

LUAN PRADOS CALEGARI

**ANÁLISE DO USO DE NANOTUBOS DE CARBONO COMO
VEÍCULOS PARA APRIMORAR A TRANSFEÇÃO DE UM CANDIDATO
VACINAL DE DNA CONTRA O VÍRUS DA DENGUE**

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
2015

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

T

C153a
2015

Calegari, Luan Prados, 1989-
Análise do uso de nanotubos de carbono como veículos para aprimorar a transfecção de um candidato vacinal de DNA contra o vírus da dengue / Luan Prados Calegari. – Viçosa, MG, 2015.
vi, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.41-52.

1. Imunologia. 2. Vacina. 3. Dengue. 4. Nanotubo de carbono. 5. Nanobiotecnologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 614.47

LUAN PRADOS CALEGARI

**ANÁLISE DO USO DE NANOTUBOS DE CARBONO COMO
VEÍCULOS PARA APRIMORAR A TRANSFEÇÃO DE UM CANDIDATO
VACINAL DE DNA CONTRA O VÍRUS DA DENGUE**

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: 30 de Março de 2015

Leandro Licursi de Oliveira
(Coorientador)

Roberto Sousa Dias

Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Sérgio Oliveira de Paula pelo apoio e confiança em mim depositado durante os quatro anos no Laboratório de Imunovirologia Molecular.

Ao professor Leandro Licursi e ao doutor Roberto Dias por terem aceitado o convite para participarem da banca.

À CAPES pela bolsa concedida a mim e à FAPEMIG pelo financiamento para a realização desse projeto.

Ao Departamento de Biologia Geral e à Universidade Federal de Viçosa pelo suporte estrutural fornecido.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa e às agências FINEP, FAPEMIG e CNPq financiadoras do microscópio eletrônico de transmissão e do citômetro de fluxo utilizado nesse projeto.

Ao professor Luiz Orlando Ladeira e a pós-doutora Marina de Souza Ladeira por fornecerem os nanotubos usados nesse projeto.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira do Laboratório de Biofísica do Departamento de Biologia Geral, por ter cedido o uso do banho ultrassônico utilizado nesse projeto.

Ao doutorando Wagner Gonzaga Gonçalves pela ajuda com as imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos amigos do LIVM em especial às pessoas que participaram diretamente nesse projeto: Carine, Juliana, Roberto, Michelle, Mary e Javier.

Aos amigos da biologia pelo apoio e pela amizade.

À turma do TRX que, mais que colegas de aula, se tornaram uma verdadeira família.

Aos meus pais pelo apoio e suporte durante todos os anos da minha vida, sempre me encorajando a ir em busca de meus sonhos e fazer o que me faz feliz.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A dengue e o vírus causador da doença	4
2.2. Candidatos vacinais de DNA contra o vírus da dengue	5
2.3. Nanotubos de Carbono	8
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Cultura Celular	17
4.2. Estoque viral	17
4.3. Candidato vacinal de DNA tetravalente	17
4.4. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs)	17
4.5. Síntese do DNA-MWCNT	18
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão do DNA-MWCNT	18
4.7. Transfecção de células Vero	18
4.8. Extração do RNA total das células e confecção do cDNA	19
4.9. Real-Time PCR	19
4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	19

4.11. Precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA)	20
4.12. Western-Blotting	20
4.13. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células Vero .	21
4.14. Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....	22
4.15. Imunização de camundongos	23
4.16. Teste de neutralização por redução em placa (PRNT)	24
4.17. Imunofenotipagem	24
4.18. Ensaio de linfoproliferação.....	25
4.19. Detecção de citocinas.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Microscopia eletrônica dos DNA-MWCNTs	27
5.2. <i>Real-Time PCR</i> das células transfectadas	29
5.3. SDS-PAGE e <i>Western Blotting</i> das células transfectadas.....	30
5.4. Ensaio de viabilidade celular com MTT	31
5.5. Ensaio de PRNT	32
5.6. Imunofenotipagem, linfoproliferação e detecção de citocinas.....	34
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

RESUMO

CALEGARI, Luan Prados, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Análise do uso de nanotubos de carbono como veículos para aprimorar a transfecção de um candidato vacinal de DNA contra o vírus da dengue.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

As infecções causadas pelos vírus dengue representam a principal arbovirose em nível mundial e são de grande importância para o nosso país. O controle desta doença se baseia na tentativa de eliminar os mosquitos transmissores, pois não existem vacinas disponíveis comercialmente para este vírus, o qual é representado por quatro sorotipos diferentes. Pesquisas recentes com desenvolvimento de vacinas contra a dengue têm explorado o uso de expressão de antígenos recombinantes em vetores de expressão, chamados vacinas de DNA. Recentemente tem sido estudado o uso de nanotubos de carbono para aplicações na área biológica, como transporte e disponibilização de drogas, proteínas e genes em células. No presente estudo foi utilizado um candidato vacinal de DNA tetravalente contra a dengue, o qual possui genes para a expressão do domínio III da proteína E dos quatro sorotipos do vírus. Foi feita a conjugação do mesmo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e foi verificado quanto a sua expressão tanto em cultura de células como em modelos animais, com avaliação do padrão de resposta imunológica gerado. Pelos resultados obtidos foi possível observar que o candidato vacinal de DNA tetravalente desenvolvido obteve uma resposta pouco satisfatória quando testado *in vitro* e *in vivo*, uma vez que o único resultado interessante foi com relação ao aumento de células B e a produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-6. Além disso, foi demonstrado que a conjugação do candidato vacinal com o MWCNT não gerou aumento da resposta imune nos camundongos, sendo que o único resultado obtido foi um aumento de células B quando os camundongos foram tratados com esse composto.

ABSTRACT

CALEGARI, Luan Prados, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, march 2015. **Analysis of using carbon nanotubes as vehicles to enhance the transfection of a DNA vaccine candidate against the Dengue virus.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula.

Infections caused by dengue viruses are the main arbovirus infection worldwide and are of great importance for our country. Control of this disease is based on the attempt to eliminate the mosquitoes, because there are no commercially available vaccine for this virus, which is represented by four different serotypes. Recent research in development of vaccines against dengue have explored the use of recombinant expression vectors for expression of antigens, called DNA vaccines. Recently there has been studied the use of carbon nanotubes for applications in the biological field such as transportation and delivery of drugs, proteins and genes into cells. In the present study it was used a tetravalent DNA vaccine candidate against dengue, which has genes for the expression of domain III of the E protein of the four serotypes of the virus. The conjugation was performed with multi-walled carbon nanotubes and was checked for its expression in both cell culture and animal models, to evaluate the pattern of immune response generated. By the results, it was observed that the tetravalent DNA vaccine candidate obtained an unsatisfactory response when tested *in vitro* and *in vivo*, since the only interesting result was related to the increase of B cells and the production of the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and IL-6. Furthermore, it was shown that the conjugation of the vaccine candidate with the MWCNT did not cause an increase of the immune response in mice and the only result was an increase of B cells when mice were treated with this compound.

1. INTRODUÇÃO

A dengue é um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais pelo mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization – WHO*, na sigla em inglês), mais de 2,5 bilhões de pessoas estão em áreas de risco e ocorrem cerca de 50 a 100 milhões de infecções a cada ano. Não só o número de casos está aumentando, como a doença também está se espalhando para novas áreas, já sendo endêmica em mais de 100 países (WHO, 2014). Tal aumento na incidência de casos está relacionado com o acelerado crescimento populacional, movimento de pessoas por meios de transporte mais rápidos e a falta de medidas efetivas para controlar o mosquito transmissor (GUBLER, 2002).

O agente etiológico da doença é o vírus da dengue, o qual compreende quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (HENCHAL & PUTNAK, 1990), que são igualmente capazes de causar todas as manifestações clínicas da doença, a qual pode se manifestar como uma infecção assintomática, uma doença febril branda conhecida como febre da dengue, até formas mais severas com risco de morte conhecidas como febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue (FHD e SCD) (MURRELL *et al.*, 2011). O vírus pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, que inclui outros vírus de importância médica, como o vírus da febre amarela, o vírus *West Nile*, o vírus da encefalite japonesa e o vírus da encefalite *tick-borne* (MURRELL *et al.*, 2011). A distribuição global do vírus ocorre, principalmente, em áreas tropicais e subtropicais, sendo a transmissão do vírus em humanos feita por mosquitos do gênero *Aedes*, incluindo *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, sendo que o controle da doença está baseado no combate a esses vetores (HALSTEAD, 2007).

Estudos epidemiológicos sugerem que o aparecimento das formas mais graves da doença, FHD e SCD, está associado com infecções secundárias pelo vírus da dengue (LEI *et al.*, 2001). Isso se deve ao fato de que em uma infecção primária de dengue são produzidos anticorpos contra o vírus, principalmente contra as proteínas E e NS1. Quando ocorre uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo ao da primeira infecção, tais anticorpos se ligam a epítomos não-neutralizantes ou se encontram em concentração abaixo da necessária para a neutralização, provocando um aumento da captação dos vírus por células que

possuem receptores para a porção Fc de anticorpos, como monócitos e macrófagos. Com isso, ocorre um aumento da replicação viral nessas células e, conseqüentemente, aumento da viremia, agravando o quadro da doença, sendo esse fenômeno conhecido como “aumento da infecção dependente de anticorpo”, ou *Antibody-Dependent Enhancement of infection* (ADE, na sigla em inglês) (HALSTEAD, 1988; ROTHMAN & ENNIS, 1999; ROTHMAN, 2004). Entretanto, existem casos graves de dengue que ocorrem mesmo na primeira infecção, levando à hipótese de que o agravamento da doença pode ser provocado por variantes do vírus com diferentes graus de virulência (KURANE, 2007; LEI *et al.*, 2001).

O tratamento da dengue é sintomático, uma vez que antivirais específicos não se encontram disponíveis, por isso a OMS considera a criação de uma vacina eficaz contra esses vírus uma prioridade. A vacina ideal contra a dengue deve apresentar baixos níveis de reações adversas, fornecer proteção duradoura e teria que ser tetravalente para evitar a ocorrência do ADE. Como muitas das regiões onde a dengue ocorre são subdesenvolvidas, a vacina deve ser economicamente viável e, de preferência, ser administrada em dose única. (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Grupos de pesquisa em todo o mundo vêm tentando criar uma vacina contra a dengue, utilizando desde os métodos clássicos, como a atenuação viral, até a expressão de antígenos recombinantes em vetores de expressão (DONNELLY *et al.*, 1997; FONSECA *et al.*, 1994; GUIRAKHOO, *et al.*, 2001; GUIRAKHOO, *et al.*, 2004; MCDONNELL & ASKARI, 1996; OCAZONEZ & FONSECA, 2000; RAVIPRAKASH *et al.*, 2000; ULMER *et al.*, 1996; VOGEL & SARVER, 1995).

Porém, mesmo as vacinas mais modernas produzidas por engenharia genética, ainda não apresentaram resultados satisfatórios para a proteção efetiva contra os quatro sorotipos da dengue. Nos últimos anos, estudos com nanotubos de carbono (*Carbon Nanotubes* - CNT, na sigla em inglês) vêm demonstrando que estes podem ser uma eficiente forma de aumentar a internalização e a expressão de sequências de DNA, como por exemplo, vetores de expressão plasmidiais (KAM *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2005; PANTAROTTO *et al.*, 2004b; RICHARD *et al.*, 2009). Porém, esses estudos são muito recentes e pouco se sabe ainda sobre como utilizar os CNTs e como melhorar sua

eficiência, sendo necessárias mais investigações nessa área que está em plena expansão atualmente. Em virtude disso, esse projeto teve por finalidade estudar a resposta conferida por um candidato vacinal de DNA tetravalente (o qual foi denominado CVT) produzido em nosso laboratório, por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando esse candidato vacinal administrado sozinho ou em associação com nanotubos de carbono. Pelos resultados obtidos foi possível observar que o CVT desenvolvido obteve uma boa resposta quando testado *in vivo*, uma vez que, foi observado um aumento na quantidade de células B e na produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-6. Tais resultados são promissores para a continuidade dos testes com o CVT, sendo que mais estudos são necessários para uma avaliação mais abrangente da eficácia do mesmo na proteção de camundongos imunizados com este candidato vacinal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A dengue e o vírus causador da doença

A dengue é uma doença cuja patogênese ainda não está muito bem estabelecida. O vírus é capaz de se replicar em diversos tipos celulares, sendo as células das linhagens monocíticas apontadas desde o princípio como os principais alvos da replicação viral (HALSTEAD, 1988). No entanto, estudos já demonstraram a presença de antígenos virais no fígado (células de Kupffer), no pulmão (macrófagos alveolares), no baço, nos rins, na medula óssea (células mielóides), fagócitos mononucleares da pele e monócitos e linfócitos de sangue periférico (GUZMAN & KOURI, 2002; JESSIE *et al.*, 2004). Estudos indicam que os vírus da dengue em estado imaturo infectam as células dendríticas e de Langerhans, podendo estas servir de sítios de replicação no início da infecção (HO *et al.*, 2001; MAROVICH *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2000). Um receptor celular específico para o vírus ainda não foi identificado, porém estudos *in vitro* sugerem alguns candidatos para certos tipos celulares, como por exemplo, o receptor de manose em macrófagos (MILLER *et al.*, 2008), o receptor DC-SIGN (CD209) em células dendríticas (NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2003; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003) e o receptor *heparan sulfate* em células Vero (CHEN *et al.*, 1997).

As formas mais severas da doença, a FHD e a SCD, são encontradas principalmente em áreas endêmicas nas quais os quatro sorotipos estão presentes, quadro conhecido como hiperendêmico (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Essas doenças são caracterizadas por febre, trombocitopenia, manifestações hemorrágicas e aumentada permeabilidade vascular com vazamento do fluido intravascular no espaço intersticial, podendo provocar um quadro de choque hipovolêmico e levar à morte. Tal situação ocorre devido a uma desestruturação da parede endotelial dos vasos sanguíneos, que pode ser provocada por uma reação cruzada entre os anticorpos contra o vírus da dengue e as células endoteliais, levando à apoptose e lise celular das mesmas (LIN *et al.*, 2003). Acometimento do fígado e manifestações neurológicas também têm sido relatadas em indivíduos com dengue (FRANÇA *et al.*, 2010; PANCHAROEN & THISYAKORN, 2001; SENEVIRATNE *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2006; SOLOMON *et al.*, 2000).

O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* e está incluído no gênero *Flavivirus*, o qual faz parte do grupo dos Arbovírus, que são os vírus transmitidos por artrópodes. Este é um vírus envelopado e possui um genoma de RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11 kb, que contém uma única *Open Reading Frame* (ORF, na sigla em inglês) codificando uma longa poliproteína, a qual é processada por proteases virais e das células do hospedeiro. Tal processamento gera dez proteínas, das quais, três são estruturais, capsídeo (C), membrana (prM) e envelope (E), que constituem os componentes do vírion, e sete são não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, envolvidas na replicação do RNA viral (PERERA & KUHN, 2008).

A proteína E, uma glicoproteína de 53 a 54 kDa, é o principal componente proteico do envelope viral, sendo responsável por mediar a ligação do vírus aos receptores celulares e a sua fusão à célula (HENCHAL & PUTNAK *et al.*, 1990). Sua estrutura molecular se apresenta como um homodímero, em que cada monômero possui três domínios: um domínio central que organiza toda a estrutura (domínio I), um domínio de dimerização que contém o peptídeo de fusão, essencial para a fusão do vírus à célula (domínio II) e um domínio com estrutura semelhante a imunoglobulinas (domínio III) (ZHANG *et al.*, 2003). O domínio III tem sido proposto como o sítio de ligação aos receptores celulares e como possuidor dos principais epitópos para a ligação de anticorpos contra o vírus da dengue, ou seja, o antígeno mais imunogênico do vírus (ROTHMAN, 2004; WHITEHEAD *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2003;).

2.2. Candidatos vacinais de DNA contra o vírus da dengue

Tentativas de criação de uma vacina contra a dengue por meio de técnicas convencionais, como atenuação e inativação do vírus, não se mostraram eficientes. Por isso, métodos de biologia molecular também têm sido empregados na busca de novas estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue abrangendo desde a criação de quimeras virais até o desenvolvimento de vacinas de DNA (CHEN *et al.*, 2007; KHANAM *et al.*, 2006; LAI *et al.*, 2008; LANG, 2009; RAMANATHAN *et al.*, 2009; RAVIPRAKASH *et al.*, 2006).

