Superscript™ (Invitrogen®, USA).

Para tanto, 1µl de “primer” randômico (pd(N)6) (Amersham-Pharmacia, USA) foi adicionado a aproximadamente 500µl de RNA extraído de cada amostra, sendo submetido a aquecimento por 10 minutos a 70 °C. Então, uma mistura contendo o tampão da transcriptase reversa, DTT, transcriptase reversa e dNTPs foi feita. Promoveu-se então o aquecimento desta mistura e, em seguida, foi adicionada a amostra. Em seguida, incubou-se a solução por 1 hora a 42°C, e por 1 minuto a 70°C, para desnaturar a transcriptase reversa.

3.1.5 Amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3

Para realizar a amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3, “primers” flanqueando a região responsável pela codificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 foram sintetizados. Esses “primers” foram desenhados de forma a inserir sítios únicos de restrição para as enzimas *XhoI* e *EcoRI*, que também foram utilizadas posteriormente para a clonagem dos mesmos no vetor de expressão pCID2Et.

As seqüências correspondentes aos “primers” construídos estão mostradas na Tabela 1.

"Primers"	Sequências	Tamanho do fragmento
prMDEN2EcoRI	5'-CCC GAA TTC TAG TGT CAT TGA AGG AGC GAC AG-3'	540 pb
prMDEN2XhoI	5'-GGG CTC GAG ATG TTC CAT TTA ACC ACA CGT AA-3'	
prMDEN3EcoRI	5'-CCC GAA TTC ATC TGT CAT GGA TGG GGT AAC-3'	540 pb
prMDEN3XhoI	5'-GGG CTC GAG TAC ACA TCG CTC TGT CTC ATG-3'	

Tabela 1. Seqüência dos "primers" utilizados na amplificação dos fragmentos das regiões prM/DENV-2 e prM/DENV-3.

3.1.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras contendo as fitas híbridas de RNA/cDNA foram amplificadas empregando-se a técnica de "polymerase chain reaction" (PCR) usando a polimerase da bactéria *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988) e os "primers" descritos no subitem anterior. Para as reações, foi feito um "mix" que continha, para cada amostra, 2,5 µL da solução tampão com KCl 10X, 1,5 µL de MgCl₂, 2,5 µL de dNTP, 0,5 µL de cada "primer" (senso e anti-senso) e 0,125 µL da enzima Taq DNA Polymerase (Fermentas, California, EUA). O volume final de cada reação de PCR foi de 25 µL, contendo 22 µL do "mix" e 3 µL da amostra de cDNA a ser testada.

A amplificação do DNA foi feita em 35 ciclos. A temperatura usada para separar as fitas de DNA foi de 94°C por 5 minutos e 95°C por 1 minuto, a de anelamento dos "primers" ao cDNA foi de 55°C por 2 minutos e a de extensão do fragmento de DNA a ser amplificado foi de 72°C por 12 minutos. Os fragmentos

de DNA amplificados corretamente, apresentando aproximadamente 540 pares de bases (pb), foram evidenciados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 1 µg/mL, visualizado à luz ultra-violeta e digitalizado pelo fotodocumentador Alpha DigiDoc (Sigma-Aldrich, Alemanha).

3.1.7 Preparação de bactérias competentes para a transformação

Bactérias *E. coli* DH5 α , previamente estocadas em nosso laboratório em meio LB/DMSO 10% (dimetilsulfóxido) foram semeadas em placas contendo LB/agar 1,5% e incubadas a 37°C por 18 horas. Uma das colônias isoladas foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido para crescimento durante 18-20 horas a 37 °C em “shaker” com agitação constante de 180 rpm, e então 0,5 mL desta cultura foi inoculado em 50 mL de meio LB para novo crescimento a 18°C. As bactérias foram colhidas em fase exponencial de crescimento, que foi determinada quando a absorbância a 550 nm estava em aproximadamente 0,6 (OD 0,6). As bactérias foram então sedimentadas por centrifugação a 4.000 g por 10 minutos a 4°C, e logo suspensas em 0,5 volumes de uma solução de CaCl₂ 50 mM. Após 2 horas de incubação em gelo, as bactérias foram novamente centrifugadas e o precipitado foi suspenso em 0,08 volumes de solução tampão FSB (acetato de potássio 10 mM pH 7,5; MnCl₂.4H₂O 45 mM; CaCl₂.2 H₂O 10 mM; KCl 100 mM; glicerol 10%). Para armazenamento das bactérias em freezer -70°C foi adicionado DMSO a 10%. As bactérias foram aliquotadas em volumes de 200 µL, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente estocadas a -70°C.

3.1.8 Clonagem dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no plasmídeo de clonagem pGEM-T

A ligação dos fragmentos de DNA obtidos na amplificação do cDNA com os “primers” descritos anteriormente e que apresentavam o tamanho esperado de 540 pb, sem digestão prévia com enzimas de restrição, ao plasmídeo de clonagem pGEM-T foi feita com a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs, Massachussets, EUA) e os produtos dessa ligação foram utilizados na transformação de bactérias competentes *E.coli* DH5 α , tendo em vista a produção de clones de plasmídeos recombinantes expressando a prM dos vírus dengue (Figura 2).

Para a ligação T-A, aproximadamente 3 μ L dos produtos da RT-PCR foram usados numa reação de 10 μ L que continha 5 μ L da solução tampão 2X, 1 μ L do vetor pGEM-T e 1 μ L da enzima T4 ligase. A reação foi homogeneizada suavemente e mantida a 4 °C “overnight”. O produto dessa reação foi utilizado para a transformação de células competentes pelo método do choque térmico.

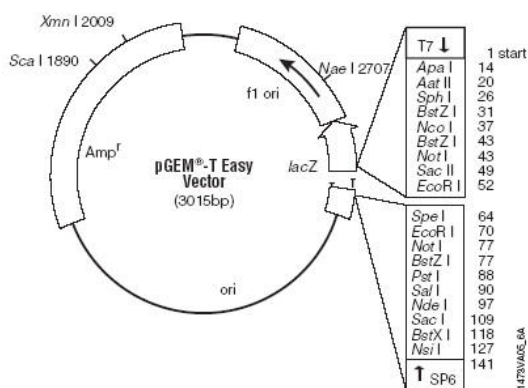


Figura 2. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin)

3.1.9 Transformação de células competentes DH5 α

Para a transformação de células competentes com o produto da ligação, as alíquotas de células foram descongeladas em banho de gelo e 5 μ L das reações de ligação foram adicionados às alíquotas, que foram mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram levadas ao banho-maria a 42°C por exatamente 30 segundos e depois rapidamente levadas ao gelo novamente. Foram adicionados 800 μ L de meio SOC a cada alíquota de células, que então foram levadas ao “shaker” a 37°C e agitação de 150 rpm, por 1 hora. Após agitação, 50-100 μ L de cada cultura foram semeados em placas contendo LB/agar 1,5% contendo antibiótico (ampicilina 100 μ g/mL) com auxílio de uma alça de Drigalski, até esgotar toda a suspensão na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas (modificado de Sambrook et al,1989). As colônias obtidas nas placas de transformação foram processadas para isolamento do DNA plasmidial.

3.1.10 Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas

Cada colônia obtida das transformações foi cultivada em 3 mL de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/mL a 37 °C, sob agitação constante de 180 rpm, por aproximadamente 18 horas, e os plasmídeos foram extraídos através do método da lise alcalina. As suspensões bacterianas foram centrifugadas por 10.000 g por 2 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados de células foram suspensos em 200 μ L de tampão de suspensão (glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. A cada amostra foram adicionados 400 μ L de uma solução alcalina fresca ou tampão de lise (NaOH 0,2N; SDS 1%), e estas foram

homogeneizadas e incubadas em gelo por 5 minutos. Em seguida, 300 µL de solução de acetato de amônio 7,5 M foram adicionados a cada amostra, e estas foram incubadas em gelo por, no mínimo, 40 minutos para a precipitação de RNA de alto peso molecular e DNA cromossomal. Procedeu-se à centrifugação destas amostras a 10.000 g por 3 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL, e nestes novos recipientes adicionou-se 0,6 volumes (aproximadamente 480 µL) de isopropanol, incubando-os por 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas por 15.000 g por 10 minutos para a sedimentação do DNA plasmidial. Os precipitados obtidos foram lavados com etanol 70%, suspensos em 50 µL de água deionizada e armazenado em freezer a -20 °C.

O DNA plasmidial extraído das colônias transformantes foi submetido à reação de PCR para a detecção de clones que foram efetivamente transformados com o vetor pGEM-T contendo o inserto de interesse, correspondente aos fragmentos de prM/DENV-2 e prM/DENV-3. Os produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 1,2% submetido a luz violeta e digitalizado pelo fotodocumentador Alpha DigiDoc (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os clones positivos para a presença dos insertos foram estocados a -70 °C, na proporção de 70% de suspensão bacteriana em LB líquido para 30% de glicerol estéril.

