

MARÍLIA BARBOSA DE PAULA

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DE UM CANDIDATO VACINAL DE DNA RECOMBINANTE
CONTRA O VÍRUS DENGUE-2**

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

Viçosa
Minas Gerais – Brasil
2009

Dedico:

À minha mãe, Maria das Graças,
meu exemplo de vida, meu norte.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me conceder a vida, perseverança, paciência e a capacidade de lutar pelos meus objetivos.

À minha mãe, guerreira e heroína, que esteve presente em todos os momentos com seu apoio e companheirismo incondicionais, seus conselhos e orações. Quem dera tornar-me metade do que é esta grande mulher.

Ao Marlos, meu irmão amado, que mesmo de longe se alegrava com as minhas conquistas, e vibrava com cada etapa alcançada.

Ao Vinícius, pela compreensão, amor e apoio, sempre.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e por ter dado condições para a realização deste estudo.

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

Ao Prof. Sérgio Oliveira de Paula, por mais uma vez acreditar no meu trabalho, por me dar apoio e permitir que eu desse mais alguns passos importantes nessa busca pelo conhecimento.

Ao Prof. Patarroyo, pela assistência e co-orientação. À Prof.^a Márcia Rogéria, pelo auxílio e prestimosidade constantes.

Ao Prof. Leandro, pela disponibilidade, companheirismo e auxílio. Esse de fato chegou em boa hora!

À minha fiel escudeira Michelle, meu braço direito nessa jornada. Muito obrigada! Ao acadêmico Roberto, por assim dizer: meu braço esquerdo, e ao Alípio pela grande disponibilidade e prazer em ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular, que fizeram desta árdua jornada um caminho agradável: Alice, Ângelo, Pâmela, Thábata, Paulinha, Marilane, João, Victor, Monique, Nina, e mais uma vez Michelle, Roberto e Alípio, vocês são mais do que amigos, são cúmplices, aliados. Com a ajuda de vocês, levo do LIVM além do título de Mestre, experiência de vida, crescimento pessoal, grandes momentos e, com certeza, muita história pra contar! Muito obrigada!

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Os Vírus <i>Dengue</i>	5
2.1.1. Características gerais.....	5
2.1.2. Aspectos morfológicos das partículas virais.....	6
2.1.3. Estrutura genômica e ciclo replicativo.....	7
2.1.4. Transmissão.....	9
2.2. A Doença.....	9
2.2.1. Sintomatologia e diagnóstico.....	9
2.2.2. Prevenção e tratamento.....	12
III. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivos gerais.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Células e plasmídeos.....	24
4.2. Estoques virais.....	25
4.2.1. Estoques virais provenientes de cultura celular.....	25
4.2.2. Estoques virais provenientes de macerado de cérebro de camundongo.....	25
4.3 Preparação dos RNAs e cDNAs virais.....	26
4.3.1. Extração do RNA.....	26
4.3.2. Confecção do cDNA.....	27
4.4. Amplificação dos genes de prM.....	27
4.4.1. Construção dos “primers” para amplificação dos genes prM.....	27
4.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase.....	28

4.4.3. Purificação dos amplicons.....	28
4.5. Ensaio de clonagem.....	29
4.5.1. Preparação de bactérias competentes para a transformação.....	29
4.5.2. Clonagem dos genes prM no plasmídeo de clonagem pGEM-T.....	29
4.5.3. Transformação de células <i>E. coli</i> DH5α.....	30
4.5.4. Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas.....	31
4.5.5. Ensaio de restrição enzimática.....	32
4.5.6. Clonagem dos genes prM no plasmídeo de expressão pCID2Et.....	32
4.6. Avaliação dos plasmídeos vacinais.....	33
4.6.1. Imunização de camundongos.....	33
4.6.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	34
4.6.3. Obtenção das células do baço.....	35
4.6.4. Ensaio de proliferação.....	35
4.6.5. Caracterização fenotípica de células do baço.....	36
4.6.6. Expressão de citocinas.....	36
V. RESULTADOS.....	38
5.1.1. Amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3.....	39
5.1.2. Clonagem dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no plasmídeo de clonagem pGEM-T.....	39
5.1.3. Análise por sequenciamento dos fragmentos clonados.....	41
5.1.4. Clonagem dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no plasmídeo de expressão pCID2Et	43
5.2. Avaliação da resposta imune dos plasmídeos recombinantes.....	46
5.2.1. ELISA.....	46
5.2.2. Linfoproliferação.....	47
5.2.3. Caracterização fenotípica das células imunes.....	49
5.2.4. Detecção de citocinas.....	52