A empresa Sanofi Pasteur desenvolveu um candidato vacinal baseado em uma quimera, a qual consiste na introdução dos genes das proteínas E e prM dos quatro sorotipos dos vírus da dengue na cepa YF17D do vírus da febre amarela. Tal vacina apresentou redução na viremia e capacidade de indução de altos títulos de anticorpos neutralizantes em testes clínicos com pacientes. Além disso, essa cepa possui estabilidade genética confirmada e atenuação definida em nível molecular. Em testes com camundongos, ela tem se mostrado segura e imunogênica e capaz de induzir a ativação de células dendríticas. O candidato se mostrou geneticamente estável, não apresentou tropismo por hepatócitos, foi menos virulento do que a cepa YF17D selvagem e não infectou mosquitos pela rota oral (GUY, 2009; LANG, 2009). Apesar disso, há um problema relacionado ao tropismo neurológico residual da cepa YF17D, relatado em alguns estudos, que pode resultar em febre, dor de cabeça, mialgias, fadiga, mal-estar e reações no sítio da injeção (MONATH *et al.*, 2002).

Uma outra abordagem utilizada na elaboração de vacinas contra várias doenças infecciosas é a construção de vacinas de DNA, que consistem de um plasmídeo recombinante otimizado para a expressão em células eucarióticas, que codifica para a expressão do antígeno de interesse (DONNELLY *et al.*, 2005). O tipo de célula transfectada depende do método de introdução do DNA. O bombardeamento da epiderme com partículas de ouro recobertas com o plasmídeo vacinal transfecta diretamente os queratinócitos e as células de Langerhans, que então migram para os linfonodos. A inoculação intramuscular da vacina leva à transfecção de miócitos. No entanto, células apresentadoras de antígenos derivadas da medula óssea são requeridas para a indução de linfócitos T citotóxicos restritos à MHC da classe I após a injeção intramuscular (DONNELLY *et al.*, 2005).

Algumas características do plasmídeo de expressão são essenciais para a criação de vacinas de DNA, como a presença de um promotor forte, uma origem de replicação para permitir a propagação dos plasmídeos em células de mamíferos e a inserção de sequências de poliadenilação para a estabilização dos transcritos de RNA (GURUNATHAN *et al.*, 2000). Além disso, certas propriedades do plasmídeo desempenham um papel crítico na indução da resposta imune como, por exemplo, a presença de sequências CpG não

metiladas que agem como um ativador policlonal de células B *in vitro* e como adjuvante *in vivo*, e também podem estimular vários tipos de células do sistema imune, como monócitos, células dendríticas e células T (DONNELLY *et al.*, 2005; GURUNATHAN *et al.*, 2000).

Vários grupos já desenvolveram candidatos vacinais de DNA contra o vírus da dengue, os quais expressam diferentes antígenos virais. Muitas pesquisas se baseiam na expressão das proteínas E e prM, como descrito por De Paula e colaboradores. Neste caso as proteínas prM e E do vírus DENV-3 foram capazes de induzir anticorpos neutralizantes contra o desafio com este mesmo vírus e a proliferação de células T frente ao estímulo com o vírus selvagem. Além disso, a vacina conferiu uma sobrevivência de 80% em camundongos vacinados, quando comparados com o controle positivo (DE PAULA *et al.*, 2008).

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

Alguns estudos vêm tentando criar vacinas de DNA tetravalentes, através da expressão do domínio III da proteína E. Este domínio está envolvido na interação com o receptor da célula hospedeira e contém epítomos específicos que induzem somente anticorpos neutralizantes, o que seria essencial na criação de uma vacina. A remoção de outros epítomos que induzem anticorpos não neutralizantes com reação cruzada poderia reduzir o risco da progressão da doença para as formas mais severas (LENG *et al.*, 2009; RAVIPRAKASH *et al.*, 2006; WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Mota e colaboradores desenvolveram uma formulação de vacina de DNA composta por quatro plasmídeos diferentes contendo, cada um, o gene do domínio III da proteína E de cada sorotipo do vírus. Eles observaram que os domínios III gerados foram corretamente expressos, com a presença dos epítomos neutralizantes. A produção de anticorpos contra a formulação tetravalente foi específica e dose-dependente. O soro dos camundongos

imunizados com a vacina tetravalente, composta por 100 µg de cada plasmídeo, e desafiados com o DENV-2, resultou em 87% de sobreviventes (MOTA *et al.*, 2005).

Chen e colaboradores também obtiveram resultados satisfatórios ao criarem uma proteína recombinante composta pelos domínios III dos quatro sorotipos, a partir da inserção desses fragmentos de DNA em um vetor plasmidial. Níveis significativos de anticorpos específicos foram detectados nos soros de camundongos imunizados com a proteína para os sorotipos 1, 2 e 4 e uma proteção de 70% frente ao desafio com os mesmos vírus foi observada, enquanto somente 18% dos animais sobreviveram após o desafio com o vírus DENV-3, quando comparados com os grupos controles correspondentes (CHEN *et al.*, 2007).

No presente trabalho foi utilizado um candidato vacinal de DNA tetravalente, o qual possui os genes do domínio III dos quatro sorotipos do vírus inseridos no vetor plasmidial de forma a criar uma sequência em *tandem* desses domínios. Tal procedimento é vantajoso, pois ele permite que ocorra uma expressão mais igualitária dos quatro domínios evitando que haja algum evento de imunodominância entre eles, o que poderia levar a uma resposta imunológica inadequada nos testes *in vivo*, devido ao fenômeno da ADE. Tal característica é essencial para que o candidato vacinal possa ser testado em testes clínicos com humanos, pois isso reduziria a chance de ocorrência das formas mais graves da doença.

2.3. Nanotubos de Carbono

Desde a primeira vez que os nanotubos de carbono (CNTs) foram descritos (IJIMA, 1991) eles tem sido intensamente estudados e tem despertado grande interesse por pesquisadores de diversas áreas, devido as suas peculiares características físicas, químicas e biológicas (WANG & LIU, 2012). Os CNTs são categorizados em dois tipos principais: os de parede única, chamados *Single-Walled Carbon Nanotubes* (SWCNTs, na sigla em inglês) e os de paredes múltiplas, chamados *Multi-Walled Carbon Nanotubes* (MWCNTs, na sigla em inglês). Seu comprimento pode variar de algumas centenas de nanômetros até

alguns micrômetros e seu diâmetro varia entre 0.4-2 nm para SWCNTs e 2-100 nm para MWCNTs (YANG *et al.*, 2007).

Os CNTs são constituídos exclusivamente por átomos de carbono, os quais estão arranjados em um padrão hexagonal regular na forma de anéis benzeno formando folhas de grafeno (BIANCO *et al.*, 2005b). Para a formação dos CNTs essas folhas enrolam sobre si mesmas em torno de um eixo e, de acordo com a orientação que os hexágonos adquirem, os nanotubos podem assumir três conformações: *armchair*, *zig-zag* e *quiral* (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008b; BEG *et al.*, 2011). Existem três métodos principais para a produção dos CNTs: Descarga por Arco Elétrico, Ablação a Laser e Deposição Química de Vapor (AWASTHI *et al.*, 2005; BEG *et al.*, 2011) e para o processo de produção são utilizados metais catalisadores, como ferro e níquel (PULSKAMP *et al.*, 2007).

Uma das principais técnicas utilizadas para visualização dos CNTs é a microscopia eletrônica de transmissão (MET), a qual permite analisar as características físicas dos mesmos. Técnicas complementares incluem a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de força atômica (MFA), que permitem uma análise melhor da superfície dos CNTs (BIANCO *et al.*, 2005b). Para análises quanto ao grau de pureza e grau de funcionalização dos CNTs são utilizadas outras técnicas como análise termogravimétrica, ressonância magnética nuclear, espectroscopia Raman e espectroscopia infravermelha (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008b). A espectroscopia Raman tem sido amplamente utilizada para caracterização de CNTs nus, os quais não sofreram modificações (*pristine CNTs*). Porém, para CNTs funcionalizados as medições do Raman são geralmente suprimidas pelo forte *background* de luminescência (SUN *et al.*, 2002).

Devido ao fato que os CNTs são compostos exclusivamente por átomos de carbono, eles são hidrofóbicos e, conseqüentemente, insolúveis em água, algo extremamente indesejado para aplicações biológicas e farmacológicas (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008b). No entanto, metodologias vêm sendo recentemente descritas para modificar quimicamente os CNTs, possibilitando que estes possam solubilizar e dispersar em água, facilitando sua manipulação e processamento em ambientes fisiológicos (YANG *et al.*, 2007; BIANCO *et al.*,

2005b). Esse procedimento de modificação química é chamado de funcionalização e pode ser feito por meio de ligações covalentes ou não-covalentes de moléculas na superfície dos CNTs, em suas extremidades ou na parede lateral (PRATO *et al.*, 2008). Tais nanotubos são denominados funcionalizados e serão abreviados nesse texto como *f*-CNTs. Além de aumentar a solubilidade dos CNTs melhorando sua biocompatibilidade e diminuindo sua toxicidade, essas moléculas aderidas também podem ser usadas como ponto de ancoragem para outras moléculas de interesse, como ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos, enzimas, hormônios, etc. (BEG *et al.*, 2011; BIANCO *et al.*, 2005a; FOLDVARI & BAGONLURI, 2008a; PRATO *et al.*, 2008).

Os CNTs apresentam fortes interações de atração entre si, por forças de Van der Waals e eletrostáticas, com a tendência de se agregarem formando pacotes (*bundles*) e cordões (*ropes*) que podem chegar a dezenas de nanômetros de espessura (TASIS *et al.*, 2003; SMART *et al.*, 2006). O processo de dissolução dos CNTs é auxiliado pela sonicação dos mesmos, pois tal procedimento fornece energia mecânica para superar as forças de atração intertubulares permitindo que eles fiquem individualizados (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008b). Tal processo também promove a ligação de moléculas de DNA na superfície dos CNTs (LI *et al.*, 2009), sendo essa associação entre CNTs e o DNA plasmidial explicada pela interação eletrostática entre o esqueleto de grupos fosfato aniônicos do DNA e os centros catiônicos na superfície dos CNTs (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008a).

Ainda não há um consenso na literatura a respeito de como os CNTs penetram nas células. Alguns pesquisadores sugerem que eles atravessam de forma passiva a bicamada lipídica, como uma “nanoagulha”, perfurando a membrana sem causar dano celular (BIANCO *et al.*, 2005a; BIANCO *et al.*, 2005b; PANTAROTTO *et al.*, 2004a; YANG *et al.*, 2007). Uma alternativa é a internalização celular de CNTs por meio do mecanismo de endocitose, o qual necessita de energia na forma de ATP. (KAM & DAI, 2005; KAM *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2011). Porém, outro trabalho mostrou que os CNTs podem ser internalizados por meio de processos celulares independentes de energia, sem determinar um único mecanismo predominante. (KOSTARELOS *et al.*, 2007).

Alguns estudos já demonstraram a internalização dos CNTs em cultura de células, como o de Bianco e colaboradores, onde foi utilizado tanto SWCNTs quanto MWCNTs funcionalizados, evidenciando que ambos conseguem penetrar diferentes tipos celulares (HeLa, fibroblastos humanos e de camundongos e queratinócitos) sendo encontrados distribuídos pelo citoplasma e também dentro do núcleo (BIANCO *et al.*, 2005b). Kostarelos e colaboradores, trabalhando com SWCNTs e MWCNTs covalentemente funcionalizados com sete diferentes moléculas, mostraram que os mesmos foram internalizados por diferentes tipos celulares (A549, HeLa, MOD-K, Jurkat e leveduras) independentemente da natureza do grupo funcional ao qual os CNTs estavam ligados. Os autores demonstraram que, uma vez internalizados, os *f*-CNTs se encontravam principalmente na região perinuclear das células (KOSTARELOS *et al.*, 2007).

Com intuito de avaliar a biodistribuição, excreção e a toxicidade a longo prazo dos CNTs, Liu e colaboradores utilizaram SWCNTs funcionalizados e a técnica de espectroscopia Raman para avaliar a concentração sanguínea após a injeção dos CNTs (por via intravenosa) e a biodistribuição dos mesmos em vários órgãos de camundongos, os quais foram acompanhados por três meses. Eles observaram que os CNTs seguiram a via de excreção biliar e urinária, uma vez que foram encontrados sinais Raman positivos no intestino, nas fezes, nos rins e na bexiga. Além desses, outros órgãos também apresentaram sinal positivo para a presença dos CNTs como fígado, baço, ossos, estômago e pulmão. Necropsia, histologia dos órgãos e exames sanguíneos revelaram nenhum efeito tóxico aparente nos camundongos injetados com *f*-SWCNT (LIU *et al.*, 2008). Singh e colaboradores também avaliaram a biodistribuição de *f*-CNTs em camundongos injetados por via intravenosa e observaram a presença dos mesmos em amostras de urina, confirmando que eles foram retirados da circulação sanguínea pela rota de excreção renal e nenhum dos animais exibiu sinais de toxicidade renal ou de outro tipo. Além disso, os CNTs não apresentaram afinidade órgão-específica nem acúmulo no fígado (SINGH *et al.*, 2006).

Para aplicações que envolvem administração de CNTs em animais, o maior desafio a ser superado é a potencial toxicidade a longo prazo dos CNTs.

A toxicidade dos mesmos é determinada por fatores como via de administração, a dose aplicada, grau de impurezas, tamanhos dos nanotubos, grau de agregação, ligação de grupos funcionais na superfície e o método de produção dos CNTs (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008a). Com o objetivo de elucidar melhor os efeitos citotóxicos dos CNTs, estudos vêm sendo feitos nessa área sendo que o primeiro deles foi conduzido em 2003 por Shvedova e colaboradores, no qual eles estudaram o efeito de SWCNTs em células de queratinócitos humanos (HaCaT). Foi demonstrado que a exposição das células ao SWCNT, gerou um *stress* oxidativo e citotoxicidade celular, com formação de radicais reativos livres e acúmulo de produtos de peróxido de hidrogênio. Também foram observadas mudanças morfológicas e ultraestruturais nas células em cultura, como separação da monocamada e alterações em organelas, como núcleo e mitocôndrias (SHVEDOVA *et al.*, 2003).

Muitos outros estudos já demonstraram os efeitos dos CNTs em diferentes tipos de cultura celular, observando a ocorrência de apoptose e necrose nas células, redução da viabilidade celular, alterações em organelas, danos ao DNA, aumento nos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, sendo estes efeitos dependentes da dose utilizada e do grau de pureza dos CNTs (BOTTINI *et al.*, 2006; COCCINI *et al.*, 2010; DING *et al.*, 2005; MAGREZ *et al.*, 2006; MCSHAN *et al.*, 2012; PATLOLLA *et al.*, 2010; PULSKAMP *et al.*, 2007; VITTORIO *et al.*, 2009; YAMASHITA *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2007). Além disso, já foram observadas alterações na expressão de genes ligados a transporte vesicular, vias de secreção, síntese de lipídeos, metabolismo proteico, resposta imune e inflamatória, controle do ciclo celular, ubiquitinação e aumento nos níveis da proteína p53 e da sua forma fosforilada (DING *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2007).

Sato e colaboradores, utilizando MWCNTs, estudaram a resposta inflamatória gerada quando os mesmos foram injetados em camundongos por via subcutânea. Eles observaram a presença de CNTs em macrófagos, fibroblastos e no espaço intercelular, com graus variados de inflamação local (SATO *et al.*, 2005). Outros estudos com MWCNTs injetados em camundongos por via intraperitoneal mostraram a formação de granulomas com presença de macrófagos e inflamação no local (POLAND *et al.*, 2008; YAMASHITA *et al.*,

2010) e também a ocorrência de peritonite, alterações nos alvéolos pulmonares, necrose na parede intestinal e nos túbulos seminíferos do testículo, além de acúmulo de MWCNTs em células de Kupffer do fígado. Em dois estudos com camundongos injetados com MWCNTs por via intravenosa, foi observada a formação de aglomerados de CNTs nos pulmões, no fígado, no baço e no coração, gerando alterações histopatológicas, infiltrados de células inflamatórias e necrose nesses órgãos (QU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010).