3.1.11 Ensaios de restrição

Os plasmídeos recombinantes purificados foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas de restrição previamente selecionadas: *EcoRI* e *XhoI* (Invitrogen, Califórnia, EUA) para a liberação dos fragmentos de

aproximadamente 540 pb correspondentes aos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3. As reações foram realizadas conforme instruções do fabricante, num volume final de 23 μ L contendo 1U da enzima por μ g de DNA. Os volumes utilizados foram de 2 μ L de Tampão React 2, 17 μ L do plasmídeo pGEM-T com o inserto de aproximadamente 540 pb e 1 μ L de XhoI. As reações foram levadas ao banho-maria 37 °C “overnight” e em seguida, mais 2 μ L de tampão React 3 e 1 μ L de *EcoRI* foram adicionados às reações, mantendo-as novamente em banho-maria 37°C por aproximadamente 5 horas. Os fragmentos de tamanho esperado foram evidenciados em gel de agarose 1,2% visualizado à luz ultravioleta e recuperados do gel pelo “kit” Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), mencionado anteriormente.

O plasmídeo vacinal recombinante também foi submetido à digestão enzimática pelas mesmas enzimas e utilizando o mesmo protocolo mencionado acima, para a formação de extremidades coesivas capazes de receber o inserto correspondente a prM-2 e prM-3 e ligá-lo na orientação correta para expressão no vetor pCID2Et. Os plasmídeos digeridos foram visualizados também em gel de agarose 0,8% submetido à luz ultravioleta e recuperados do gel através do “kit” de purificação citado anteriormente.

3.1.12 Clonagem dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no plasmídeo de expressão pCID2Et

Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 purificados anteriormente foram ligados ao plasmídeo de

expressão pCID2Et. As reações de ligação dos genes prM ao pCID2Et digerido foram feitas num volume final de 20 μ L, contendo 2 μ L da solução tampão 2X, 12 μ L do inserto digerido, 1 μ L do pCID2Et digerido e 1 μ L da enzima T4 ligase (New England Biolabs, Beverly, MA/ Bioagency, São Paulo). As reações foram homeogeneizadas e mantidas a 4 °C “overnight”.

Após a ligação, bactérias competentes foram transformadas seguindo o mesmo protocolo descrito no subitem “Transformação de células competentes DH5 α ”. As colônias transformantes obtidas nas placas contendo LB/agar 1,5% e ampicilina 100 μ g/mL foram coletadas e processadas para “screening” através do isolamento do DNA plasmidial pelo método da lise alcalina, conforme descrito anteriormente.

Os DNAs plasmidiais obtidos foram submetidos a PCR para a amplificação dos insertos de aproximadamente 540 pb clonados nos vetores pCID2Et. Os clones positivos para a presença dos insertos foram estocados a -70°C, na proporção de 70% de suspensão bacteriana em LB líquido para 30% de glicerol estéril.

Clones recombinantes contendo os genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 foram selecionados e chamados respectivamente de pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM, e os plasmídeos resultantes foram transfectados em células Vero. Após a transfecção, as células e seus sobrenadantes foram submetidos a reação de imunofluorescência indireta, ELISA sanduíche, imunoprecipitação seguida de SDS-PAGE e imunoblotting e a uma reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (“real-time” PCR) com o intuito de detectar a expressão das proteínas prM, conforme será descrito adiante.

3.1.13 Sequenciamento dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3

Foi realizado o sequenciamento dos insertos prM/DENV-2 e prM/DENV-3 nos plasmídeos pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM para a verificação da correta amplificação e clonagem dos insertos. O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Genômica - BIOAGRO/UFV, utilizando o seqüenciador automático MegaBACE™ 500 (GE Healthcare, Inglaterra). As amostras dos plasmídeos pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM foram enviadas a este laboratório na concentração de 75 a 100 ng/μL, assim como os “primers” específicos para a amplificação de seus insertos, na concentração de 2,5 ng num volume final de 3 μL.

3.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

3.2.1 Transfecção com os DNAs plasmidiais recombinantes

Ambos os clones recombinantes vacinais pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM selecionados através das estratégias de clonagem descritas acima foram analisados bioquimicamente. Os mesmos foram transfectados em culturas de células Vero utilizando o método da transfecção transiente através da precipitação do DNA com fosfato de cálcio e cloroquina (Sambrook *et al*, 1989). Para tanto, os DNAs plasmidiais recombinantes nas doses de 30 μg e 50 μg, assim como o pCI foram transfectados através do procedimento que será descrito a seguir. Inicialmente, culturas de células Vero em garrafas de 50 cm³ cujas monocamadas estavam confluentes foram escolhidas e tiveram seus

meios de cultura (MEM suplementado com 10% soro fetal bovino) trocados 2 horas antes do procedimento de transfecção, mantendo-as em estufa a 37°C. Em seguida, foram feitas as reações de precipitação dos DNAs plasmidiais contendo, para cada reação, a concentração desejada de DNA (30 µg e 50 µg), 60 µL de CaCl₂ 2M e tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) para atingir um volume final de 480 µL. Em um segundo tubo foi colocado, para cada reação, 480 µL de tampão HBS 2X (NaCl 280mM; HEPES 50 mM; Na₂HPO₄ 1,5 mM; pH 7,2). Com o auxílio de uma pipeta, o conteúdo do primeiro tubo foi misturado gota a gota, sob agitação leve e constante, ao tubo com HBS 2X. As misturas, com aparência turva, foram mantidas em temperatura ambiente por 45 minutos, sob agitação. As suspensões foram então colocadas, gota a gota, nas garrafas com as células Vero e 200 µL de cloroquina 2 mg/mL foram adicionados. As células foram então incubadas em estufa a 37 °C por 5 horas. Em seguida, os meios de cultura contendo as suspensões de DNA foram aspirados e as células lavadas com PBS 1X. Por fim, foi adicionado 10 mL de novo meio de cultura e as células foram incubadas por períodos de 48h e 72h em estufa a 37 °C. Após esse período, foram coletados os sobrenadantes e as células transfectadas das culturas.

3.2.3 ELISA sanduíche

Microplacas de poliestireno, de fundo chato e 96 poços (Corning, México) foram sensibilizadas com o anticorpo anti-dengue humano diluído a 1:200 em PBS 1X. As placas foram incubadas “overnight” a temperatura ambiente e então lavadas e bloqueadas com solução de PBS/caseína 3% pH 7,2. Os sobrenadantes e extratos celulares oriundos das culturas de células transfectadas

com pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM a 30 μ g e 50 μ g foram adicionados aos poços da placa sensibilizada, sendo que cada amostra foi testada em duplicata, juntamente com dois controles positivos e dois controles negativos, e incubados por 2 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. A placa foi então lavada vigorosamente com PBS 1X 5 vezes por 5 minutos. Em seguida, o anticorpo primário foi adicionado (MIAF anti-proteína E de DENV-2 diluído 1:200 em PBS 1X), incubando-se a placa novamente por 2 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada vigorosamente com PBS 1X 5 vezes por 5 minutos. O conjugado usado na etapa seguinte foi um anticorpo anti-camundongo marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, Alemanha) diluído a 1:200 em PBS 1X. Após uma incubação de 2 horas em câmara úmida a temperatura ambiente e novas lavagens com PBS, o substrato Sigma FAST™ OPD (diidrocloreto de orto-fenilediamina) (Sigma-Aldrich, Alemanha) foi adicionado a cada poço da placa, conforme indicação do fabricante. Em recipiente à parte, foi diluído 1 tablete de OPD e 1 tablete de uréia-peróxido de hidrogênio em 20 mL de água destilada, no máximo 1 hora antes do uso. A cada poço foi adicionado 200 μ L desta solução. A placa foi incubada com o substrato por 30 minutos e então procedeu-se à leitura das densidades óticas (OD) de cada amostra a 450 nm em aparelho leitor de microplacas de ELISA. Foram consideradas positivas as amostras cujas ODs foram maiores do que a média das ODs dos controles negativos acrescidos de 2 desvios-padrão.

3.2.4 Imunoprecipitação

As amostras de extratos celulares das culturas transfectadas foram submetidas a uma imunoprecipitação com o intuito de concentrar as proteínas expressas pelos vetores de expressão nas células para uma melhor visualização em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e detecção em imunoblotting. As amostras (1 mL para os extratos celulares) foram postas em reação com 0,1 v de MIAF anti-proteína E de DENV-2 diluídos a 1:100 em PBS 1X e 0,1 v de Proteína A Sepharose (GE, EUA) suspensa em PBS. As reações foram mantidas em banho de gelo sob agitação constante “overnight”. Em seguida os imunocomplexos foram recuperados por centrifugação a 12.000g por 30 segundos e lavados por 3 vezes com PBS, realizando uma nova centrifugação a cada lavagem. Após a última lavagem, os imunocomplexos sedimentados foram suspensos em 50 µL de solução tampão redutora (SDS 10%; beta-mercaptoetanol 10 mM; glicerol 20%; Tris-HCl pH 6,8 0,2M; azul de bromofenol 0,05%), fervidos por 5 minutos e submetidos a separação eletroforética das proteínas.