Drogas administradas livremente no organismo podem apresentar desvantagens, como baixa solubilidade, baixa biodistribuição, danos a tecidos saudáveis e rápida degradação ou eliminação (BIANCO *et al.*, 2005b; KLUMPP *et al.*, 2006). O uso de vetores podem amenizar essas condições e os mais comumente utilizados são vetores virais, lipossomos, lipídeos catiônicos, polímeros e nanopartículas (ALLEN & CULLIS, 2004; BIANCO *et al.*, 2005b). Vetores virais apresentam alguns problemas relacionados com a segurança, toxicidade e a geração de resposta imune. Por isso, a utilização de vetores não-virais para *gene delivery* apresenta algumas vantagens como: fácil manipulação; são mais flexíveis quanto ao tamanho do DNA a ser transferido; são mais seguros *in vivo*; não deflagram uma resposta imune específica e são menos imunogênicos (SCHMIDT-WOLF G.D. & SCHMIDT-WOLF I.G.H, 2003). O sistema ideal para *gene delivery* deve possuir as seguintes características: ser específico ao alvo de interesse, biodegradável, não-tóxico, não-inflamatório, não-imunogênico, estável para ser estocado, ter capacidade para uma grande quantidade de material genético, com uma alta eficiência de transfecção e com a capacidade de ser produzido em larga escala com um custo baixo (SCHMIDT-WOLF G.D. & SCHMIDT-WOLF I.G.H, 2003).

Com o uso de métodos físicos para *gene delivery* o DNA plasmidial é direcionado direto para o citoplasma, sem passar por endossomos ou lisossomos, com isso evitando nucleases que degradam material genético (SCHMIDT-WOLF G.D. & SCHMIDT-WOLF I.G.H, 2003). Dentre esses métodos, os CNTs se apresentam como bons candidatos por possuir características favoráveis apresentadas em testes *in vitro*, como baixa toxicidade, estável e uma grande relação entre área de superfície e volume, o que lhes confere a capacidade de se ligarem a muitos grupos funcionais e

carrear grande quantidade de agentes terapêuticos (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008b). Existem três maneiras possíveis de interação entre os CNTs e componentes biológicos/farmacêuticos para o processo de *drug delivery*: 1. Matriz porosa formada por um aglomerado de nanotubos; 2. Ligação de moléculas no exterior do NTC; 3. Encapsulação de moléculas no interior do NTC (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008a). Para aplicações farmacológicas é essencial que os CNTs tenham baixo grau de impurezas e uma distribuição homogênea no comprimento e espessura dos mesmos (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008b).

Estudos já foram feitos para avaliar o aumento da expressão gênica de plasmídeos quando estão associados aos CNTs, como no caso de Pantarotto e colaboradores usando *f*-SWCNTs conjugados com DNA plasmidial que expressava o gene da β -galactosidase e observaram a expressão do mesmo em células CHO. Foi notado um aumento de 5 a 10 vezes na expressão do gene quando comparados com células tratadas somente com o DNA. Um fator determinante para essa expressão elevada foi a razão de cargas positivas (do *f*-SWCNT) e cargas negativas (do DNA plasmidial), sendo que os melhores resultados foram obtidos com razões de 2:1 e 6: 1 (+/-) (PANTAROTTO *et al.*, 2004b). Em outro estudo, Singh e colaboradores também estudaram a interação de DNA plasmidial expressando o gene da β -galactosidase com *f*-SWCNTs e *f*-MWCNTs. Células A549 foram incubadas com os complexos de *f*-CNTs + DNA e os resultados mostraram que houve aumento na expressão gênica do DNA plasmidial conjugado com os CNTs, quando comparado com o plasmídeo sozinho, sendo que o maior nível de expressão foi observado com o *f*-SWCNT com uma razão de cargas de 8:1 (+/-) (SINGH *et al.*, 2005).

Liu e colaboradores, estudando a interação de CNTs e DNA, complexaram DNA plasmidial que expressava o gene da luciferase com *f*-MWCNT e avaliaram a eficiência de transfecção desse complexo em células 293, COS7 e HepG2 por meio da expressão gênica da luciferase. Eles observaram que houve um aumento de até quatro ordens de magnitude quando comparado com o plasmídeo sozinho, sendo que o melhor resultado foi obtido com uma razão de cargas de 28,5:1 (+/-) (LIU *et al.*, 2005). Richard e colaboradores, também trabalhando com *f*-SWCNTs e *f*-MWCNTs conjugados com DNA

plasmidial expressando o gene da luciferase, demonstraram um aumento na transfecção e expressão gênica em células B16, quando comparado com o DNA sozinho. Porém, foi observado um aumento muito mais acentuado do DNA conjugado com *f*-SWCNT em relação ao DNA conjugado com *f*-MWCNT (RICHARD *et al.*, 2009). Já o grupo de Gao e colaboradores avaliaram a conjugação de *f*-MWCNTs com DNA plasmidial expressando o gene da GFP (*Green Fluorescent Protein*). Eles introduziram quatro grupos funcionais diferentes na superfície dos CNTs (amina, carboxila, hidroxila e alquila) gerando quatro *f*-MWCNTs diferentes. Foi observado que apenas o MWCNT funcionalizado com o grupo amina se ligou ao DNA plasmidial, portanto nos experimentos seguintes só foi utilizado esse NH₂-MWCNT. Complexos de DNA + *f*-MWCNT foram incubados com células HUVEC e A375 gerando um aumento na eficiência de transfecção quando comparado com o DNA sozinho, porém muito abaixo da eficiência obtida pelo uso de *lipofectamine 2000*, sendo que a mistura com uma razão de cargas de 10:2 (+/-) foi a que obteve maior nível de expressão de GFP. (GAO *et al.*, 2006).

A importação nuclear de DNA é um processo relativamente ineficiente, devido, principalmente, à presença de nucleases citoplasmáticas que podem degradar o DNA plasmidial antes mesmo que este alcance o núcleo (DEAN *et al.*, 2005). Por isso, a utilização de novos métodos para melhorar esse processo de importação nuclear de DNA se faz necessária, como parte fundamental do avanço na pesquisa com vacinas de DNA. O uso de CNTs para introdução de DNA exógeno em células é uma área de grande interesse atualmente e está em intensa fase de expansão, sendo necessários estudos para compreender melhor como utilizá-los e os potenciais riscos envolvidos no seu uso em animais. A determinação de condições ótimas de transfecção, os mecanismos de internalização celular e as vias de inoculação em animais, como também o papel que a densidade de cargas, o comprimento e a largura dos CNTs desempenham na eficiência de transfecção necessitam de estudos adicionais para serem elucidados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Fazer um estudo *in vitro* e *in vivo* comparando a resposta obtida pelo uso de um candidato vacinal de DNA tetravalente contra a dengue, quando este é utilizado sozinho ou conjugado com MWCNTs.

3.2. Objetivos Específicos

- Fazer a conjugação do plasmídeo com os nanotubos de carbono, (denominados DNA-MWCNTs) e analisá-los e microscopia eletrônica.
- Transfectar células Vero em cultura com o plasmídeo puro e com os DNA-MWCNTs e analisar por microscopia eletrônica.
- Fazer ensaios de viabilidade celular com MTT nas células transfectadas.
- Avaliar a produção do RNA mensageiro do domínio III em células transfectadas por *Real-Time PCR*.
- Analisar bioquimicamente a produção da proteína de interesse (domínio III), por meio de SDS-PAGE e *Western-Blotting*.
- Inocular nos camundongos o plasmídeo sozinho e os DNA-MWCNTs.
- Analisar o padrão de resposta imunológica gerado e a produção de anticorpos contra diferentes sorotipos do vírus.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura Celular

Células Vero (provenientes de rim de macaco) foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio essencial mínimo de Eagle (MEM - Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino para promoção do crescimento e 2% para manutenção da linhagem celular, além das soluções de antibiótico: penicilina (500 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml).

4.2. Estoque viral

Os vírus da dengue utilizados neste estudo foram das seguintes cepas: DENV-1 (*Nauru Island*), DENV-2 (*New Guinea C*), DENV-3 (H87) e DENV-4 (H241), obtidas do estoque viral do Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Amostras de cada um dos sorotipos foram inoculadas em cérebros de camundongos Swiss neonatos. Após o início da viremia, os cérebros foram removidos e macerados com PBS 1X e submetidos à centrifugação a 2500 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi suplementado com soro fetal bovino para uma concentração final de 5%, dividido em alíquotas e guardado em *freezer* a -80°C.

4.3. Candidato vacinal de DNA tetravalente

O candidato vacinal tetravalente (CVT) utilizado foi produzido no Laboratório de Imunovirologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, sendo composto pelo vetor plasmidial otimizado para expressão em células de mamíferos pVAX1[®] (Invitrogen Corporation, California - USA), no qual foi inserido genes do domínio III da proteína E dos sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 formando uma sequência em *tandem* desses quatro fragmentos gênicos, gerando um polipeptídeo de 60 kDa. Tal construção foi confirmada por PCR, ensaios de restrição e sequenciamento.

4.4. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs)

Os MWCNTs utilizados nesse estudo foram obtidos no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, cedidos pelo professor Luiz Orlando Ladeira. Tais nanotubos foram

produzidos pelo processo de deposição química de vapor a partir de um precursor de carbono (etileno) e um catalizador a base de partículas metálicas nanoestruturadas (Ni, Fe, Co) tendo um teor de pureza da ordem de 95%. A funcionalização dos nanotubos foi feita via micro-ondas em meio ácido (nítrico/sulfúrico) que gera primeiramente defeitos na estrutura e posteriormente estabiliza estes defeitos com grupos carboxílicos, sendo o grau de funcionalização na ordem de 10%.

4.5. Síntese do DNA-MWCNT

Para conjugação do CVT com o MWCNT, 20 µg de DNA plasmidial foram colocados em solução de PBS com nanotubos de carbono na concentração de 10 µg/mL. Tal solução foi sonicada por 30 minutos em banho ultrassônico, para permitir a conjugação do DNA à parede do MWCNT, e mantida no gelo até o uso.

4.6. Microscopia eletrônica de transmissão do DNA-MWCNT

Para caracterizar o DNA-MWCNT foi feita a MET de quatro amostras diferentes: MWCNT puro, DNA-MWCNT, *f*-MWCNT puro e DNA-*f*-MWCNT. Após o processo de sonicação por 30 minutos, as quatro amostras foram colocadas separadamente sobre *grids* cobertas com *formvar* por um minuto e trinta segundos. Posteriormente foram secadas e foi adicionado solução aquosa de acetato de uranila 0,5% por 15 segundos e foram secas, para fazer a contrastação do DNA. As amostras foram deixadas no dessecador por 12 horas e visualizadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, o qual pertence ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

4.7. Transfecção de células Vero

Para a transfecção de células com o DNA plasmidial puro (tanto o plasmídeo vazio quanto o CVT), foi utilizado o protocolo com o reagente de transfecção *Lipofectamine 2000* (Invitrogen), no qual 100 µL de meio MEM sem soro fetal bovino foi adicionado ao DNA plasmidial em um tubo. Em outro tubo foi colocado um µL de *Lipofectamine 2000* para um µg de DNA em 100 µL de meio MEM, deixando por cinco minutos à temperatura ambiente. Ambos os tubos

foram misturados e deixados por 20 minutos à temperatura ambiente. Após isso, os 200 µL dessa mistura foram adicionados às células e incubados por 24 horas. Para a transfecção das células com o MWCNT, os mesmos foram utilizados na concentração de 10 µg/mL e foram sonicados por 30 minutos com e sem o DNA plasmidial (20 µg) e adicionados diretamente ao meio da cultura celular e incubados por 24 horas.

4.8. Extração do RNA total das células e confecção do cDNA

Após as 24 horas de incubação das células, as mesmas foram coletadas e foi feita a extração de RNA total utilizando o *PureZOL RNA Isolation Reagent* (Bio Rad) de acordo com as recomendações do fabricante. Esse RNA total foi utilizado para a confecção do cDNA usando *primers* randômicos e o reagente de transcrição reversa *GoScript Reverse Transcriptase* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

4.9. Real-Time PCR

Para o *real-time PCR* foram utilizados *primers* específicos do domínio III de DENV-2 na concentração de 200 nM e 400 ng do cDNA de células transfectadas com quatro diferentes tratamentos: pVAX, CVT, CVT-MWCNT e CVT-*f*-MWCNT. Foi utilizado o *Eco Real-Time PCR System* (Illumina) e os dados gerados foram analisados no *EcoStudy software* (Illumina). O perfil de amplificação foi: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 30 segundos, 95 °C por 15 segundos.

Sorotipo	Primer	Enzima	Fragmento
DENV-2	5'- CCCCTTAAGGTGCAGGCTGAGAATGGACA -3' 5'- GGGGGTACCTCGCCCAAATGGCCATTC -3'	AfIII KpnI	417 pb

Tabela 1 - Sequência dos *primers*, enzimas de restrição e tamanho do fragmento gerado na amplificação.

4.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após as 24 horas de incubação das células, foram coletados os extratos celulares dos cinco diferentes amostras: somente células e células transfectadas com pVAX vazio, o CVT puro, o CVT-MWCNT e o CVT-*f*-MWCNT. Os mesmos foram analisados 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 extratos celulares foram suspensos em solução tampão redutora e fervidos a 95 °C por 10 minutos e, posteriormente, aplicados no gel juntamente com o marcador de peso molecular de proteínas *Novex Sharp Pre-stained Protein Standard* (Invitrogen) e a eletroforese foi conduzida em solução tampão de corrida (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% pH 8,3), a uma voltagem constante de 190 volts durante uma hora. As bandas proteicas foram visualizadas através da coloração com solução de coomassie coloidal, na qual o gel foi deixado por 24 horas e depois lavado com água destilada.

4.11. Precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA)

Para concentrar as amostras de proteínas de extrato celular foi utilizado o protocolo com TCA, no qual foram adicionados 62,5 µL de TCA 100% em 500 µL de proteína e deixados no gelo por 30 minutos. Posteriormente foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi então lavado com acetona gelada duas vezes a 6.000 x g por 10 minutos, suspenso em água ultrapura e guardado em *freezer* a -20 °C até ser utilizado.

4.12. Western-Blotting

Para visualização da expressão proteica do domínio III pela cultura de células Vero, os diferentes extratos celulares (pVAX, CVT, DNA-MWCNT e DNA-f-MWCNT) precipitados com TCA foram aplicados em gel de poliacrilamida 10% juntamente com o marcador de peso molecular de proteínas *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Novex) e, ao término de uma hora de corrida, foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose de 0,2 µm (Bio Rad) utilizando um eletrotransferidor semi-seco *mini Trans Blot Cell* (Bio Rad) e um tampão de transferência (tris 25 mM, glicina 190 mM e metanol 20%). Após uma hora de transferência as membranas foram cortadas em quatro partes e deixadas em solução de bloqueio (PBS, 0,5% de Tween 20 e 5% de leite em pó) por 16 horas, sob agitação leve. Posteriormente, foram adicionados à solução de bloqueio anticorpos policlonais (1:3000) produzidos em camundongos infectados separadamente com os quatro sorotipos do vírus da dengue. Anticorpos contra

cada um dos sorotipos foram adicionados separadamente em cada uma das quatro membranas e os mesmos foram deixados em contato com as membranas por quatro horas. As mesmas foram então lavadas com PBS-tween três vezes por cinco minutos e foi adicionado em cada membrana o anticorpo secundário (1:10000) anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase e deixado em contato com a membrana por uma hora. Depois as membranas foram lavadas com PBS-tween três vezes por cinco minutos e a revelação foi feita utilizando DAB (3,3'-diaminobenzidine) dissolvido em tris-HCl 50 mM (pH 7,6). Foram adicionados 40 µL de peróxido de hidrogênio em cada membrana e deixado por alguns minutos, sendo que ao aparecerem as bandas proteicas na membrana a reação foi parada com água destilada e as membranas foram deixadas secar e fotografadas.

4.13. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células Vero

Para visualizar os nanotubos no interior das células Vero, as mesmas foram incubadas com MWCNTs e *f*-MWCNTs na concentração de 10 µg/mL por 3 horas e, posteriormente, o meio MEM foi retirado e adicionado tripsina para soltar as células da garrafa de cultura. A suspensão de células foi coletada, centrifugada a 1500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi lavado com PBS três vezes a 1500 x g por 5 minutos e, após as lavagens, as células foram fixadas por duas horas com solução fixadora (glutaraldeído 2,5%; cacodilato de sódio 0,1 M; sacarose 0,2 M). As células fixadas foram lavadas com cacodilato de sódio 0,1 M por cinco minutos e pós-fixadas com tetróxido de ósmio por 30 minutos. Para retirar o excesso de ósmio, as células foram lavadas com cacodilato de sódio 0,1 M por cinco minutos e em seguida foram feitos os passos de desidratação com soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (50%, 70%, 90%, 95% e 100%). Posteriormente, as células foram infiltradas com resina LRWhite (Agar Scientific) na proporção de 2:1 (álcool 100% : resina) por 40 minutos, depois com resina LR White (Agar Scientific) na proporção de 1:1 (álcool 100% : resina) por 40 minutos e, ao final, deixadas infiltrando com resina LR White pura por 16 horas, sendo que todos esses passos de infiltração da resina foram feitos em geladeira a 4 °C. Após esse tempo a resina foi retirada e foi colocada resina pura nova nas amostras em tubos próprios para emblocar o material biológico, deixando-as em estufa a 65

°C por 48 horas para solidificar a resina. Ao final desse tempo os blocos de resina com o material biológico foram retirados dos tubos onde estavam e levados ao ultramicrotomo para serem feitos os cortes do material (100 nm), os quais foram coletados em *grids* que foram então contrastadas. Para esse passo, as *grids* foram deixadas em solução de uranila 1% por 15 minutos, lavadas em água destilada 50 vezes, deixadas em solução de citrato de chumbo por 8 minutos e, finalmente, lavadas mais 50 vezes em água destilada. As *grids* foram então levadas ao microscópio eletrônico de transmissão para obtenção das imagens, as quais foram feitas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

4.14. Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

Com o objetivo de avaliar se os MWCNTS são tóxicos para as células Vero, foi feito o ensaio de citotoxicidade celular com as mesmas, as quais foram cultivadas em placas de 96 poços, com um número inicial de 10^4 células por poço, até atingir a confluência. As células foram cultivadas em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂. Após aderência das células, foi retirado o meio e adicionado 100 µL de amostras de MWCNT, DNA-MWCNT, *f*-MWCNT e DNA-*f*-MWCNT diluídos em meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino, nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL de nanotubos. O controle deste ensaio foi feito com poços onde só foi adicionado meio MEM e todos os testes foram feitos em triplicatas. Posteriormente, as placas foram incubadas por 24 horas e, após esse tempo, o meio foi retirado e foi adicionado às células 100 µL de MTT (5 mg/mL), diluído 10 vezes em meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino, em todos os poços e as placas foram incubadas por 4 horas, nas mesmas condições. Após o período de incubação, o meio contendo MTT foi retirado e foi adicionado 100 µL de uma solução isopropanol-HCl nos poços para solubilizar os cristais de formazana. As placas foram agitadas levemente à temperatura ambiente por 20 minutos para solubilização dos cristais e foi feita a leitura no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 590 nm.

4.15. Imunização de camundongos

Neste estudo foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c de cinco semanas de idade, os quais foram divididos em quatro grupos, com quatro animais em cada grupo, de acordo com o material inoculado nos mesmos. Os grupos são: grupo 1: pVAX; grupo 2: CVT; grupo 3: *f*-MWCNT; grupo 4: CVT-*f*-MWCNT. Para os testes com os camundongos foram utilizados 100 µg de DNA e os nanotubos na concentração de 10 µg/mL, sendo que nessa etapa de estudos *in vivo* só foram utilizados os *f*-MWCNTs, uma vez que, os CNTs não funcionalizados são insolúveis e geram maior resposta inflamatória local. Um dia antes da primeira dose de imunização o sangue de alguns camundongos foi coletado por punção venosa do saco retro-orbitário e processado para obtenção do soro, sendo este soro chamado de pré-imune. Nesse processo, as amostras de sangue foram deixadas a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir a coagulação sanguínea, depois centrifugadas a 2500 x g por 10 minutos e o soro contido no sobrenadante foi coletado e reunido em um único *pool* de soro, o qual foi armazenado em *freezer* a -20 °C. No dia seguinte, cada camundongo de cada um dos quatro grupos foi inoculado por via intramuscular com as amostras referentes a cada grupo. Tais procedimentos de imunizações foram repetidos mais duas vezes com intervalos de 15 dias entre eles. Além disso, 14 dias após cada uma das três imunizações o sangue de cada um dos camundongos foi coletado e processado para obtenção do soro, da mesma forma que foi feito com o soro pré-imune, sendo os *pools* de soro coletados de cada grupo armazenados em *freezer* a -20 °C e, posteriormente, testados quanto a presença de anticorpos contra diferentes sorotipos dos vírus da dengue. Os camundongos foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e mantidos no biotério do Laboratório de Immunovirologia Molecular da UFV. Durante todo o período experimental os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em local com controle de temperatura, ventilação e fotoperíodo, sendo que a metodologia utilizada nesse projeto foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal de Viçosa, nomeado como processo 70/2013.

4.16. Teste de neutralização por redução em placa (PRNT)

Para verificar se os camundongos imunizados produziram anticorpos neutralizantes contra o domínio III da proteína E presente no CVT, foram feitas diluições seriadas (1:1 até 1:512) dos *pools* de soro coletados de cada grupo (pVAX; CVT; *f*-MWCNT; CVT-*f*-MWCNT) e os mesmos foram incubados com os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3, previamente titulados. Para tanto, 100 μ L de cada diluição dos *pools* de soro foram adicionados à 100 μ L de cada sorotipo do vírus, de modo que cada poço da placa de ensaio tivesse uma quantidade de 100 PFU de vírus. Tal mistura de soro e vírus foi mantida a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 90 minutos, e, posteriormente, 100 μ L foram adicionados em monocamadas de células Vero cultivadas em placas de 24 poços (na quantidade inicial de 4×10^4 células por poço) e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante, para permitir a adsorção viral. O controle positivo recebeu 100 PFU do vírus e o controle negativo 100 μ L de meio MEM incompleto e todos os testes foram feitos em duplicata. Após este período de adsorção, foi adicionado à cultura 1,5 mL de meio “sobre camada” (Meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino e carboximetilcelulose 3% na proporção de 2:1). As placas foram estocadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por quatro dias e, após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído na concentração final de 2,5 %, deixadas em contato com o fixador por duas horas a 37 °C. Após a fixação o meio foi removido, as células foram lavadas com água e coradas com cristal violeta 5% por 45 minutos. As placas de lise presentes foram contadas e comparadas com o controle positivo para verificar se houve redução no número das placas. Os dados foram analisados pelo *software GraphPad Prism* versão 6.01.

4.17. Imunofenotipagem

Os baços de cada camundongo imunizados nos quatro diferentes grupos foram extraídos e macerados em meio RPMI com 2% de soro fetal bovino (SFB). O extrato de tecido foi transferido para tubos cônicos de 15 mL e centrifugado a 500 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em tampão de lise de hemácias, deixado por 5 minutos a 4 °C e novamente centrifugado a 500 x g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com meio RPMI com 2%

de SFB, sendo posteriormente suspenso no mesmo meio. As células foram contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico e foi feito o cálculo para utilizar 1×10^7 células por poço, as quais foram semeadas em placas de 96 poços e foi adicionado no meio tampão *FACS buffer* (PBS 1X, SFB 2% e EDTA 3 mM). As células foram centrifugadas a 500 x g por 2 minutos em centrífuga de placa e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado e no precipitado foram adicionados anticorpos específicos para moléculas de superfície dos linfócitos, sendo estes anticorpos conjugados com fluoróforos para detecção por citometria de fluxo (CD3 – FITC; CD4 – APC Cy 7; CD8 – PE Cy 7; CD19 – PerCP Cy 5.5; CD44 – PE; CD62L – APC). Os mesmos foram deixados em contato com as células por 30 minutos a 4 °C com *FACS buffer*, depois centrifugadas a 500 x g por 2 minutos e lavadas com *FACS buffer*. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em *FACS buffer*, no qual foi adicionado iodeto de propídeo (0,5 µg/mL). Finalmente, as células foram levadas para análise no citômetro *BD FACSVerser Flow Cytometer* (BD) do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

4.18. Ensaio de linfoproliferação

Células do baço coletadas na metodologia descrita no item anterior foram contadas em câmara de Neubauer e foi feito o cálculo para utilizar 1×10^7 células por poço, as quais foram semeadas em placas de 96 poços e foi adicionado meio contendo PBS 1X estéril, 0,1% de SFB e CFSE na diluição de 1:1000. As células foram deixadas nesse meio por 10 minutos a 37 °C, lavadas três vezes com RPMI + SFB 10%, centrifugadas a 500 x g por 5 minutos a 4 °C e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em meio RPMI com 10% de SFB. Nesse meio foram adicionados os estímulos com amostras de cada um dos quatro sorotipos do vírus da dengue (MOI de 0.1), os quais são provenientes de extratos de cérebro de camundongos infectados. Como controle negativo foram utilizadas células só com meio e como controle positivo foram utilizadas células estimuladas com concanavalina A (7,5 mg/mL), sendo que todos os testes foram feitos em duplicata. Após três dias de estimulação, o sobrenadante da cultura de células foi coletado e guardado em *freezer* a -80 °C, para serem utilizados no ensaio de detecção de citocinas. No precipitado de células foram adicionados os anticorpos para CD4, CD8 e CD19 diluídos em

FACS buffer (1:400) e deixados em contato com as mesmas por 30 minutos a 4 °C. As células foram então lavadas três vezes com *FACS buffer* a 500 x g por 2 minutos, suspensos em *FACS buffer* adicionado com iodeto de propídeo (0,5 µg/mL) e levados ao citômetro *BD FACSVerser Flow Cytometer* (BD) do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

4.19. Detecção de citocinas

Para detecção das citocinas produzidas pelas células estimuladas no ensaio de linfoproliferação, o sobrenadante que tinha sido coletado e guardado em freezer a -80 °C foi analisado utilizando o *BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD) de acordo com as recomendações do fabricante, sendo possível detectar com esse *kit* as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF, IL-17A e IL-10. As amostras foram analisadas no citômetro *BD FACSVerser Flow Cytometer* (BD) do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

5. RESULTADOS

5.1. Microscopia eletrônica dos DNA-MWCNTs

Nas análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi possível observar que houve conjugação do DNA plasmidial com os CNTs, sendo que os *f*-MWCNTs apresentaram maior afinidade pelo DNA do que o MWCNT não funcionalizado. Também foi visto que o DNA se ligou preferencialmente nas extremidades dos *f*-MWCNTs, os quais apresentaram maior tendência em formarem grandes aglomerados (figura 1).

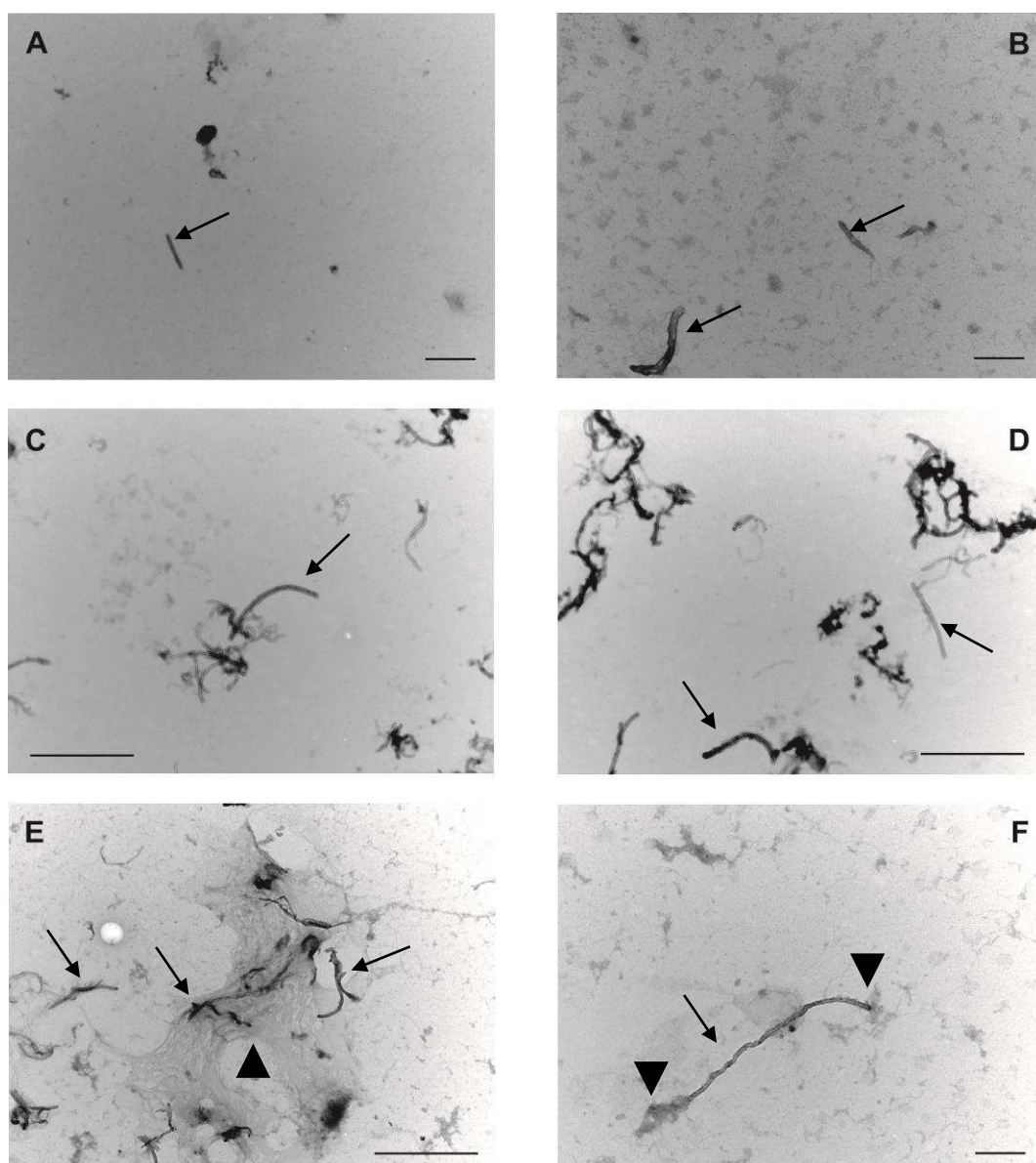


Figura 1 - MET dos MWCNTs (setas) puros e conjugados com DNA plasmidial (cabeças de seta). **A** – MWCNT; **B** – DNA-MWCNT; **C** e **D** – *f*-MWCNT; **E** e **F** – DNA-*f*-MWCNT. As barras de escala em **A**, **B** e **F** indicam 200 nm e em **C**, **D** e **E** indicam 1 μ m.

Células Vero transfectadas com os MWCNTs e os *f*-MWCNTs também foram submetidas a MET para visualização da presença dos mesmos no interior celular. Foi possível observar que os CNTs de fato entraram nas células, estando localizados tanto no citoplasmas como no núcleo celular, embora as células transfectadas com os *f*-MWCNTs tenham tido uma maior tendência em apresentar os CNTs no interior do núcleo (figuras 2 e 3). Esse fato é devido ao processo de funcionalização, o qual melhora a capacidade de penetração dos CNTs pelas membranas celulares.