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os imunoprecipitados oriundos de extratos celulares e sobrenadantes das culturas transfectadas foram avaliados quanto ao seu perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Sambrook *et al*, 1989). Para tanto, os imunoprecipitados já suspensos em solução tampão redutora e fervidos a 100°C por 5 minutos, juntamente com o marcador de peso molecular de proteínas (“Molecular Weight Marker”, Sigma-Aldrich, Alemanha), foram aplicados em gel de poliacrilamida

10% e a eletroforese foi conduzida em solução tampão de corrida (Tris 25 mM; EDTA 1,95 mM; glicina 0,12 M; SDS 0,1% pH 8,3), a uma voltagem constante de 100V durante 3 horas. As bandas protéicas foram visualizadas através da coloração pelo método da prata amoniacal (Sambrook *et al*, 1989). Brevemente, após a interrupção da eletroforese, o gel foi colocado em uma solução fixadora (metanol 50%; ácido acético 7%) por 2 horas. Em seguida foi lavado por 3 vezes com etanol 50% , 1 vez com tiosulfato de sódio 0,02% e mais 3 vezes com água destilada. Em seguida, foi incubado por 30 minutos com solução de nitrato de prata 0,2% ao abrigo da luz. As bandas foram então reveladas através da incubação com gel com solução reveladora (100 mL de solução de carbonato de sódio 5%; 1 mL de tiosulfato de sódio 0,02%; 25 µL formaldeído 37%), até que as bandas se tornassem visíveis. A reação então foi parada com 3 mL de ácido acético P.A. e o gel fotografado. Após a separação eletroforética das proteínas e coloração através do método da prata amoniacal, as bandas protéicas obtidas foram submetidas a densitometria utilizando o “software” ImageJ (Image Analysing Software, Alemanha).

3.2.6 Immunoblotting

Para a realização do “imunoblotting”, foi realizado um SDS-PAGE seguido da transferência das proteínas separadas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose. Após essa transferência, a membrana foi corada com corante Ponceau S (Sigma-Aldrich, Alemanha) por 10 minutos para a evidência inicial das bandas. A canaleta com o marcador de peso molecular foi recortada e submetida à coloração com amido “black” (Sigma-Aldrich, Alemanha). O restante da membrana foi então descorada com água destilada e

bloqueada “overnight” com uma solução de PBS/Tween 0,5%/caseína 3%. Em seguida ao bloqueio, a membrana foi lavada 2 vezes por 5 minutos com PBS/Tween 0,5% e incubada por 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação constante de 80 rpm, com um “pool” de anticorpos humanos anti-dengue diluído a 1:100 em PBS. A membrana então foi novamente lavada 2 vezes por 5 minutos com PBS/Tween 0,5% e incubada por mais 2 horas a temperatura ambiente, sob agitação constante de 80 rpm, com o anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, Alemanha) e a seguir mais uma vez lavada como descrito acima. As bandas foram reveladas pela adição do substrato Sigma FAST™ DAB peroxidase substrate (Sigma-Aldrich, Alemanha), de acordo com indicação do fabricante. Em recipiente à parte, foi diluído 1 tablete de DAB (3,3'-diaminobenzidina) em 10 mL de água destilada e adicionou-se 50 mL de H₂O₂, no máximo 1 hora antes do uso. A membrana foi incubada com o substrato por 10 minutos e então esta pode ser fotografada, após montagem com a canaleta do marcador de peso molecular que foi submetida à coloração com amido “black”.

3.2.7 Imunofluorescência indireta

A expressão das proteínas recombinantes do vírus da dengue foi avaliada através da detecção das proteínas virais em células transfectadas fixadas através de ensaios de imunofluorescência. Para tanto, foram realizadas culturas e transfecção de células Vero em placas para cultura celular com 6 poços contendo lamínulas de vidro no fundo dos poços. Após o período de 72 horas da transfecção, as placas de cultura foram lavadas por 2 vezes por 5 minutos com PBS 1X e as células foram fixadas às lamínulas com acetona gelada por 15

minutos. As lamínulas foram então cobertas com anticorpos monoclonais de fluido ascítico de camundongo (MIAF) anti-proteína E de DENV-2 diluído 1:10 como anticorpo primário e incubadas por 1 hora em câmara úmida a 37°C. Em seguida, foram lavadas por 3 vezes com PBS por 5 minutos. O complexo antígeno-anticorpo foi detectado adicionando-se 30 µL do conjugado anti-IgG de camundongo marcado com FITC (isotiocianato de fluoresceína), diluído 1:200 em PBS 1X e incubando-se a reação por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. Após incubação as lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos. As células foram então contra-coradas com DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) por 5 minutos e depois mais uma vez lavadas com PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos. As lamínulas foram então montadas sobre uma lâmina de vidro e levadas para visualização ao microscópio de fluorescência.

3.2.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Após 48h e 72h, os lisados celulares foram colhidos, clareados por centrifugação a 10.000 g por 2 minutos e submetidos à extração do RNA e a confecção do DNA complementar, conforme descrito anteriormente. A avaliação da expressão das proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 perante a transfecção foi realizada através da técnica de PCR em tempo real onde a quantificação destes RNAs mensageiros foi comparada à expressão dos RNAs mensageiros de um gene constitutivo que foi o da β -actina. Para tanto, aproximadamente 2 µg do cDNA total oriundo dos lisados celulares foram usados para a PCR em tempo real, numa reação de 50 µL que continha 2 µM dos “primers” sense e antisense específicos para as proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 (Tabela 1), 20 U/µl do inibidor de RNase e 12,5 µl do “Master Mix”

SyBr Green PCR. As condições de ciclagem foram 95 °C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 2 minutos e 72 °C por 2 minutos. A quantificação da expressão foi realizada através do software Gene Amp® 5700 Sequence Detection System Version 1.3 (Applied Biosystems).

IV.RESULTADOS

4.1 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE VACINAL

4.1.1 Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR)

Após extração de RNA total das amostras com TRIzol® (Invitrogen, CA, USA), a primeira fita do cDNA foi confeccionada usando o “kit” Superscript™ (Invitrogen, Califórnia, EUA). Após a confecção do DNA complementar foi realizada a reação em cadeia da polimerase, cujos resultados das amplificações oriundas dos “primers” “desenhados” previamente evidenciaram fragmentos do tamanho esperado de aproximadamente 540 pb. Estes fragmentos foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídeo 1µg/mL, visualizados à luz ultravioleta e digitalizados pelo fotodocumentador Alpha DigiDoc (Sigma-Aldrich, Alemanha), conforme demonstrado na Figura 3.

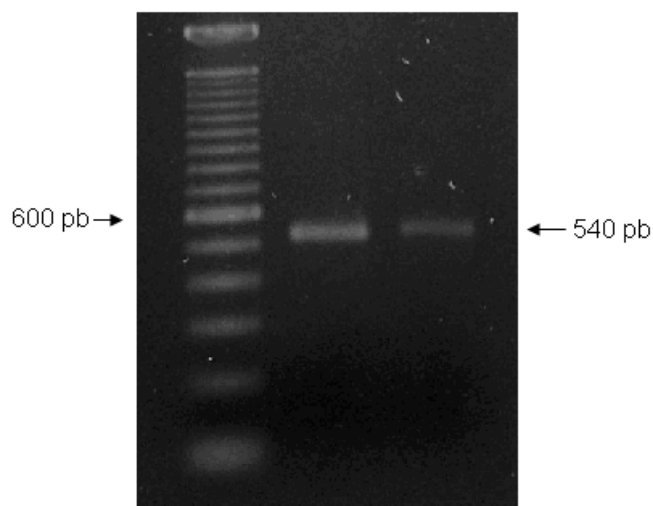


Figura 3. Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador de DNA 100 pb (100 pb DNA Ladder, Invitrogen, Califórnia, EUA) e os fragmentos de aproximadamente 540 pb correspondentes a prM/DENV-2 e prM/DENV-3.

4.1.2. Clonagem em vetor de clonagem pGEM-T

Após purificação das bandas dos fragmentos amplificados a partir do cDNA do DENV-2 e DENV-3 (utilizando o “kit” Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), os mesmos foram clonados no vetor de clonagem pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). Após a transformação de células competentes, os plasmídeos recombinantes foram identificados através da reação em cadeia da polimerase para a amplificação dos insertos ligados ao vetor de clonagem. Diversos clones foram detectados, tanto na ligação do inserto prM/DENV-2 quanto prM/DENV-3, como demonstrado na Figura 4.

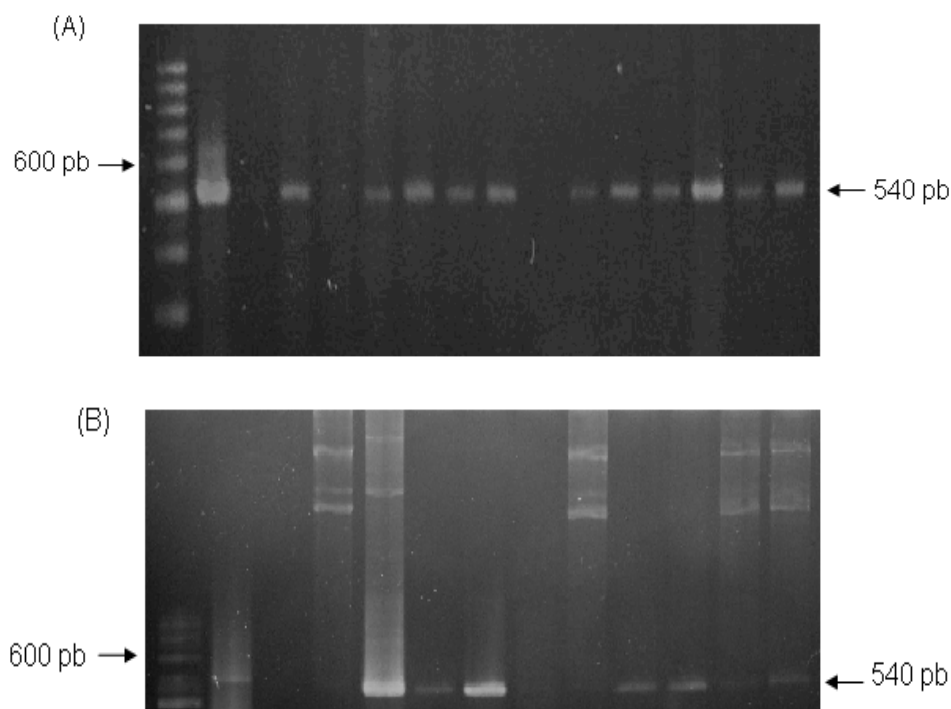


Figura 4. (A) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, controle positivo, controle negativo, clones apresentando os fragmentos de aproximadamente 540 pb correspondentes a prM/DENV-2. (B) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, controle positivo, controle negativo, clones apresentando os fragmentos de aproximadamente 540 pb correspondentes a prM/DENV-3.