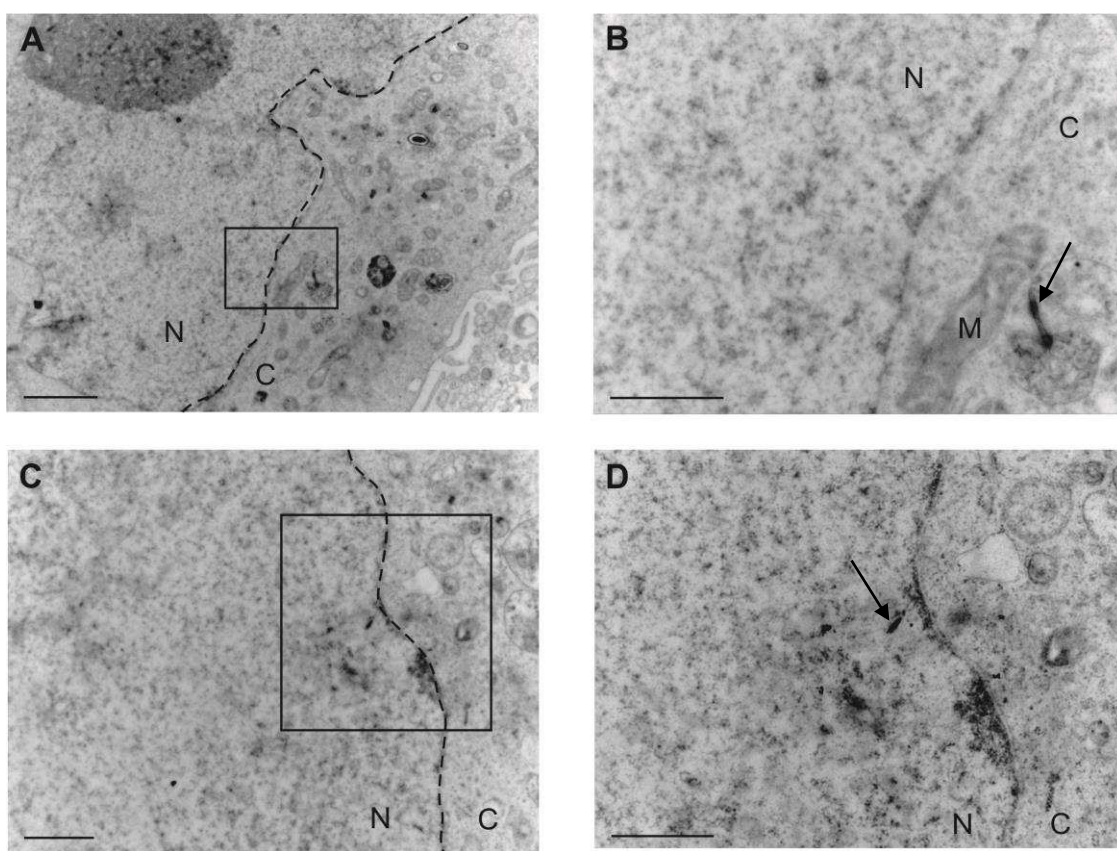


Figura 2 – MET das células Vero transfectadas com MWCNTs (setas) mostrando que os mesmos se encontram tanto no citoplasma (**A**) como no núcleo (**C**). **B** e **D** estão mostrando o detalhe destacado em **A** e **C**, respectivamente. A barra de escala em **A** indica 2 μm e em **B**, **C** e **D** indica 1 μm . **N** – núcleo; **C** – citoplasma; **M** – mitocôndria.

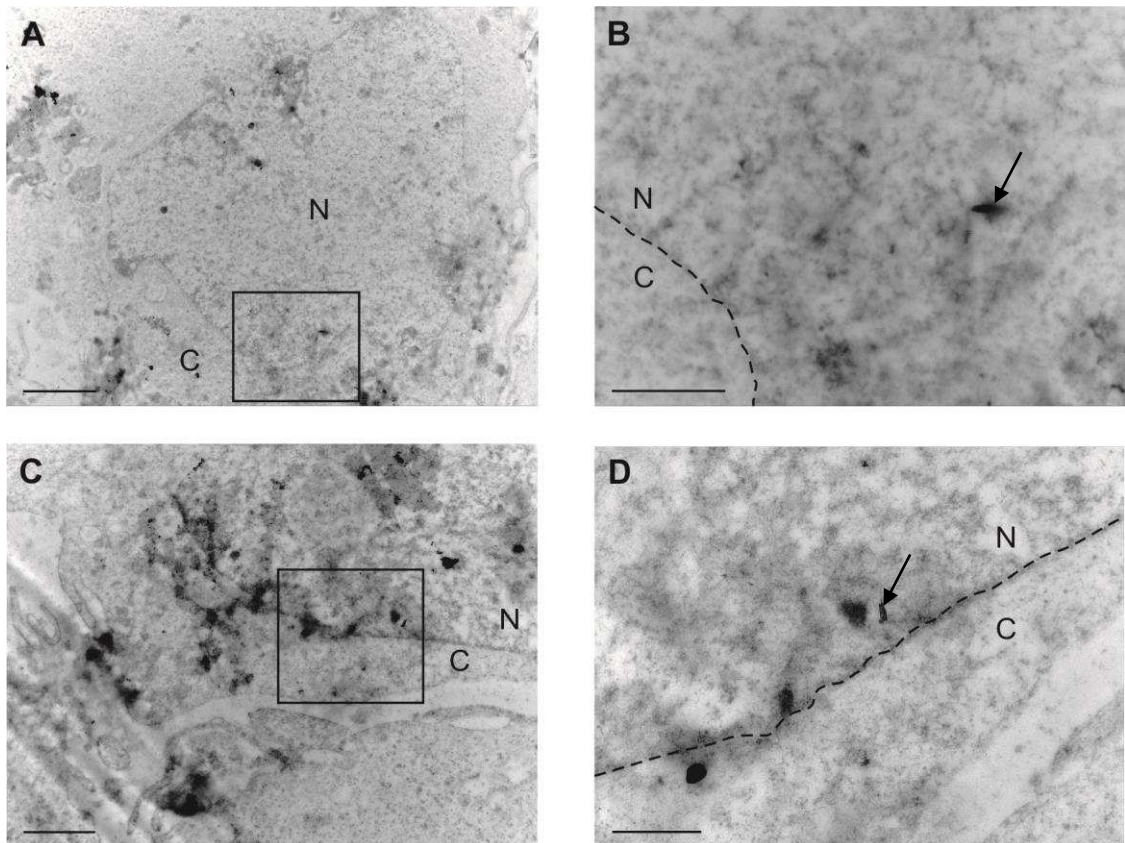


Figura 3 – MET das células Vero transfetadas com *f*-MWCNTs (setas) mostrando a presença deles no núcleo da célula tanto em **A** quanto de **C**. **B** e **D** estão mostrando o detalhe destacado em **A** e **C**, respectivamente. A barra de escala em **A** indica 2 μ m, em **B** e **C** indica 1 μ m e em **D** indica 500 nm. **N** – núcleo; **C** – citoplasma.

5.2. *Real-Time PCR* das células transfetadas

Células transfetadas com os MWCNTs funcionalizados e não funcionalizados, quando utilizados puros ou conjugados com DNA plasmidial, foram analisadas para saber se o CVT conjugado com os MWCNTs levaria as células a produzirem RNAs mensageiros do domínio III da proteína E. Para isso, foi feito um *Real-Time PCR* utilizando *primers* somente do domínio III do sorotipo DENV-2, onde foi observado que células transfetadas, utilizando lipofectamina, com o CVT tiveram um aumento significativo nos níveis de RNAm mensageiro, enquanto que o CVT conjugado com os MWCNTs e *f*-MWCNTs tiveram um aumento menor de RNAm quando comparados com o controle, o qual foi representado por células transfetadas com o plasmídeo pVAX vazio (figura 4).

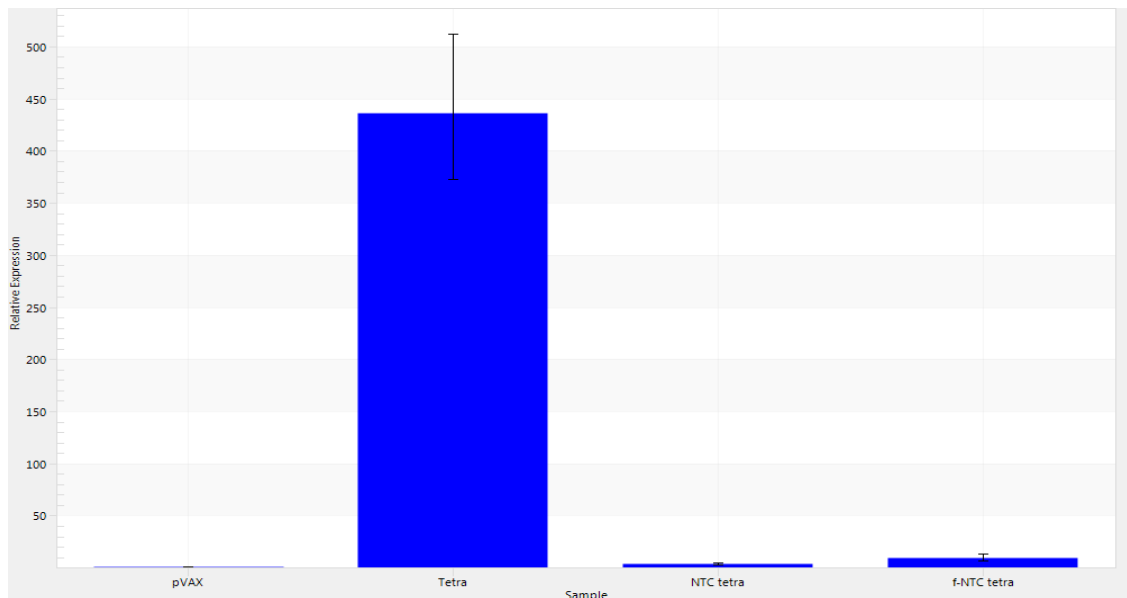


Figura 4 - RT-PCR de células Vero transfectadas com o plasmídeo pVAX vazio, o CVT sozinho, o CVT conjugado com MWCNT e o CVT conjugado com *f*-MWCNT.

5.3. SDS-PAGE e *Western Blotting* das células transfectadas

Células transfectadas com as mesmas formulações do item anterior foram avaliadas quanto à expressão proteica dos domínios III presentes no CVT, tanto por SDS-PAGE (figura 5) quanto por *Western Blotting* (figura 6). Ambos os métodos utilizados não foram muito elucidativos para saber se a proteína foi expressa corretamente nas células, uma vez que, não foram observadas bandas proteicas diferentes nas células tratadas com o CVT puro ou quando conjugado com MWCNT e *f*-MWCNT ao se comparar com as células usadas como controle, as quais foram transfectadas com o plasmídeo pVAX vazio.

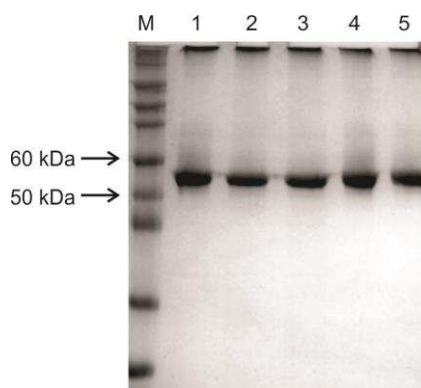


Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% de extrato de células Vero tratadas com diferentes preparações. **M**- marcador de peso molecular; **1**- células não transfectadas; **2**- células transfectadas com pVAX; **3**- células transfectadas com CVT; **4**- células transfectadas com CVT-MWCNT; **5**- células transfectadas com CVT-*f*-MWCNT.

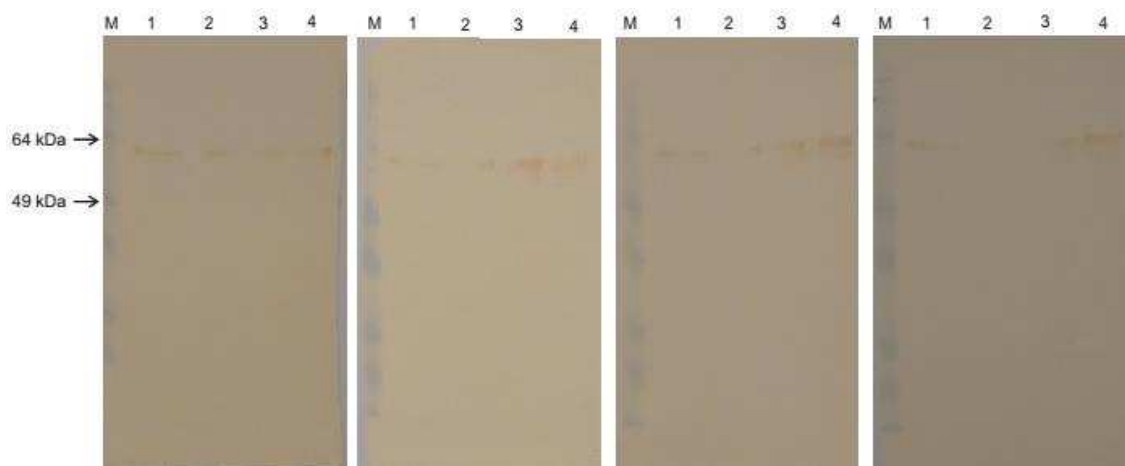


Figura 6 – *Western Blotting* de extrato de células Vero tratadas com diferentes preparações, no qual em cada uma das quatro membranas foram usados anticorpos policlonais contra cada um dos sorotipos do vírus da dengue, na sequência do DENV-1 ao DENV-4. Em todas as membranas as legendas são iguais: **M**- marcador de peso molecular; **1**- células transfectadas com pVAX; **2**- células transfectadas com CVT; **3**- células transfectadas com CVT-MWCNT; **4**- células transfectadas com CVT-*f*-MWCNT.

5.4. Ensaio de viabilidade celular com MTT

Para prosseguir com os estudos em camundongos, primeiramente foi feito um ensaio de viabilidade celular com MTT para determinar qual concentração de CNT gera um efeito citotóxico em células Vero. Para tanto, as células foram incubadas com as quatro diferentes preparações (MWCNT, DNA-MWCNT, *f*-MWCNT, DNA-*f*-MWCNT) em concentrações crescentes de CNTs (de 1 a 200 µg/mL). Um problema com esse ensaio foi o fato de que os MWCNTs, insolúveis em meio aquoso, aderiram no fundo dos poços da placa de cultura celular, o que atrapalhou a leitura no espectrofotômetro. Foi utilizado como base para os estudos seguintes os dados obtidos com os *f*-MWCNTs, sendo que a concentração escolhida para os testes em camundongos foi a de 10 µg/mL (figura 7).

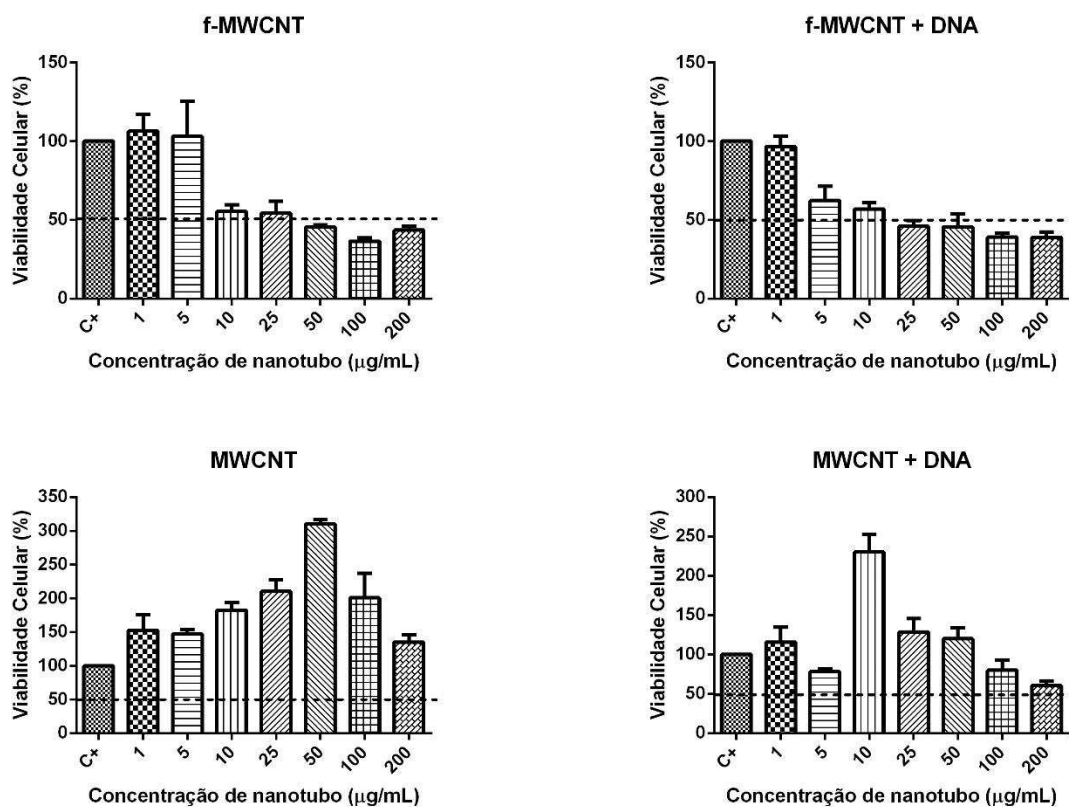


Figura 7 – Ensaio de MTT com células Vero tratadas com as preparações de MWCNTs e *f*-MWCNTs puros ou conjugados com DNA plasmidial.

5.5. Ensaio de PRNT

Para determinar se os camundongos submetidos aos quatro diferentes tratamentos (pVAX vazio, CVT, *f*-MWCNT CVT-*f*-MWCNT) apresentaram produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus da dengue, foi feito o ensaio de PRNT com o soro obtido dos camundongos. Os resultados desses testes não foram muito conclusivos, uma vez que, em muitas das placas de cultura houve descolamento da monocamada de células, atrapalhando na contagem das placas de lise formadas e, além disso, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos tratados com o CVT puro ou conjugado com *f*-MWCNT quando comparados com o controle (pVAX). Além disso, os soros dos animais submetidos aos diferentes tratamentos nos intervalos de 15, 30 e 45 dias não apresentaram redução no número de placas de lise quando comparados com o soro pré-imune desses mesmos animais. Esse ensaio foi feito utilizando os sorotipos DENV-1 (figura 8), DENV-2 (figura 9) e DENV-3 (figura 10).

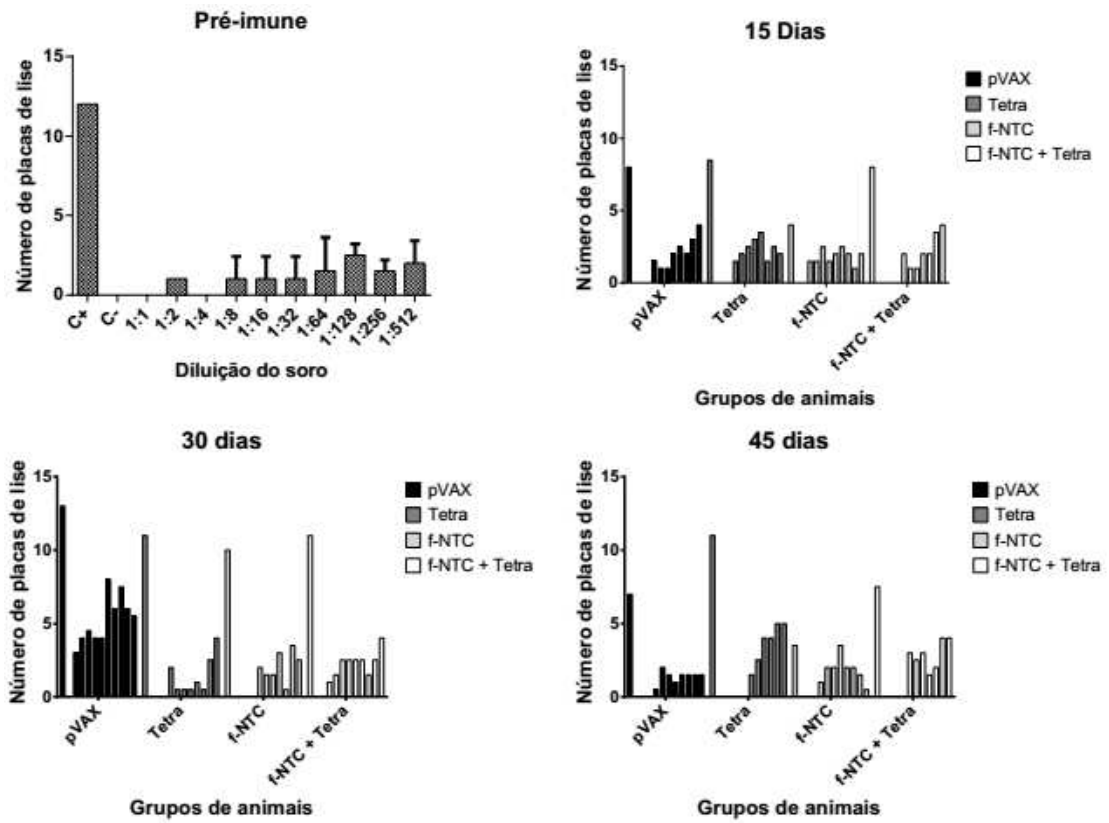


Figura 8 – PRNT do soro de camundongo incubado com DENV-1.

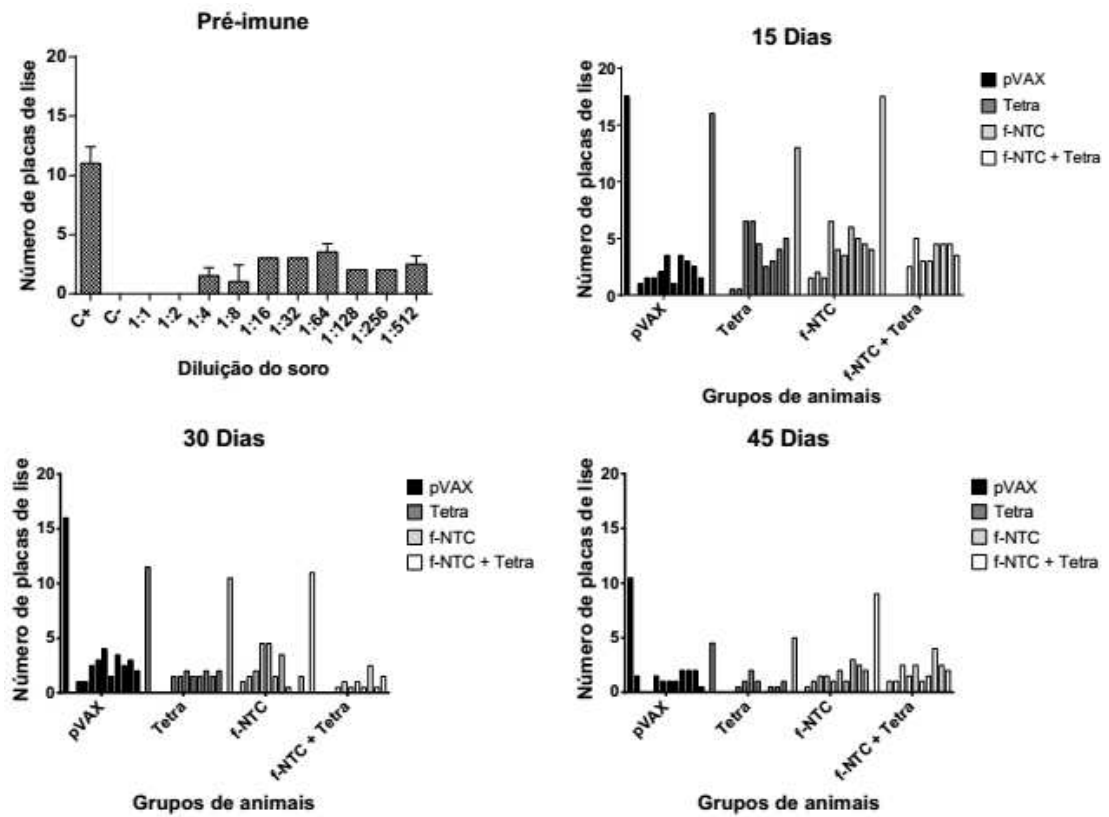


Figura 9 - PRNT do soro de camundongo incubado com DENV-2.

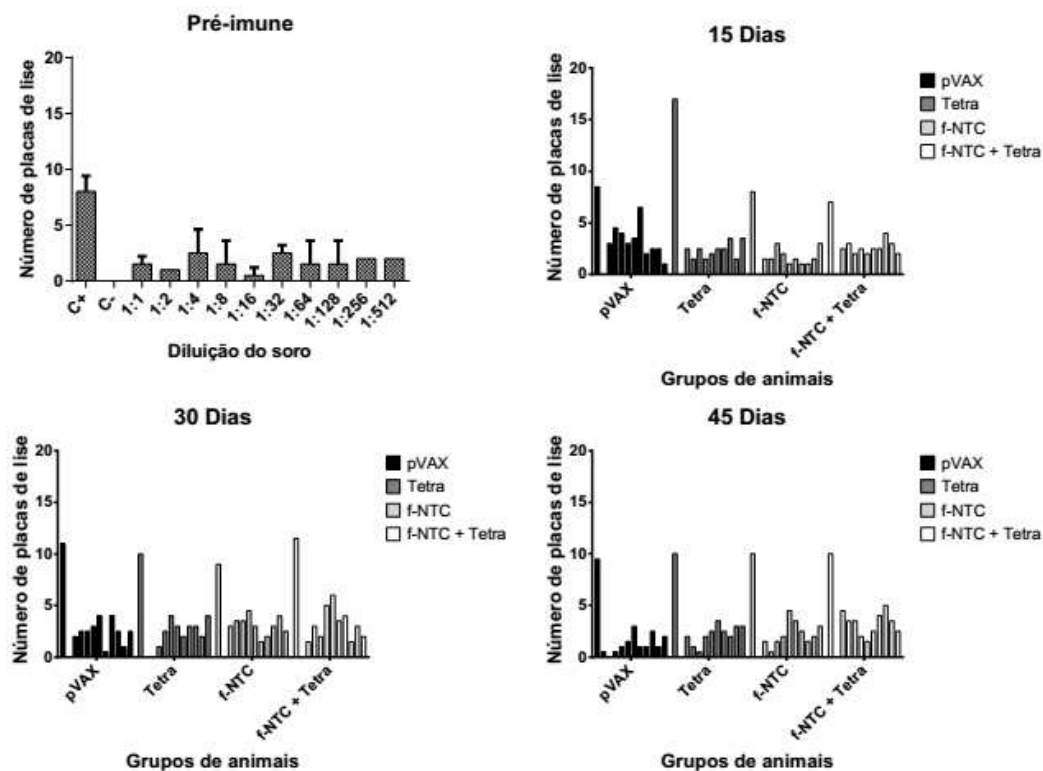


Figura 10 - PRNT do soro de camundongo incubado com DENV-3.

5.6. Imunofenotipagem, linfoproliferação e detecção de citocinas.

Na parte final do trabalho foram feitos ensaios para determinar o perfil de reposta imunológica gerada nos camundongos submetidos aos quatro diferentes tratamentos (pVAX, CVT, *f*-MWCNT e CVT-*f*-MWCNT). Na imunofenotipagem foi avaliada a quantidade de células B, CD4⁺, CD8⁺ e CD62L *low* em cada animal de cada um dos quatro grupos de tratamento, sendo que somente as células B tiveram aumento na contagem de células quando foi comparado o CVT puro e o CVT-*f*-MWCNT com o controle pVAX (figura 11). Porém no ensaio de linfoproliferação não foi possível observar um aumento significativo de linfócitos entre os grupos de animais tratados com CVT e CVT-*f*-MWCNT e os animais controle pVAX, sob diferentes estímulos (figura 12). Já no ensaio para avaliar a produção de citocinas pelos linfócitos dos animais dos quatro tratamentos, quando estimulados com os quatro sorotipos do vírus, só foi observado aumento significativo na produção de IL-10, IL-6 e IFN- γ pelos animais tratados com o CVT sozinho (figuras 13 e 14).

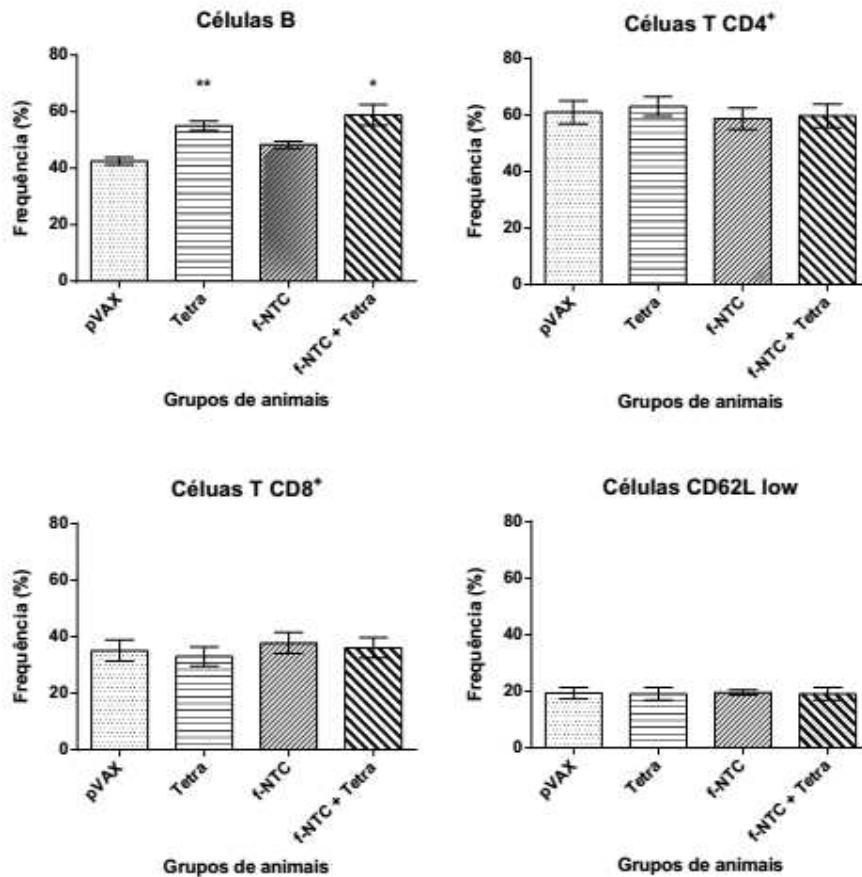


Figura 11 – Imunofenotipagem dos linfócitos dos animais submetidos aos quatro diferentes tratamentos (pVAX, CVT, *f*-MWCNT, CVT-*f*-MWCNT).

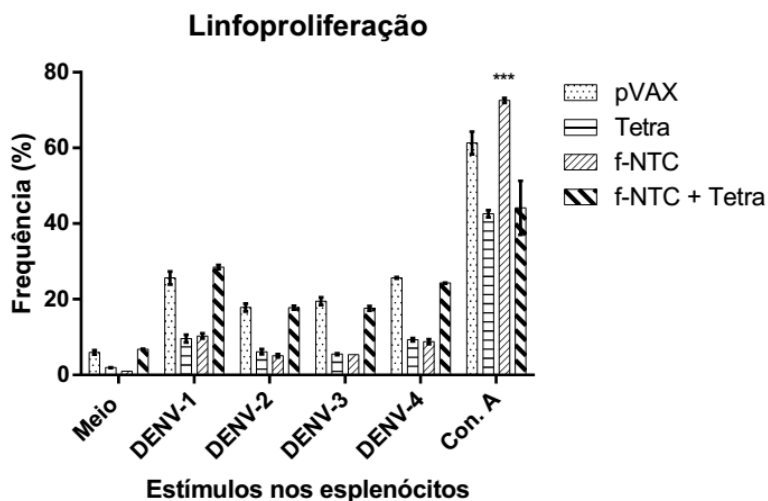


Figura 12 – Linfoproliferação dos linfócitos dos animais submetidos aos quatro diferentes tratamentos (pVAX, CVT, *f*-MWCNT, CVT-*f*-MWCNT) quando estimulados com os quatro sorotipos do vírus da dengue, o meio (controle negativo) e concanavalina A (controle positivo).