4.1.3. Clonagem em vetor de expressão pCID2Et

Após a purificação, os plasmídeos recombinantes (pGEM-T/ prM/DENV-2 e pGEM-T/ prM/DENV-3), assim como os vetores de expressão recombinantes já contendo o inserto correspondente à proteína E truncada (pCID2Et) foram submetidos à dupla digestão enzimática com as enzimas de

restrição previamente selecionadas (*EcoRI* e *XhoI*), evidenciados em gel de agarose e subsequentemente purificados do mesmo (Figura 5).

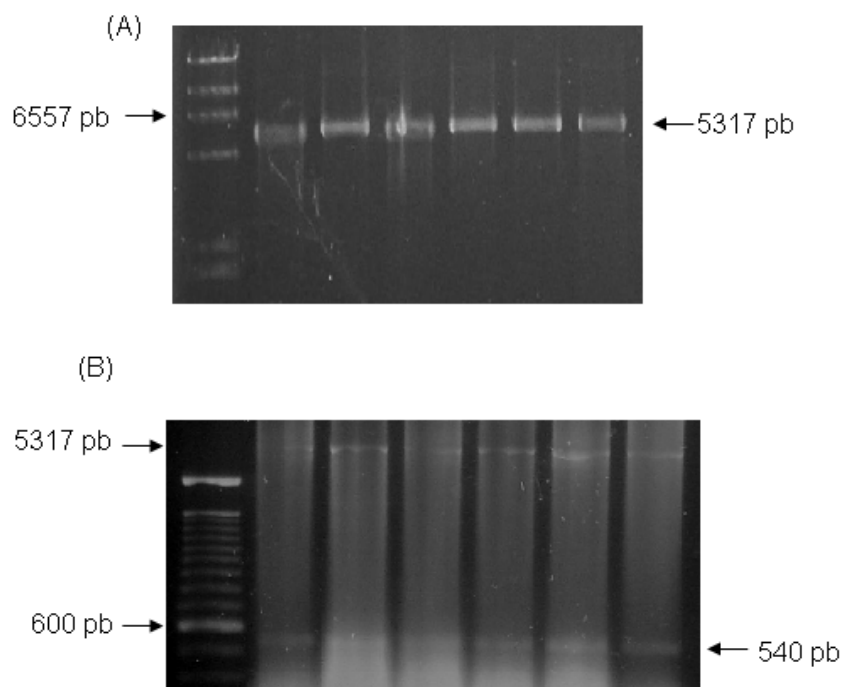


Figura 5. (A) Gel de agarose 0,8% mostrando, da esquerda para a direita, o marcador de DNA λ *Hind* III e os plasmídeos pCID2Et, de aproximadamente 5,3 kb, digeridos por *EcoRI* e *XhoI*. (B) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, 3 clones pGEM-T/ prM/DENV-2 duplamente digeridos e 3 clones pGEM-T/ prM/DENV-3 duplamente digeridos.

Após a digestão dupla dos fragmentos prM/DENV-2, prM/DENV-3, do plasmídeo de expressão pCID2Et e ligação com a enzima T4 ligase (New England Biolabs) conforme descrito anteriormente, foi feita a transformação de células competentes e os clones recombinantes foram identificados através da reação em cadeia da polimerase para a amplificação dos insertos ligados ao vetor de expressão. Diversos clones foram detectados, tanto na ligação do inserto prM/DENV-2 quanto prM/DENV-3, como demonstrado na Figura 6. Para

a avaliação da expressão das proteínas que foi realizado a seguir, somente o clone de número 42 pCID2EtD2prM e de número 26 pCID2EtD3prM foram escolhidos, de forma aleatória.

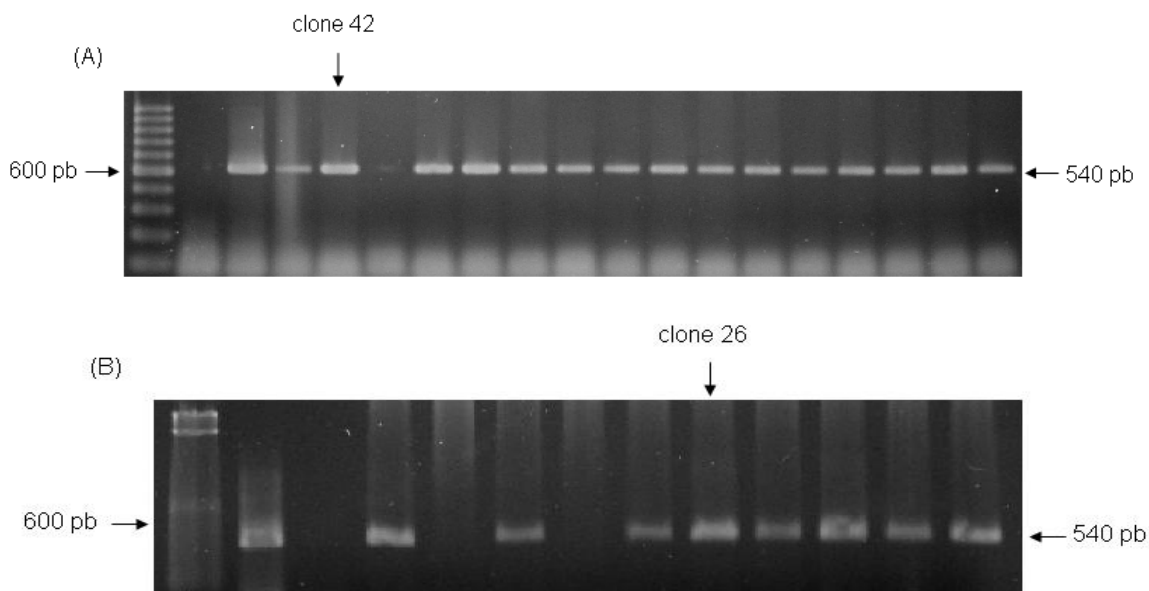


Figura 6. (A) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, controle negativo, controle positivo, clones recombinantes pCID2EtD2prM (destaque para o clone de número 42). (B) Gel de agarose 1,2% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de DNA 100 pb, controle positivo, controle negativo, clones recombinantes pCID2EtD3prM (destaque para o clone de número 26).

4.1.4. Sequenciamento dos insertos prM/DENV-2 e prM/DENV-3

Em seguida à detecção dos plasmídeos recombinantes pCID2EtD2prM (clone 42) e pCID2EtD3prM (clone 26), foi feito o sequenciamento dos nucleotídeos dos fragmentos inseridos nos mesmos, para a avaliação da correta amplificação e clonagem dos insertos. As seqüências obtidas foram alinhadas com as seqüências já existentes em bancos de dados através dos programas “BLASTn”, que faz a busca da identidade entre a seqüência de

nucleotídeos do inserto e o banco de dados de nucleotídeos disponíveis, e “BLASTx”, que a partir da sequência de nucleotídeos do inserto, realiza a tradução e compara com bancos de dados de aminoácidos já existentes. Também foi realizada a análise comparativa entre as duas seqüências de nucleotídeos através do programa “BLAST two sequences”, para a detecção do grau de identidade entre as duas seqüências obtidas do sequenciamento. (fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov) e uma análise comparativa entre as duas seqüências de aminoácidos através do programa “Clustal W” (fonte: www.ebi.ac.uk/clustalw).

Para o inserto prM/DENV-2, o sequenciamento e alinhamento dos nucleotídeos com o banco de dados revelou uma identidade de 98% (473 em 479 nucleotídeos) com a seqüência correspondente no DENV-2 selvagem, com apenas 1% de “gaps” (5 em 479 nucleotídeos). Com relação ao alinhamento dos aminoácidos, o inserto clonado apresentou 97% de identidade com a proteína precursora de membrana prM/DENV-2 e nenhum “gap” (Tabela 2).

Para o inserto prM/DENV-3, o sequenciamento e alinhamento dos nucleotídeos com o banco de dados revelou uma identidade de 96% (514 em 533 nucleotídeos) com a seqüência correspondente no DENV-3 selvagem, com apenas 2% de “gaps” (13 em 533 nucleotídeos). Com relação ao alinhamento dos aminoácidos, o inserto clonado apresentou 58% de identidade com a poliproteína do DENV-3 e nenhum “gap” (Tabela 2).

Inserto	BLASTn	BLASTx
prM/DENV-2	gb/AF038403.1/AF038403. Identities 473/479 (98%) Gaps 5/479 (1%).	refNP739582.2 (Membrane glycoprotein precursor Dengue virus 2). GENE ID: 1494449 DENV gp1 (Polyprotein Dengue virus 2). Identities 97/100 (97%) Positives 98/100 (98%) Gaps 0/100.
prM/DENV-3	emb/AJ563355.1/DVI563355. Identities 541/533 (96%) Gaps 12/533 (2%)	gb/ACL99113.1 (Polyprotein Dengue virus 3), gb/ACL99114.1 (Polyprotein Dengue virus 3). Identities 76/130 (58%) Positives 86/130 (66%) Gaps (1/130) 0%

Tabela 2. Alinhamento dos nucleotídeos BLASTn, e alinhamento da sequência traduzida BLASTx dos insertos prM/DENV-2 e prM/DENV-3. Ferramentas no site: www.ncbi.nlm.nih.gov.

A análise comparativa entre as duas seqüências mostrou haver uma identidade de 70% (287 em 409 nucleotídeos) entre as proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3, com 3% de “gaps” (13 em 409 nucleotídeos) e com um “E value” de 2^{-43} (Figura 7). Com relação ao alinhamento dos aminoácidos, os insertos clonados apresentaram 73% de identidade entre si, com nenhum “gap”, e com um “E value” de 9^{-28} (Figura 8).

```

Query 25  TTTTACTTCACGAGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGCGGGAAGAATGAAAGAGGAAAAT 84
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 470  TTTAACCACACGTAACGGAGAACCACACATGATCGTCAGTAGACAA-GAGAAAGGGAAAA 412

Query 85  CCCTACTTTTTAAGACAGCCTCTGGAATCAACATGTGCACACTCATAGCCATGGATTGG 144
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 411  GTCTTCTGTTTTAAACAGAGGATGGTGTGAACATGTGTACCCTCATGGCCATGGACCTTG 352

Query 145 GAGAGATGTGTGATGACACGGTCAACTTACAAA-TGCCCCACATTA--CCGAAGTGGAG 201
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 351  GTGAATTGTGTGAAGATAACAATCA-CGTACAAGCTGTCCTCTTCTCAGGCAGAAT--GAA 295

Query 202 CCTGAAGACATTGACTGCTGGTGCAACCTTACATCGAACATGGGTGACTTATGGAGCATG 261
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 294  CCAGAAGACATAGATTGTTGGTGCAACTCTACGTCCA-CATGGGTAACCTTATGGGACGTG 236

Query 262 CA--ATCAAGCTGGAGAGCATAGACGCGATAAGAGATCAGTGGCGTTAGCTCCCCATGTC 319
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 235  TACCACCA--CAGGAGAACACAGAAGAGAAAAAAGATCAGTGGCACTCGTTCCACATGTG 178

Query 320 GGCATGGGACTGGACACACGCACTCAAACCTGGATGTGCGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAA 379
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 177  GGAATGGGACTGGAGACACGAACTGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCTTGGAAACAT 118

Query 380 GTCGAGAAGGTAGAGACATGGGCCCTTAGGCACCCAGGGNTTACCATA 428
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 117  GCCCAGAGAATTGAAACTTGGATCTTGAGACATCCA-GGCTTTACCATA 70

```

Figura 7. Alinhamento entre as seqüências (prM/DENV-2 e prM/DENV-3) para a detecção do grau de identidade entre as duas seqüências, realizada pelo programa “BLAST two sequences”. Ferramentas no site: www.ncbi.nlm.nih.gov.

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

```

prM2      -----CPLLRQNEPEDIDC 14
prM3      TSPDGEPRMIVGEEKRKIPTFDSLWNQHVHSHGFGRDVHGQLTNAPTLPKWSLKTLTA 60
          . * * : . : : .

prM2      WCNSTSTWVITYGTCTTTGHRREKRSVALVPHVGMGLETRTETWMSSEGAWKHAQRIETW 74
prM3      GATLHRTWVITYGACNQAGEHRRDKRSVALAPHVGMGLDTRTQTWMSAEGAWRQVEKVETW 120
          .. *****: * : *****: *****: *****: *****: *****: *****:

prM2      ILHHPGFTIMAILAYTIGTTHFQRA 100
prM3      ALHHPG----- 126
          *****

```

Figura 8. Alinhamento entre as duas seqüências de aminoácidos correspondentes às seqüências nucleotídicas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 para a detecção do grau de identidade entre ambas, realizada pelo programa “Clustal W”. Ferramentas no site: www.ebi.ac.uk/clustalw.

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

4.2.1. ELISA sanduíche

Os sobrenadantes e extratos celulares oriundos das culturas de células transfectadas foram submetidos a um ELISA sanduíche com o intuito de detectar a expressão das proteínas estruturais E dos clones recombinantes vacinais. Todas as amostras de extratos celulares, referentes às transfecções com pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM nas concentrações de 30 µg e 50 µg mantidas em estufa a 37 °C por 72 horas, apresentaram resultados positivos na leitura do ELISA sanduíche para dengue, indicando a produção da proteína E pelas células Vero transfectadas. O mesmo resultado não foi observado para as amostras de sobrenadantes, para as quais só houve resultado positivo nas transfecções realizadas na concentração de 50 µg de DNA plasmidial. Observando esses resultados, para os próximos experimentos a serem realizados, adotou-se como padrão a transfecção com a concentração de 50 µg de DNA plasmidial, sendo as células mantidas a 37 °C por 72 horas antes da coleta dos sobrenadantes e extratos celulares.

4.2.2. Imunoprecipitação seguida de eletroforese das proteínas (SDS-PAGE)

As amostras de extratos celulares das culturas transfectadas com a concentração de 50 µg de DNA plasmidial, foram submetidas a uma imunoprecipitação utilizando anticorpos de fluidos ascíticos de camundongos imunes (MIAFs anti-proteína E de DENV-2) e Proteína A Sepharose (GE Healthcare, Inglaterra), conforme descrito anteriormente. Os imunoprecipitados,

suspensos em solução tampão redutora, foram submetidos a uma separação eletroforética das proteínas (SDS-PAGE) em gel contendo 10% de poliacrilamida na presença de SDS, sendo que as proteínas separadas por esse processo foram visualizadas através da coloração pelo método da prata amoniaca.

Conforme demonstrado na Figura 9, foi detectada uma banda protéica de aproximadamente 56-57 kDa, correspondente ao peso da proteína E, nos imunoprecipitados dos extratos celulares transfectados com os 2 clones recombinantes vacinais em estudo (pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM), sendo que uma banda mais evidente foi observada para o clone pCID2EtD3prM. As bandas proteicas obtidas foram submetidas a densitometria ótica utilizando o “software” ImageJ (Image Analysing Software, Alemanha). Utilizando esse método relativo de quantificação, obtivemos a indicação de que a proteína prM/DENV-3 aumentou a expressão da proteína E truncada em 67,02% com relação à proteína prM/DENV-2.

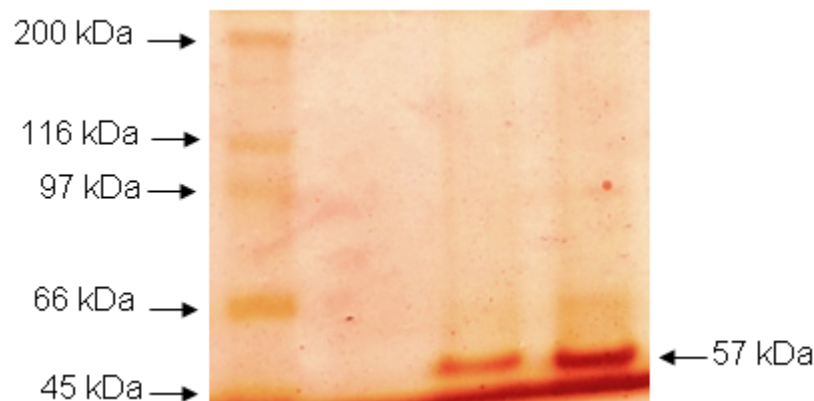


Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de peso molecular de proteínas (“Molecular Weight Marker”, Sigma-Aldrich, Alemanha), controle negativo de imunoprecipitado de extrato celular de células transfectadas com o vetor pCI “vazio”, imunoprecipitado de células transfectadas com pCID2EtD2prM e imunoprecipitado de células transfectadas com pCID2EtD3prM.

4.2.3. Imunoprecipitação seguida de “imunoblotting”

Após a imunoprecipitação e a separação eletroforética semelhantes às realizadas no subitem anterior, as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose a uma voltagem constante de 80 V durante 1 hora. As bandas protéicas foram visualizadas através do ensaio de “imunoblotting”, onde visualizamos uma banda protéica com aproximadamente 56-57 kDa em ambas as amostras de imunoprecipitados de extratos celulares provenientes das células transfectadas com os plasmídeos pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM (Figura 10).

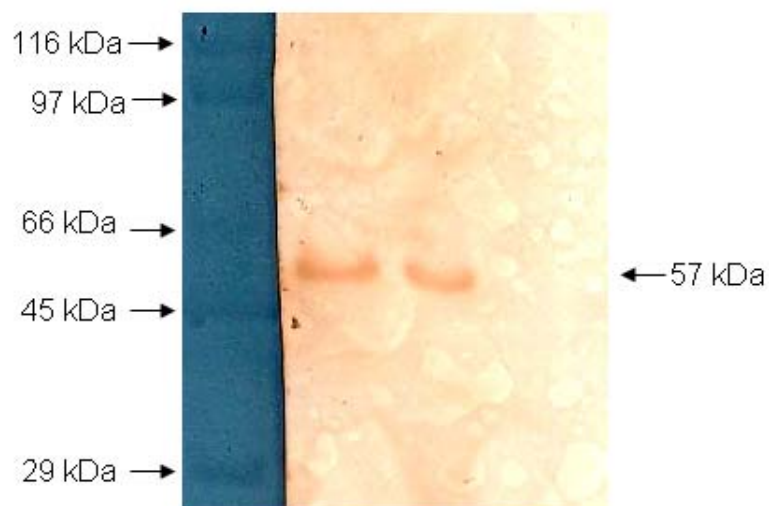


Figura 10. “Imunoblotting” mostrando, da esquerda para a direita, marcador de peso molecular de proteínas (“Molecular Weight Marker”, Sigma-Aldrich, Alemanha), imunoprecipitado de células transfectadas com pCID2EtD2prM e imunoprecipitado de células transfectadas com pCID2EtD3prM e controle negativo de imunoprecipitado de extrato celular de células transfectadas com o vetor pCI.