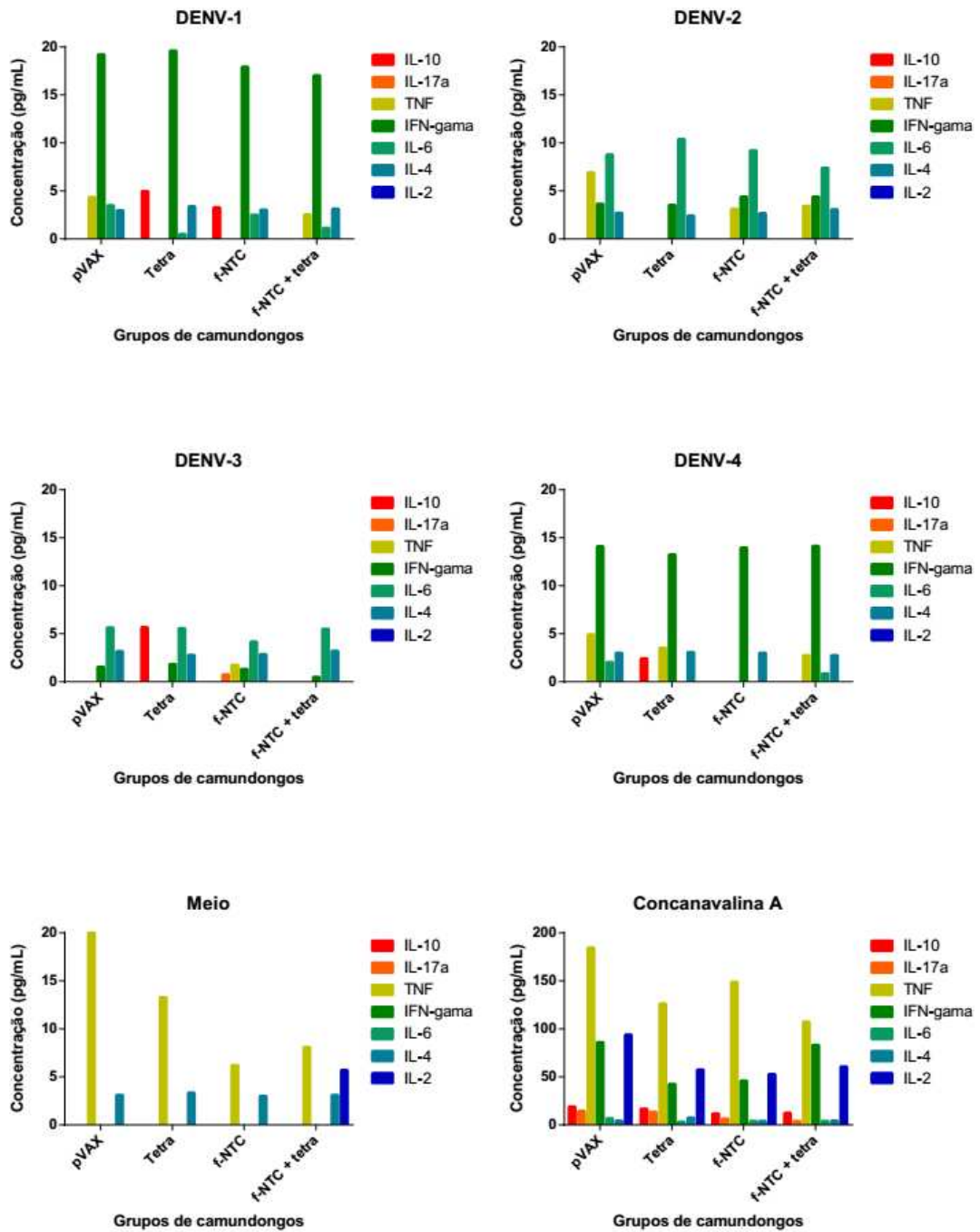


Figura 13 – Perfil de citocinas produzidas pelos linfócitos dos animais submetidos aos quatro diferentes tratamentos (pVAX, CVT, *f*-MWCNT, CVT-*f*-MWCNT) quando estimulados com os quatro sorotipos do vírus da dengue, o meio (controle negativo) e concanavalina A (controle positivo).

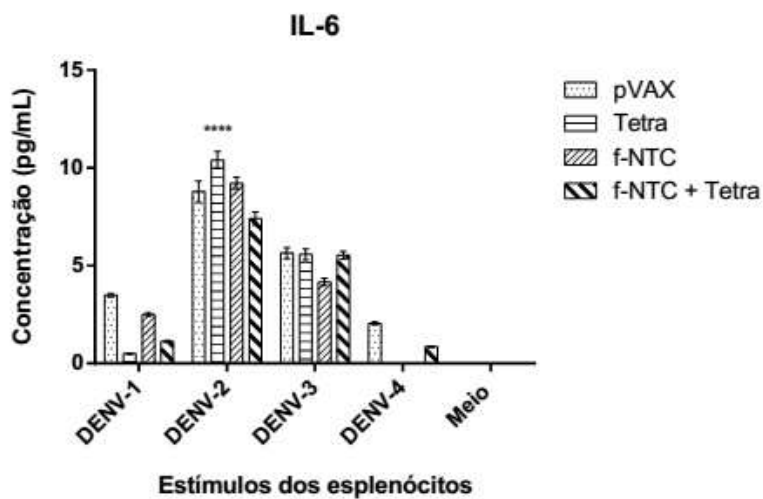
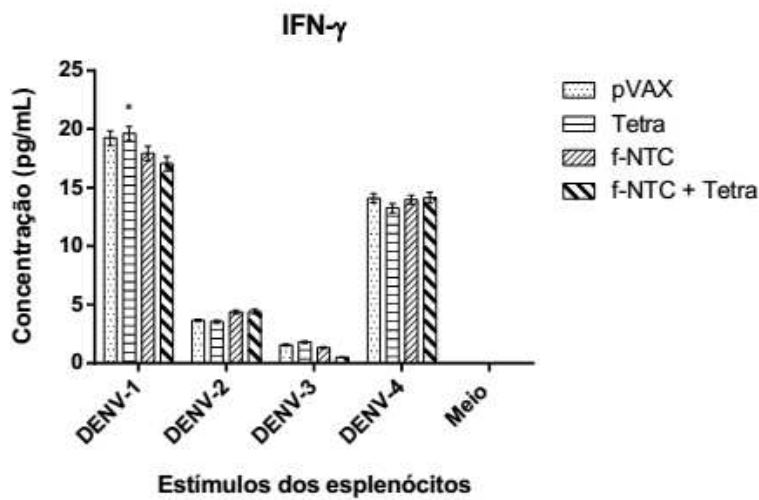
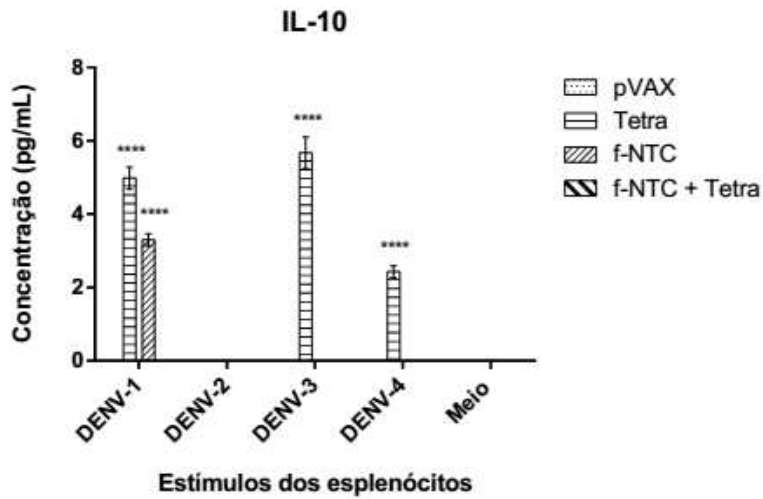


Figura 14 – Destaque das citocinas que tiveram aumento significativo, mostrando os níveis produzidos pelos linfócitos dos animais submetidos aos quatro diferentes tratamentos (pVAX, CVT, f-MWCNT, CVT-f-MWCNT) quando estimulados com os quatro sorotipos do vírus da dengue e o meio (controle negativo).

6. DISCUSSÃO

Recentemente estudos vêm demonstrando que os nanotubos de carbono são bons candidatos para o uso como veículos para transfecção de material exógeno em células, como DNA e proteínas, uma vez que os mesmos atravessam a membrana celular de forma passiva sem causar danos à célula e com baixos níveis de citotoxicidade. Assim como foi observado nos trabalhos de Bianco e de Kostarelos, no presente estudo foi demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão que os nanotubos foram internalizados pelas células Vero, sendo encontrados tanto no citoplasma quanto no núcleo (BIANCO *et al.*, 2005b; KOSTARELOS *et al.*, 2007) além de ter sido mostrado que houve a associação do DNA plasmidial tanto com os MWCNTs funcionalizados quanto os não-funcionalizados.

Apesar de estudos anteriores terem mostrado um aumento nos níveis de expressão gênica de plasmídeos conjugados com CNTs funcionalizados e transfectados em cultura celular, com valores variando de 5 a 10 ordens de magnitude de aumento (GAO *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2005; PANTAROTTO *et al.*, 2004b; RICHARD *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2005) nossos resultados não indicaram que a conjugação do DNA plasmidial com os MWCNTs funcionalizados aumenta os níveis de transcrição do gene do domínio III da proteína E que foi inserido no plasmídeo. Só foi observado aumento significativo da transcrição gênica em células tratadas com o candidato vacinal tetravalente sozinho, o qual foi transfectado usando a *lipofectamine 2000*, resultado semelhante ao obtido por Gao e colaboradores (GAO *et al.*, 2006). Isso pode ser devido ao fato de que os *f*-MWCNTs utilizados nesse estudo foram funcionalizados de maneira a gerar grupos carboxílicos na superfície dos mesmos, o que daria a eles um caráter de carga negativa diminuindo a quantidade de DNA que poderia se ligar a superfície desses CNTs. Além disso, as análises de expressão proteica por SDS-PAGE e *Western Blotting* não foram muito conclusivas, pois não foi possível observar se houve aumento na expressão do domínio III quando comparados com células tratadas com o plasmídeo pVAX vazio. Tal fato pode ter ocorrido devido ao tipo celular utilizado, uma vez que nos estudos anteriores não foram utilizadas células Vero e ao fato

que houve aumento muito pequeno da transcrição gênica, como mostrado pelo resultado do *Real-Time PCR*.

Para os estudos com camundongos foi feito anteriormente o ensaio de viabilidade celular com MTT para determinar qual a concentração de MWCNTs que teria citotoxicidade baixa em cultura de células Vero. A concentração escolhida para os ensaios *in vivo* foi de 10 µg/mL, a qual é condizente com outros estudos mostrando que concentrações de CNTs entre 5 e 20 µg/mL não apresentam citotoxicidade quando testados em cultura celular (MCSHAN *et al.*, 2012; PULSKAMP *et al.*, 2007; VITTORIO *et al.*, 2009).

Para avaliação da produção de anticorpos neutralizantes por meio do ensaio de PRNT não foi possível determinar se os tratamentos com o CVT puro ou conjugado com *f*-MWCNTs gerou um aumento na produção de anticorpos no soro dos animais, uma vez que, não foi observado diminuição do número de placas de lise quando comparados os soros de camundongos tratados com o soro dos animais usados como controle, inoculados com o plasmídeo pVAX vazio. Além disso, não foi observada diminuição no número de placas de lise quando comparados o soro dos animais submetidos aos tratamentos nos intervalos de 15, 30 e 45 dias e o soro pré-imune desses mesmos animais, o qual era esperado que apresentasse número elevado de placas de lise, uma vez que, esse soro foi retirado de animais que não tiveram contato com nenhum antígeno do vírus da dengue e, conseqüentemente, não apresentam anticorpos contra o mesmo.

Pelo ensaio de linfoproliferação foi possível observar que houve um aumento na produção de células B em animais tratados com o CVT puro ou conjugados com *f*-MWCNTs, quando comparados com animais tratados com o pVAX vazio. Esse é um dado importante pois indica um aumento das células produtoras de anticorpos nesses animais, algo que é desejado que aconteça para o uso como uma futura vacina.

Além disso, esse estudo mostrou que os animais tratados com o CVT puro geraram um aumento na produção de IL-10, IFN-γ e IL-6 quando comparado com os animais controle tratados com o pVAX vazio, porém não foi observada uma diferença na produção dessas citocinas quando o CVT foi administrado

conjugado com o *f*-MWCNT. A produção de IFN- γ e IL-6 é desejada em uma resposta contra um vírus, uma vez que essas são citocinas pró-inflamatórias que ajudam no combate a infecção. Porém, a produção de IL-10 não é muito favorável a um quadro de resposta anti-viral uma vez que essa é uma citocina anti-inflamatória que inibe células de resposta imunológica, como macrófagos e células dendríticas.

Talvez essa baixa resposta imunológica produzida pelos animais tratados com o CVT puro ou conjugado com o *f*-MWCNT possa ser devido a rota de imunização escolhida, que foi a intramuscular, uma vez que estudos anteriores analisando o efeito de CNTs em animais utilizaram as rotas intravenosa (LIU *et al.*, 2008; QU *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2010), intraperitoneal (POLAND *et al.*, 2008; YAMASHITA *et al.*, 2010) e subcutânea (SATO *et al.*, 2005) com formação de inflamação no local e geração de uma resposta imune mais intensa.

7. CONCLUSÃO

Com esse estudo podemos concluir que o candidato vacinal de DNA tetravalente desenvolvido apresentou resultados pouco satisfatórios quando testado *in vitro*, uma vez que o aumento na transcrição gênica vista por *Real-Time PCR* não foi correspondido com aumento de expressão proteica analisada por *western blotting*, além de não ter sido gerado anticorpos neutralizantes contra os sorotipos do vírus da dengue. Resultados interessantes foram observados com relação ao aumento da contagem de células B e a produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-6, aspectos importantes na resposta antiviral. Tal quadro gerado mostra que mais estudos necessitam ser feitos nessa área de nanobiotecnologia, para determinar melhor qual o tipo de funcionalização é a ideal para conjugação de CNTs com DNA plasmidial, qual a via de inoculação é mais adequada em camundongos e qual a concentração ideal de DNA e de nanotubos de carbonos a ser utilizada para testes com animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T.M.; CULLIS, P.R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.

AWASTHI, K.; SRIVASTAVA, A.; SRIVASTAVA, O.N.; Synthesis of carbon nanotubes. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, p. 1616-1636, 2005.

BEG, S.; RIZWAN, M.; SHEIKH, A.M.; HASNAINA, M.S.; ANWER, K.; KOHLI, K. Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 141–163, 2011.

BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 674-679, 2005a.

BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PARTIDOS, C.D.; PRATO, M. Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. **Chemical Communications**, v. 5, p. 571-577, 2005b.

BOTTINI, M.; BRUCKNER, S.; NIKA, K.; BOTTINI, N.; BELLUCCI, S.; MAGRINI, A.; BERGAMASCHI, A.; MUSTELIN, T. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 121-126, 2006.

CHEN, Y.; MARGUIRE, T.; HILEMAN, R.; FROMM, J.; ESKO, J.; LINHARDT, R.; MARKS, R. Dengue virus infectivity depends on envelop protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 866-871, 1997.

CHEN, S.; YU, M.; JIANG, T.; DENG, Y.; QIN, C.; QIN, E. Induction of tetravalent protective immunity against four dengue serotypes by the tandem domain III of the envelope protein. **DNA and Cell Biology**, v. 26, n. 6, p. 361-367, 2007.

COCCINI, T.; RODA, E.; SARIGIANNIS, D.A.; MUSTARELLI, P.; QUARTARONE, E.; PROFUMO, A.; MANZO, L. Effects of water-soluble functionalized multi-walled carbon nanotubes examined by different cytotoxicity

methods in human astrocyte D384 and lung A549 cells. **Toxicology**, v. 269, p. 41-53, 2010.

COSTA, S. M.; AZEVEDO, A. S.; PAES, M. V.; SARGES, F. S.; FREIRE, M. S.; ALVES, A. M. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. **Virology**, v. 358, n. 2, p. 413-423, 2007.

DEAN, D.A.; STRONG, D.D.; ZIMMER, W.E. Nuclear entry of nonviral vectors. **Gene Therapy**, v. 12, p. 881-890, 2005.

DE PAULA, S. O.; LIMA, D. M.; DE OLIVEIRA FRANCA, R. F.; GOMES-RUIZ, A. C.; DA FONSECA, B. A. A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. **Archives of Virology**, v. 153, n. 12, p. 2215-2223, 2008.