4.2.4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Os extratos celulares oriundos das culturas de células transfectadas com pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM a 30 μ g e 50 μ g, assim como os oriundos da transfecção com o vetor pCI, foram submetidos a uma reação da polimerase em cadeia em tempo real, precedida de uma transcrição reversa para a avaliação da quantidade de RNAs mensageiros correspondente às proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 e, conseqüentemente, da eficiência da expressão das proteínas estruturais nas células transfectadas.

Conforme demonstrado na Tabela 3, houve um aumento na transcrição do RNA mensageiro das amostras de extratos celulares com 72 horas de

transfecção, sendo que um aumento mais pronunciado foi observado para as células transfectadas com o clone pCID2EtD3prM.

Clone transfectado	Quantidade de DNA transfectado	Tempo de transfecção	prM/DENV-2	prM/DENV-3
pCID2EtD2prM	30 µg	48 horas	3,16	-
pCID2EtD2prM	50 µg	48 horas	3,86	-
pCID2EtD3prM	30 µg	72 horas	-	4,14
pCID2EtD3prM	50 µg	72 horas	-	6,96

Tabela 3. Número de vezes do aumento da expressão do RNA mensageiro nas amostras de células Vero transfectadas.

4.2.5. Imunofluorescência indireta

As células transfectadas com ambos os clones recombinantes pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM na concentração de 50 µg demonstraram fluorescência positiva, indicando a expressão das proteínas prM/E, conforme demonstrado na Figura 11.

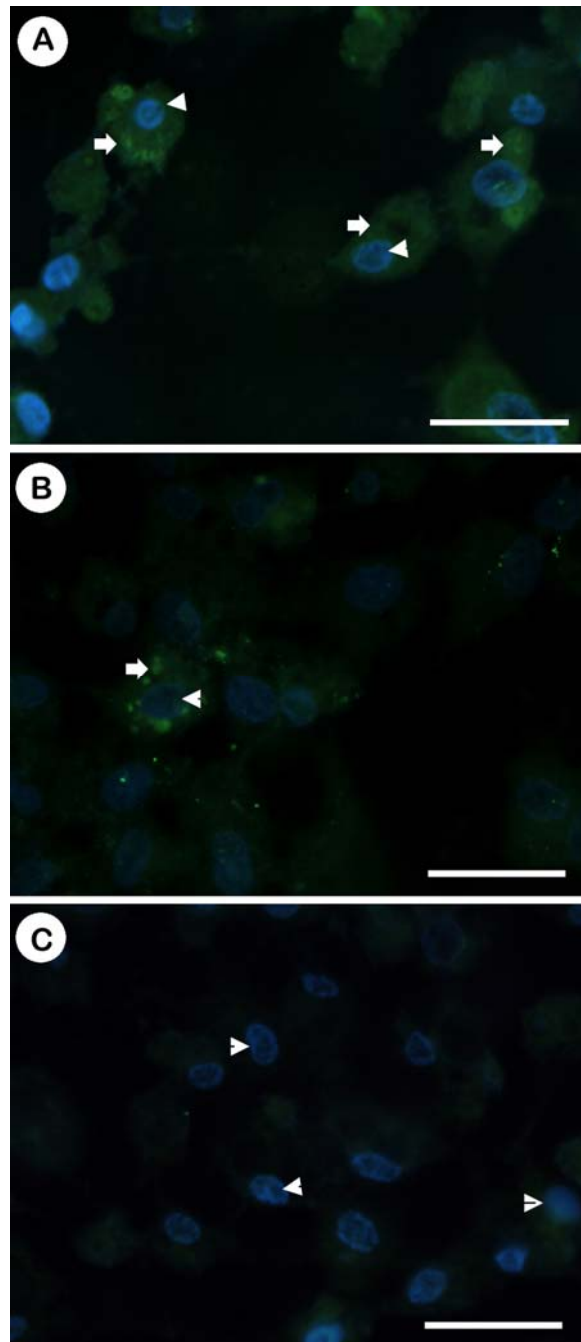


Figura 11. Detecção por imunofluorescência indireta com FITC (setas) das proteínas virais E em células Vero transfectadas e DAPI para o contraste nuclear (cabeças de setas). (A) Imunofluorescência positiva para a proteína E do vírus dengue (transfecção com pCID2EtD3prM), (B) Imunofluorescência positiva para a proteína E do vírus dengue (transfecção com pCID2EtD2prM), (C) Imunofluorescência negativa para dengue (transfecção com pCI). Barra = 30 μ m.

V. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo analisar o papel das proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 na expressão da proteína E truncada proveniente de DENV-2 de um plasmídeo recombinante vacinal já existente. Para tanto, nós aprimoramos o clone vacinal pCID2Et contra esse vírus construindo 2 outros clones a partir dele e os candidatos vacinais foram analisados com relação a expressão protéica “*in vitro*” . Essas construções contém os genes que codificam as proteínas E do DENV-2 e prM do DENV-2 (prM/DENV-2) e prM do DENV-3 (prM/DENV-3). A proteína E foi escolhida como parte da nossa vacina de DNA por ser a principal proteína estrutural dos DENV e por conter os principais epítomos neutralizantes dos flavivírus (Gubler, 1998). Anticorpos neutralizantes produzidos contra a proteína E possuem um papel importantíssimo na imunidade contra os DENV. Nós incluímos o gene responsável por codificar a proteína prM em nossas construções vacinais devido ao fato que os epítomos neutralizantes da proteína E contra os vírus parecem ser conformacionais, e estudos com outros flavivírus e com os DENV demonstraram que a manutenção conformacional da proteína E está associada com a co-expressão da proteína prM (Ocazionez e Fonseca, 2001; Fonseca *et al*, 1994). Além disso, Guirakoo e colaboradores demonstraram que, para o vírus da encefalite de Murray Valley, os virions que continham a proteína prM não processada eram mais ácido-resistentes que os que continham a prM processada ou madura, sugerindo que a prM tem uma função de “chaperona” e protetora da proteína E de mudanças conformacionais irreversíveis no compartimento ácido da via secretória celular (Guirakoo *et al*, 2006). Ocazionez

e Fonseca também demonstraram que a baixa proteção de uma vacina de DNA contra o DENV-2 possivelmente foi devida à fraca ativação do sistema imune resultante de uma imperfeita secreção da proteína E truncada devido a falta da proteína prM (Ocazionez e Fonseca, 2001).

No presente trabalho, partimos da existência de um vetor de expressão em nosso laboratório, já contendo o inserto referente à proteína E truncada do DENV-2, denominado pCID2Et, e tivemos como objetivo o aprimoramento desse candidato vacinal através da inserção do gene da proteína prM a fim de verificar se sua presença na construção do vetor vacinal aumentaria a expressão de E (Ocazionez e Fonseca, 2001). Blair e colaboradores descreveram a construção e a eficácia de uma vacina de DNA recombinante contra o vírus DENV-3, constituída de um plasmídeo contendo os genes de prM e E desse vírus. Seus resultados indicam uma boa expressão de E. Em cinco dos seis macacos *Aotus nancymae*, nos quais o plasmídeo recombinante foi inoculado por via intradérmica, houve a produção significativa de anticorpos IgG anti-DENV-3, e os animais se mostraram parcialmente protegidos contra esse mesmo sorotipo viral, sendo que um deles apresentou proteção total quando desafiado com DENV-3 (Blair *et al*, 2006).

Dessa forma, nosso intuito foi o de analisar a expressão de E induzida por esse vetor já existente, em presença tanto da seqüência correspondente à prM do mesmo sorotipo DENV-2 (pCID2EtD2prM) quanto da seqüência correspondente à mesma proteína prM, porém oriunda do sorotipo DENV-3 (pCID2EtD3prM). Para tanto, conduzimos experimentos para avaliar a qualidade da expressão da proteína E, assim como o provável aumento da taxa de expressão, quando comparada ao antigo vetor pCID2Et.

Ambos os novos clones recombinantes vacinais, pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM expressaram a proteína específica recombinante conforme demonstrado nos ensaios de imunofluorescência indireta, ELISA sanduíche, imunoprecipitação seguida de separação eletroforética das proteínas (SDS-PAGE) e de immunoblotting. Uma reação em cadeia da polimerase em tempo real (“real time” PCR) também foi feita para a realização de uma análise quantitativa da presença de RNAs mensageiros correspondentes aos insertos clonados.

O sequenciamento dos insertos clonados em ambos os clones recombinantes desenvolveu demonstrou que os fragmentos foram efetivamente clonados no vetor vacinal, apresentando índices de identidade de mais de 95% quando comparados a genomas já sequenciados existentes em bancos de dados de nucleotídeos. Esse fato foi corroborado pela análise das seqüências obtidas quando transformadas em seqüências de aminoácidos, o que nos levou a esperar uma correta expressão da proteína E truncada nos ensaios de expressão realizados a seguir. Além disso, quando as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram comparadas entre si, foi obtida uma identidade de 70% para a seqüência nucleotídica e 73% para a seqüência aminoacídica, revelando a relação entre as proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3.

Após a transfecção dos clones recombinantes foi realizado uma PCR em tempo real para checar a transcrição do RNA mensageiro responsável por codificar a proteína prM. A PCR em tempo real mostrou uma maior transcrição de RNA mensageiro para o inserto clonado nas amostras de extratos celulares que foram submetidas a 72 horas de transfecção com uma quantidade de 50

μg. Além disso, corroborando as nossas expectativas, houve uma expressão de 4,14 a 6,96 vezes maior nas células transfectadas com pCID2EtD3prM do que nas células transfectadas com pCID2EtD2prM, que por sua vez também apresentaram uma expressão de RNA mensageiro de 3,16 a 3,86 vezes maior do que o controle. Esses resultados mostram que os clones recombinantes vacinais pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM induziram a transcrição de RNAs mensageiros para a proteína estrutural prM, sendo que a transfecção com pCID2EtD3prM foi mais eficiente nessa indução.

Através do ensaio de ELISA sanduíche, observou-se uma maior presença da proteína E truncada nas amostras de extratos de células Vero transfectadas com ambos os clones recombinantes do que nas amostras de sobrenadantes, o que já era esperado uma vez que a expressão de proteínas heterólogas pelas células transfectadas é transiente. Deve-se também ter em mente que o ensaio ELISA sanduíche realizado foi somente qualitativo, e não quantitativo, embora tenha apresentado maiores valores de densidades óticas nas amostras de extratos celulares transfectadas com 50 μg de DNA e que foram mantidas por 72 horas antes da coleta das amostras. Um estudo realizado por Konishi e colaboradores demonstrou a produção de proteína E em tecidos musculares após a inoculação de 50 μg de uma vacina de DNA recombinante contra o vírus da encefalite japonesa, sendo que a concentração da proteína E no homogeneizado muscular com 1,2,3 e 4 dias após a inoculação com a vacina foi de 1.1, 1.0, 0.3 e <0.1 ng/mL, respectivamente (Konishi *et al*, 2003).

Na imunoprecipitação seguida de separação eletroforética das proteínas (SDS-PAGE) foi detectada uma banda protéica de aproximadamente 56-57 kDa, correspondente ao tamanho da proteína E, nos imunoprecipitados dos

extratos celulares transfectados com os 2 clones recombinantes vacinais em estudo (pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM), sendo uma banda mais evidente foi observada para o clone pCID2EtD3prM. As bandas protéicas obtidas submetidas à densitometria ótica apresentaram a indicação de que a proteína prM/DENV-3 aumentou a expressão da proteína E truncada em 67,02% com relação à proteína prM/DENV-2. O resultado é promissor e vai de encontro com nossas expectativas, porém convém notar que esse é um tipo de análise quantitativa relativa, e testes para a quantificação absoluta ainda deverão ser realizados para a confirmação desse dado.

Na imunoprecipitação seguida de “imunoblotting”, foi obtido um resultado semelhante ao do SDS-PAGE, comprovando a existência da proteína E nos extratos celulares das células transfectadas. As bandas observadas foram inclusive mais evidentes, o que já era esperado uma vez que o ensaio sorológico, como é o “imunoblotting”, apresenta uma sensibilidade maior em relação à coloração com a prata amoniacal. Assim como no SDS-PAGE, não foi detectada a presença da proteína E nos sobrenadantes das células Vero transfectadas com os clones recombinantes pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM pelo imunoblotting. Talvez a realização de testes mais sensíveis seja necessária com o intuito de detectar a proteína nessas amostras, uma vez que já é esperada a menor presença da mesma nos sobrenadantes, devido à característica de expressão transiente das proteínas heterólogas pelas vacinas de DNA (Dean *et al*, 2005).

A expressão da proteína estrutural E de DENV-2 pelas células Vero transfectadas pelos clones pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM foi mais uma vez provada através da imunofluorescência indireta, que se apresentou negativa

nas células Vero transfectadas com o vetor pCI, e positiva para as células transfectadas com 50 µg de cada um dos clones recombinantes vacinais desenvolvidos.

Baseados nesses experimentos podemos concluir que os clones recombinantes vacinais desenvolvidos para esse estudo foram capazes de aumentar a expressão da proteína estrutural E, sendo que a construção que continha a proteína prM/DENV-3 foi a mais eficiente.

VI. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados pelo presente trabalho, concluímos que:

- A amplificação e clonagem dos genes prM/DENV-2-2 e prM/DENV-3 no vetor vacinal pré-existente pCID2Et foi eficaz;
- Os clones recombinantes vacinais pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM expressaram corretamente a proteína estrutural E de DENV-2 em células Vero;

VII. PERSPECTIVAS

As próximas etapas do estudo iniciado por esse trabalho envolverá a purificação e quantificação das proteínas estruturais expressas pelas células Vero transfectadas e, mais adiante, o teste desses candidatos vacinais em modelo animal (camundongos BALB/c) para a avaliação do potencial imunogênico dos mesmos, envolvendo a quantificação e verificação da eficácia de anticorpos neutralizantes produzidos e testes de linfoproliferação frente ao estímulo da vacinação.

VIII. GLOSSÁRIO

Anticorpos neutralizantes Anticorpos capazes de se ligar e impedir a entrada do patógenos nas células-alvo.

Biobalística Técnica que utiliza microprojéteis em alta velocidade, que podem ser partículas de ouro ou tungstênio, recobertos com DNA de interesse, acelerados por pistolas de ar comprimido (“gene guns”) para penetrar a membrana a membrana de células de maneira não-letal. Dentro das células, o DNA é dissociado das partículas e pode ser reconhecido pela maquinaria celular de transcrição e tradução.

CAP 5’ Nucleotídeo especialmente alterado (guanina conectada ao RNA mensageiro através de uma ligação trifosfato 5’-5’ incomum) existente na extremidade 5’ de precursores de RNAs mensageiros, e no genoma de alguns vírus. O CAP 5’ garante a estabilidade da moléculas de RNA mensageiro durante o processo de sua tradução em proteínas.

Cauda PoliA Seqüência de nucleotídeos adenina (cerca de 200 unidades) localizada na extremidade 3’ de RNAs mensageiros e que tem a função de proteger a molécula da digestão por nucleases e auxiliar na tradução.

Carga Viral Número de cópias virais em uma unidade de volume de sangue (ou outros fluidos biológicos).

Complemento Proteínas solúveis no plasma que participam das defesas inatas e adquiridas do organismo. Reagem entre si para opsonizar patógenos e desencadear respostas inflamatórias.

DNA recombinante Seqüência de DNA artificial que resulta da combinação de diferentes seqüências de DNA, inclusive provenientes de diferentes tipos de organismos.

Domínio Regiões específicas dentro de uma molécula protéica, geralmente responsáveis por funções específicas da molécula.

Envelope Membrana que envolve o nucleocapsídeo de alguns vírus, composta basicamente de glicoproteínas e fosfolípidos provenientes da membrana da célula hospedeira e proteínas virais.

Gene “repórter” Gene que pode ser acoplado a outro gene de interesse, usados para determinar se esse gene de interesse está sendo expresso pela

célula. Geralmente oferecem características que podem ser detectadas e quantificadas, como emissão de fluorescência.

Nucleocapsídeo Cápsula protéica que envolve o material genético de vírus.

ORF “Open Reading Frame”. Um fragmento de DNA que é transcrito em uma molécula única de RNA mensageiro, independentemente de codificar para um ou mais genes. Localiza-se entre uma sequência de iniciação (“start codon”) e uma sequência de terminação (“stop codon”).

Plasmídeo Moléculas circulares duplas de DNA que se reproduzem independentemente do DNA cromossômico, aparecem principalmente em células bacterianas.

Proteases Enzimas que clivam ligações peptídicas, podem ter origens celulares, virais, bacterianas, etc.

Quimera Segmento de DNA que contém fragmentos provenientes de espécies ou cepas distintos.

Reatogenicidade Aparecimento de efeitos colaterais em resposta à administração de algum imunógeno, como uma vacina.

Trombocitopenia Redução da contagem de plaquetas no sangue periférico (inferior a $150.000/\text{mm}^3$).

Virulência Capacidade patogênica de um microorganismo, medida pela gravidade dos sintomas que produzem ou por seu poder de invadir os tecidos do hospedeiro.