DING, L.; STILWELL, J.; ZHANG, T.; ELBOUDWAREJ, O.; JIANG, H.; SELEGUE, J.P.; COOKE, P.A.; GRAY, J.W.; CHEN, F.F. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. **Nano Letters**, v. 5, p. 2448-2464, 2005.

DONNELLY, J.J.; ULMER, J.B.; SHIVER, J.W.; LIU, M.A. DNA Vaccines. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 617-648, 1997.

DONNELLY, J. J.; WAHREN, B.; LIU, M. A. DNA Vaccines: Progress and Challenges. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 633-639, 2005.

FOLDVARI, M.; BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Drug delivery and biocompatibility issues. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, p. 183-200, 2008a

FOLDVARI, M.; BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, p. 173-182, 2008b.

FONSECA, B.; PINCUS, S.; SHOPE, R.E.; PAOLETTI, E.; MASON, P.W. Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, v. 12, n. 3, p. 279-285, 1994.

FRANÇA, R. F. O.; ZUCOLOTO, S.; FONSECA, B. A. L. A BALB/c mouse model shows that liver involvement in dengue disease is immune-mediated. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, p. 321-326, 2010.

GAO, L.; NIE, L.; WANG, T.; QIN, Y.; GUO, Z.; YANG, D.; YAN, X. Carbon Nanotube Delivery of the GFP Gene into Mammalian Cells. **ChemBioChem**, v. 7, p. 239-242, 2006.

GUBLER, D. J. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 330–342, 2002.

GUIRAKHOO, F.; ARROYO, J.; PUGACHEV, K.V.; MILLER, C.; ZHANG, Z.X.; WELTZIN, R.; GEORGAKOPOULOS, K.; CATALAN, J.; OCRAN, S.; SOIKE, K.; RATTERREE, M.; MONATH, T.P. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. **Journal of Virology**, v. 75, n. 16, p. 7290-7304, 2001.

GUIRAKHOO, F.; PUGACHEV, K.V.; ZHANG, Z.X.; MYERS, G.; LEVENBOOK, I.; DRAPER, K.; IANG, J.; OCRAN, S.; MITCHELL, F.; PARSONS, M.; BROWN, N.; BRANDLER, S.; FOURNIER, C.; BARRERE, B.; RIZVI, F.; TRAVASSOS, A.; NICHOLS, R.; TRENT, D.; MONATH, T.P. Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. **Journal of Virology**, v. 78, n. 9, p. 4761-4775, 2004.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 927-974, 2000.

GUY, B. Immunogenicity of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, p. 16-19, 2009.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002

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

HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990

HO, L.; WANG, J.; SHAIQ, M.; KAO, C.; CHANG, D.; HAN, S.; LAI, J. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 1499-1506, 2001.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56–58, 1991.

JESSIE, K.; FONG, M.K.; DEVI, S.; LAM, S.K.; WONG, K.T. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 1411–1418, 2004.

KAM, N.W.S.; DAI, H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. **Journal of the American Chemical Society**, v.127, p. 6021-6026, 2005.

KAM, N. W. S.; LIU, Z. A.; DAI, H. J. Carbon Nanotubes as Intracellular Transporters for Proteins and DNA: An Investigation of the Uptake Mechanism and Pathway. **Angewandte Chemie**, v. 118, p. 591-595, 2006.

KHANAM, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. Induction of neutralizing antibodies and T cell responses by dengue virus type 2 envelope domain III encoded by plasmid and adenoviral vectors. **Vaccine**, v. 24, p. 6513-6525, 2006.

KLUMPP, C.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 3, p. 404-412, 2006.

KOSTARELOS, K.; LACERDA, L.; PASTORIN, G.; WU, W.; WIECKOWSKI, S.; LUANGSIVILAY, J.; GODEFROY, S.; PANTAROTTO, D.; BRIAND, J.; MULLER, S.; PRATO, M.; BIANCO, A. Cellular uptake of

functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 2, p. 108-113, 2007.

KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 329-340, 2007.

LAI, C. Y.; TSAI, W. Y.; LIN, S. R.; KAO, C. L.; HU, H. P.; KING, C. C.; WU, H. C.; CHANG, G. J.; WANG, W. K. Antibodies to Envelope Glycoprotein of Dengue Virus during the Natural Course of Infection Are Predominantly Cross-Reactive and Recognize Epitopes Containing Highly Conserved Residues at the Fusion Loop of Domain II. **Journal of Virology**, v. 82, n. 13, p. 6631-6643, 2008.

LANG, J. Recent progress on Sanofi Pasteur's dengue vaccine candidate. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, p. 20-24, 2009.

LEI, H.; YEH, T.; LIU, H.; LIN, Y.; CHEN, S.; LUI, C. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **Journal of Biomedical Science**, v.8, p. 377–388, 2001.

LENG, C. H.; LIU, S. J.; TSAI, J. P.; LI, Y. S.; CHEN, M. Y.; LIU, H. H.; LIEN, S. P.; YUEH, A.; HSIAO, K. N.; LAI, L. W.; LIU, F. C.; CHONG, P.; CHEN, H. W. A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 288-295, 2009.

LI, Z.; WU, Z.; LI, K. The high dispersion of DNA–multiwalled carbon nanotubes and their properties. **Analytical Biochemistry**, v. 387, p. 267-270, 2009.

LIN, C.; LEI, H.; SHIAU, A.; LIU, C.; LIU, H.; YEH, T.; CHEN, S.; LIN, Y. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **Journal of Medical Virology**, v. 69, p. 82-90, 2003.

LIU, Y.; WU, D.; ZHANG, W.; JIANG, X.; HE, C.; CHUNG, T.S.; GOH, S.H.; LEONG, K.W. Polyethylenimine-grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery of DNA. **Angewandte Chemie**, v. 117, p. 4860- 4863, 2005.

LIU, Z.; DAVIS, C.; CAI, W.; HE, L.; CHEN, X.; DAI, H. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 105, n. 5, p. 1410 –1415, 2008.

MAGREZ, A.; KASAS, S.; SALICIO, V.; PASQUIER, N.; SEO, J.W.; CELIO, M.; CATSICAS, S.; SCHWALLER, B.; FORRO, L. Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials. **Nano Letters**, v. 6, n. 6, p. 1121-1125, 2006.

MAROVICH, M.; GROUARD-VOGEL, G.; LOUDER, M.; ELLER, M.; SUN, W.; WU, S.; PUTVATANA, R.; MURPHY, G.; TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T.; BIRX, D.; HAYES, C.; SCHLESINGER-FRANKEL, S.; MASCOLA, J. Human Dendritic Cells as Targets of Dengue Virus Infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3, p. 219-224, 2001.

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

MCSHAN, D. & YU, H. DNA damage in human skin keratinocytes caused by multiwalled carbon nanotubes with carboxylate functionalization. **Toxicology and Industrial Health**, p. 1-10, 2012.

MILLER, J. L.; DEWET, B. J. M.; MARTINEZ-POMARES, L.; RADCLIFFE, C. M.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M.; GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 1-11, 2008.

MONATH, T. P.; NICHOLS, R.; ARCHAMBAULT, W. T.; MOORE, L.; MARCHESANI, R.; TIAN, J.; SHOPE, R. E.; THOMAS, N.; SCHRADER, R.; FURBY, D.; BEDFORD, P. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 533-541, 2002.

MOTA, J.; ACOSTA, M.; ARGOTTE, R.; FIGUEROA, R.; MÉNDEZ, A.; RAMOS, C. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. **Vaccine**, v. 23, p. 3469-3476, 2005.

MURRELL, S.; WU, S-C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 239–247, 2011.

NAVARRO-SANCHEZ, E.; ALTMAYER, R.; AMARA, A.; SCHWARTZ, O.; FIESCHI, F.; VIRELIZIER, J.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DESPRÈS, P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO reports**, v. 4, n. 7, p. 723-728, 2003.

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

PANCHAROEN, C.; THISYAKORN, U. Neurological manifestations in dengue patients. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 32, n. 2, p. 341-345, 2001.

PANTAROTTO, D.; BRIAND, J.P.; PRATO, M.; BIANCO, A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. **Chemical Communications**, v. 1, p. 16-17, 2004a.

PANTAROTTO, D.; SINGH, R.; MCCARTHY, D.; ERHARDT, M.; BRIAND, J.P.; PRATO, M.; KOSTARELOS, K.; BIANCO, A. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 5242-5246, 2004b.

PATLOLLA, A.; PATLOLLA, B.; TCHOUNWOU, P. Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 338, p. 225-232, 2010.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 369-377, 2008.

POLAND, C. A.; DUFFIN, R.; KINLOCH, I.; MAYNARD, A.; WALLACE, W.A. H.; SEATON, A.; STONE, V.; BROWN, S.; MACNEE, W.; DONALDSON, K. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. **Nature Nanotechnology**, v. 3, p. 423-428, 2008.

PRATO, M.; KOSTARELOS, K.; BIANCO, A. Functionalized Carbon Nanotubes in Drug Design and Discovery. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 1, p. 60-68, 2008.

PULSKAMP, K.; DIABATÉ, S.; KRUG, H.F. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. **Toxicology Letters**, v. 168, p. 58-74, 2007.

QU, G.; BAI, Y.; ZHANG, Y.; JIA Q.; ZHANG, W.; YAN, B. The effect of multiwalled carbon nanotube agglomeration on their accumulation in and damage to organs in mice. **Carbon**, v. 47, p. 2060-2069, 2009.

RAMANATHAN, M. P.; KUO, Y. C.; SELLING, B. H.; LI, Q.; SARDESAI, N. Y.; KIM, J.; WEINER, D. B. Development of a novel DNA Syncon (TM) tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6444-6453, 2009.

RAVIPRAKASH, K.; KOHEL, T.J.; EWING, D.; SIMMONS, M.; PHILLIPS, I.; HAYES, C.G.; PORTER, K.R. Immunogenicity of dengue virus type 1 DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein. **Vaccine**, v. 18, n. 22, p. 2426-2436, 2000.

RAVIPRAKASH, K.; APT, D.; BRINKMAN, A.; SKINNER, C.; YANG, S.; DAWES, G.; EWING, D.; WU, S. J.; BASS, S.; PUNNONEN, J.; PORTER, K. A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in rhesus macaques. **Virology**, v. 353, p. 166-173, 2006.

RICHARD, C.; MIGNET, N.; LARGEAU, C. Functionalization of single- and multi-walled carbon nanotubes with cationic amphiphiles for plasmid DNA complexation and transfection. **Nano Research**, v. 2, p. 638-647, 2009.

ROTHMAN, A.; ENNIS, F. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 257, n. 1±6, p. 1-6, 1999.

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

RUSSELL, P.K.; NISALAK, A. Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. **Journal of Immunology**, v. 99, p. 291-296, 1967.

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

SATO, Y.; YOKOYAMA, A.; SHIBATA, K.; AKIMOTO, Y.; OGINO, S.; NODASAKA, Y.; KOHGO, T.; TAMURA, K.; AKASAKA, T.; UO, M.; MOTOMIYA, M.; JEYADEVAN, B.; ISHIGURO, M.; HATAKEYAMA, R.; WATARI, F.; TOHJI, K. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 *in vitro* and subcutaneous tissue of rats *in vivo*. **Molecular BioSystems**, v. 1, p. 176-182, 2005.

SCHMIDT-WOLF G.D. & SCHMIDT-WOLF I.G.H. Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 67-72, 2003.

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

SHI X.; BUSSCHE, A.; HURT, R.H.; KANE, A.B.; GAO, H. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. **Nature Nanotechnology**, v. 6, p. 714-719, 2011.

SHVEDOVA, A.; CASTRANOVA, V.; KISIN, E.; SCHWEGLER-BERRY, D.; MURRAY, A.; GANDELSMAN, V.; MAYNARD, A.; BARON, P. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v. 66, n. 20, p. 1909-1926, 2003.

SINGH, R.; PANTAROTTO, D.; MCCARTHY, D.; CHALOIN, O.; HOEBEKE, J.; PARTIDOS, C.D.; BRIAND, J.P.; PRATO, M.; BIANCO, A.; KOSTARELOS, K. Binding and Condensation of Plasmid DNA onto Functionalized Carbon Nanotubes: Toward the Construction of Nanotube-Based

Gene Delivery Vectors. **Journal of the American Chemical Society**, v.127, p. 4388-4396, 2005.

SINGH, R.; PANTAROTTO, D.; LACERDA, L.; PASTORIN, G.; KLUMPP, C.; PRATO, M.; BIANCO, A.; KOSTARELOS, K. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. **PNAS**, v. 103, n. 9, p. 3357-3362, 2006.

SMART, S.K.; CASSADY, A.I.; LU, G.Q.; MARTIN, D.J. The biocompatibility of carbon nanotubes. **Carbon**, v. 44, p. 1034-1047, 2006.

SOARES, C.N.; FARIA, L.C.; PERALTA, J.M.; FREITAS, M.R.G.; PUCCIONI-SOHLER, M. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 249, p. 19-24, 2006.

SOLOMON, T.; DUNG, N.; VAUGHN, D.; KNEEN, R.; THAO, L.; RAENGSAKULRACH, B.; LOAN, H.; DAY, N.; FARRAR, J.; MYINT, K.; WARRELL, M.; JAMES, W.; NISALAK, A.; WHITE, N. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, v. 355, p. 1053-1059, 2000.

SUN, Y.; FU, K.; LIN, Y.; HUANG, W. Functionalized Carbon Nanotubes - Properties and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 12, p. 1096-1104, 2002.

TASIS, D., TAGMATARCHIS, N., GEORGAKILAS, V., PRATO, M. Soluble Carbon Nanotubes. **Chemistry a European Journal**, v. 9, p. 4000-4008, 2003.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHELLER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D.; STEINMAN, R.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M. DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 7, p. 823-829, 2003.

ULMER, J.B.; SADOFF, J.C.; LIU, M.A. DNA vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 531-536, 1996.

VITTORIO, O.; RAFFA, V.; CUSCHIERI, A. Influence of purity and surface oxidation on cytotoxicity of multiwalled carbon nanotubes with human neuroblastoma cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, p. 424-431, 2009.

VOGEL, F. R.; SAVER, N. Nucleic acid vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 406-410, 1995.

WANG, X.J.; LIU, Z. Carbon nanotubes in biology and medicine: An overview. **Chinese Science Bulletin**, v. 57, n. 2-3, p. 167-180, 2012.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Geneva, WHO, Março 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 20 de Janeiro de 2015.

WU, S.; GROUARD-VOGEL, G.; SUN, W.; MASCOLA, J.; BRACHTEL, E.; PUTVATANA, R.; LOUDER, M.; FILGUEIRA, L.; MAROVICH, M.; WONG, H.; BLAUVELT, A.; MURPHY, G.; ROBB, M.; INNES, B.; BIRX, D.; HAYES, C.; SCHLESINGERF-RANKEL, S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, n. 7, p. 816-820, 2000.

YAMASHITA, K.; YOSHIOKA, Y.; HIGASHISAKA, K.; MORISHITA, Y.; YOSHIDA, T.; FUJIMURA, M.; KAYAMURO, H.; NABESHI, H.; YAMASHITA, T.; NAGANO, K.; ABE, Y.; KAMADA, H.; KAWAI, Y.; MAYUMI, T.; YOSHIKAWA, T.; ITOH, N.; TSUNODA, S.; TSUTSUMI, Y. Carbon Nanotubes Elicit DNA Damage and Inflammatory Response Relative to Their Size and Shape. **Inflammation**, v. 33, n. 4, p. 276-280, 2010.

YANG, W.; THORDARSON, P.; GOODING, J.J. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 18, p. 1-12, 2007.

ZHANG, W.; CHIPMAN, P. R.; CORVER, J.; JOHNSON, P. R.; ZHANG, Y.; MUKHOPADHYAY, S.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H.; ROSSMANN, M. G.; KUHN, R. J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron

microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 11, p. 907-912, 2003.

ZHANG, D.; DENG, X.; JI, Z.; SHEN, X.; DONG, L.; WU, M.; GU, T.; LIU, Y. Long-term hepatotoxicity of polyethylene-glycol functionalized multi-walled carbon nanotubes in mice. **Nanotechnology**, v. 21, p. 1-10, 2010.

ZHU, L.; CHANG, D.W.; DAI, L.; HONG, Y. DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells. **Nano Letters**, v. 7, n. 12, p. 3592-3597, 2007.