IX. REFERÊNCIAS

- BENTE, D.A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue vírus infection. **Drug Discovery Today: Disease Models**, 2(1): 97-103. 2006.
- BLAIR, P.J.; KOCHER, T.J.; RAVIPRAKASH, K.; GUEVARA, C.; SALAZAR, M.; WU, S.; OLSON, J.G.; PORTER, K.R. Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 premembrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. **Vaccine**, 24: 1427-1432. 2006.
- CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annual reviews on Microbiology**, 44: 649-688. 1990.
- CHAMBERS, T.J.; TSAI, T.F.; PERVIKOF, Y.; MONATH, T.P. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report a World Health Organization meeting. **Vaccine**, 15: 1494-1502. 1997.
- CHANG, G.J.; HUNT, A.R.; HOLMES, D.A., SPRINGFIELD, T.; CHIUH, T.; ROEHRIG, J.T.; GUBLER, D.J. Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. **Virology**, 306: 170-180. 2003.
- CHUTINIMITKUL, S.; PAYUNGORN, S.; THEAMBOONLERS, A.; POOVORAWAN, Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. **Journal of Virological Methods**, 129: 8-15. 2005.
- COHEN, S.; POWELL, C.J.; DUBOIS, D.R.; HARTMAN, A.; SUMMERS, P.L.; ECKELS, K.H. Expression of the envelope antigen of dengue virus in vaccine strains of Salmonella. **Res. Microbiol.**, 141(7-8): 855-858. 1990.
- COSTA, S.M.; AZEVEDO, A.S.; PAES, M.V.; SARGES, F.S.; FREIRE, M.S.; ALVES, A.M.B. DNA vaccines against dengue vírus based on the *ns1* gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its

correlation to the immune response elicited in mice. **Virology**, 358 (2): 413-423. 2007.

COSTA, S.M.; FREIRE, M.S.; ALVES, A.M.B. DNA vaccine against the nonstructural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. **Vaccine**, 24: 4562-4564. 2006.

DEAN, H.J.; HAYNES, J.; SCHMALJOHN, C. The role of particle-mediated DNA vaccines in biodefense preparedness. **Advance Drug Delivery Reviews**, 57: 1315-1342. 2005.

DE PAULA, S.O.; FONSECA, B.A.L. Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 8(6): 390-398. 2004.

DE PAULA, S.O.; FONSECA, B.A.L. Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM-positive samples: comparison of whole blood, buffy-coat and serum as clinical samples. **Journal of Virological Methods**, 102: 113-117. 2002.

DE PAULA, S.O.; LIMA, D.M.; CLOUTEAU, M.; NETO, R.J.P.; FONSECA, B.A.L. Improved detection of Dengue-1 virus from IgM-positive serum samples using C6/36 cell cultures in association with RT-PCR. **Intervirology**, 46: 227-231. 2003.

DE PAULA, S.O.; NETO, R.J.P.; CORRÊA, J.A.C.T.; ASSUMPÇÃO, S.R.; COSTA, M.L.S.; LIMA, D.M.; FONSECA, B.A.L. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection of dengue virus in an endemic region: a validation study. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 96: 266-269. 2002.

DEUBEL, V.; BORDIER, M.; MEGRET, F.; GENTRY, M.K.; SCHLESINGER, J.J.; GIRARD, M. Processin, secretion and immunoreactivity of carboxy terminally truncated dengue-2 virus envelope proteins expressed in insect cells by recombinant baculoviruses. **Virology**, 180: 442-447. 1991.

DONNELLY, J.J.; ULMER, J.B.; SHIVER, J.W.; LIU, M.A. DNA Vaccines. **Annual Reviews on Immunology**, 15: 617-648. 1994.

FIELDS, B. **Virology**. 4. ed. Edina, MN, EUA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 819 p.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. **Principles of Virology**. 2. ed. Washington, WA, EUA: ASM Press, 2004. 918 p.

FONSECA, B.; PINCUS, S.; SHOPE, R.E.; PAOLETTI, E.; MASON, P.W. Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-I glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, 12(3): 279-285. 1994.

GUBLER, D.J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends in Microbiology**, 10(2): 100-103. 2002.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical and Microbiological Reviews**, 11(3): 480-496. 1998.

GUIRAKOO, F.; KITCHENER, S.; MORRISON, D.; FORRAT, R.; MCCARTHY, K.; NICHOLS, R., *et al.* Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. **Hum Vaccine** 2: 60-7. 2006.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, R.A. DNA Vaccines: Immunology, Application and Optimization. **Ann. Rev. Immunol.**, 18: 927-974. 2000.

GUY, B.; ALMOND, J.W. Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenge. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 31: 239-252. 2008.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**, 8: 69-80, 2004.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, 2: 33-42. 2002.

HALSTEAD, S.B. Dengue. **Lancet**, 370: 1644-1652. 2007.

HALSTEAD, S.B. Dengue diagnosis, treatment and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26: 17-18. 2005.

HALSTEAD, S.B.; HEINZ, F.X.; BARRETT, A.D.T.; ROEHRIG, J.T. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. **Vaccine**, 23: 849-856. 2005.

KAUTNER, I.; ROBINSON, M.J.; KUHNLE, U. Dengue virus infection: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and prevention. **The Journal of Pediatrics**, 131: 516-524. 1997.

KHANAM, S.; ETERMAD, B.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. Induction of neutralizing antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 74: 266–77. 2006.

KONISHI, E.; TERAZAWA, A.; FUJII, A. Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice. **Vaccine**, 21: 3713-3720. 2003.

KRIEG, A.M.; YI, A.K.; SCHORR, J.; DAVIS, H.L. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. **Trends in Microbiology**, 6(1): 23-27. 1998.

KUBELKA, C.K.; AZEREDO, E.L.; ZAGNE, S.M.O.; SANTIAGO, M.A.; GOUVEA, A.S.; SANTANA, A.A.; NEVES-SOUZA, P.C.F.; NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. **Immunobiology**, 204: 494-507. 2001.

KUHN, R.J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M.G.; PLETNEV, S.V.; CORVER, J.; LENCHES, E; JONES, C.T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P.R.; STRAUSS, E.G.; BAKER, T.S.; STRAUSS, J.H. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation and Fusion. **Cell**, 108: 717-725. 2002.

LEI, H. Y.; YEY, T.E.; LIU, H.S.; LIN, Y.S.; CHEN, S.H.; LIU, C.C. Immunopathogenesis of Dengue Virus Infections. **Journal of Biomedical Science**, 8: 377-388. 2001.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology on flaviviruses. **Advances in Viral Research**, 59: 23-61. 2003.

LIU, W. T.; LIN, W.T.; TSAI, C.C.; CHUANG, C.C.; LIAO, C.L.; LIN, H.C.; HUNG, Y.W.; HUANG, S.S.; LIANG, C.C.; HSU, H.L.; WANG, H.J.; LIU, Y.T. Enhanced immune response by amphotericin B following NS1 protein prime-oral recombinant *Salmonella* vaccine boost vaccination protects mice from dengue virus challenge. **Vaccine**, 24: 5852–5861. 2006.

MARIANNEAU, P.; FLAMAND, M.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Apoptotic cell death in response to dengue virus infection: the pathogenesis of dengue haemorrhagic fever revisited. **Clinical and Diagnostic Virology**, 10: 113-119. 1998.

MATSUI, K.; GROMOWSKI, G.D.; LI, L.; SCHUH, A.J.; LEE, J.C.; BARRETT, A.D.T. Characterization of dengue complex-reactive epitopes on dengue 3 virus envelope protein domain III. **Virology**, 384(1): 16-20. 2009.

MCBRIDE, W.J.H., OHMANN-BIELEFELDT, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection**, 2: 1041-1050, 2000.

McDONELL, W.M.; ASKARI, F.K. Molecular Medicine: DNA vaccines. **The New England Journal of Medicine**, 334: 42-45. 1996.

OCAZIONEZ, R.J.; FONSECA, B.A.L. Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice. **Vaccine**,19: 648-654. 2001.

PUTNAK, R.J.; COLLIER, B.A.; VOSS, G.; VAUGHN, D.W.; CLEMENTS, D.; PETERS, I., *et al.* An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, 23: 4442–4452. 2005.

RICO-HESSE, R., HARRISON, L.M., SALAS, R.A., TOVAR, D., NISALAK, A. RAMOS, C., BOSHEL, J., MESA, M.T.R., NOGUEIRA, R.M.R., ROSA, A.T. Origins of Dengue Type 2 Viruses Associated with Increased Pathogenicity in the Americas. **Virology**, 230: 244–251. 1997.

SABCHAREON, A.; LANG, J.; CHANTAVANICH, P.; YOKSAN, S.; FORRAT, R.; ATTANATH, P. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses. **American Journal of tropical Medicine and Hygiene**, 66: 264-272. 2002.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491. 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor laboratory press. Plainview, NY, USA, 1989.

THOMAS, S.J.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. Scientific consultation on cell mediated immunity (CMI) in dengue and dengue vaccine development. **Vaccine**, 27: 355-368. 2009.

VÁZQUEZ, S.; GUZMÁN, M.G.; GUILLEN, G.; CHINEA, G.; PERÉZ, A.B.; PUPO, M.; RODRIGUEZ, R.; REYES, O.; GARAY, H.E.; DELGADO, I.; GARCÍA, G.; ALVAREZ M. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. **Vaccine**, 20: 1823-1830. 2002.

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D.J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med Clin N Am.**, 92: 1377-1390. 2008.

WOLFF, J.A.; LUDTKE, J.J.; ACSADI, G.; WILLIAMS, P.; JANI, A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. **Human Molecular Genetics**, 1(6): 363-369. 1992.

WHITEHEAD, S.S., BLANEY, J.E., DURBIN, A.P., BRIAN R. MURPHY, B.R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, 5: 518-528. 2007.

WHITEHEAD, S.S.; HANLEY, K.A.; BLANEY, J.E.; GILMORE, L.E.; ELKINS, W.R.; MURPHY, B.R. Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. **Vaccine**, 21: 4307-4316. 2003.

ZHU, W.; QIN, C.; CHEN, S.; JIANG, T.; YU, M.; YU, X.; QIN, E. Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein derived from an infectious full-length cDNA clone. **Virus Research**, 126: 226-232. 2007.