VI. DISCUSSÃO.....	53
VII. CONCLUSÕES.....	60
VIII. PERSPECTIVAS.....	62
IX. GLOSSÁRIO.....	64
X. REFERÊNCIAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3.....	39
Figura 2. Clonagem de prM/DENV-2 em vetor pGEM-T.....	40
Figura 3. Clonagem de prM/DENV-3 em vetor pGEM-T.....	40
Figura 4. Comparação da seqüência aminoacídica das proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3.....	43
Figura 5. Mapa de restrição dos plasmídeos pGEM-T recombinantes.....	43
Figura 6. Mapa de restrição do plasmídeo pCID2Et.....	44
Figura 7. Inserção de prM/DENV-2 no plasmídeo pCID2Et.....	45
Figura 8. Inserção de prM/DENV-3 no plasmídeo pCID2Et.....	45
Figura 9. Detecção da expressão da proteína E por células Vero transfectadas com os plasmídeos recombinantes.	46
Figura 10. ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos para a proteína E do vírus Dengue-2.....	47
Figura 11. Ensaio de linfoproliferação.....	48
Figura 12. Análise do fenótipo das células extraídas do baço dos animais imunizados.....	50
Figura 13. Análise da indução de células de memória nos animais imunizados.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da similaridade de seqüências aminoacídicas das proteínas prM.....	42
Tabela 2. Porcentagem de linfócitos induzida nos animais imunizados com as construções plasmidiais.....	52
Tabela 3. Expressão de IL-4, IL-10 e INF-γ em comparação com o grupo controle, após estímulo com vírus Dengue-2.....	52

RESUMO

PAULA, Marília Barbosa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Avaliação imunológica de um candidato vacinal de DNA recombinante contra o vírus Dengue-2.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves e Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo.

O *Dengue* vírus, membro da família *Flaviviridae*, é o agente etiológico da dengue e é transmitido através da picada do mosquito *Aedes aegypti*. Até o momento não existe tratamento específico, e o controle da doença baseia-se na tentativa de conter o mosquito vetor, desse modo a Organização Mundial de Saúde considera de extrema importância o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra esta doença. Neste contexto, foi construído um candidato vacinal pCID2Et expressando a proteína E truncada do vírus dengue-2, sem a expressão concomitante de prM. Testes demonstraram correta, porém reduzida expressão de E, e apenas uma pequena porcentagem de camundongos imunizados foi protegida quando desafiados com vírus dengue-2. Estes resultados justificam o aprimoramento desta construção vacinal, buscando o aumento da expressão de proteína E e assim proporcionar uma imunização mais eficaz. Desse modo, nosso objetivo foi aprimorar este plasmídeo através da inserção das proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3. Neste ínterim foram construídos dois plasmídeos pCID2EtprMD2 e pCID2EtprMD3, cujas análises bioquímicas já realizadas indicaram aumento de expressão relativo de proteína E de 67,02% por pCID2EtprMD3 com relação a pCID2EtprMD2. Para avaliar os efeitos da expressão aumentada de proteína E na imunogenicidade dos plasmídeos foi realizada a avaliação imunogênica dos mesmos. Os plasmídeos pCID2EtprMD3, pCID2EtprMD2 e pCID2Et foram utilizados na imunização de camundongos e os resultados demonstraram que

pCID2EtprMD3 apresentou maior indução do sistema imune, tanto em relação à expressão de células TCD4⁺ e TCD8⁺ de memória quanto em relação à secreção de anticorpos específicos para a proteína E.

ABSTRACT

PAULA, Marília Barbosa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2009.
Immunological evaluation of a DNA vaccinal candidate against Dengue- 2 virus. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Co-orientadores: Clóvis Andrade Neves and Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo.

The *Dengue* virus, member of the *Flaviviridae* family, is the etiological agent of the dengue disease, and its transmitted through the bite of *Aedes aegypti* mosquitoes. There isn't a specific treatment so far, and the disease control is based on trying to control the mosquito vectors. Thus, the development of an efficient vaccine has been considered high priority by the World Health Organization (WHO). In this context, a vaccinal candidate pCID2Et expressing the truncated DENV-2 - E protein, without the concomitant expression of prM has been constructed. Tests demonstrated that the E protein was correctly expressed but in reduced quantity and only a small percentage of the immunized mice was protected when challenged with DENV-2. These results justify the improvement of this vaccine candidate aiming the increasing of E protein expression in order to achieve a more efficient immunization. This way, our objective was the improvement of this plasmid through the insertion of the prM/DENV-2 e prM/DENV-3. So, we constructed two recombinant plasmids pCID2EprMDEN2 e pCID2EprMD3, which revealed by biochemical analysis that there was a relative expression increase of 67,02% by pCID2EprMDEN3 in relation to pCID2EprMDEN2. In order to evaluate the effects of this better expression on plasmid immunogenicity, we performed some immunologic analysis of these plasmids. The plasmids were utilized in animal vaccination and the results showed that pCID2EprMD3 had increased induction of the immune system

when compared to pCID2EtprMD2 and pCID2Et, both in relation to the expression of TCD4⁺ and TCD8⁺ total and memory cells, as on the secretion of specific anti-E antibodies.

I. INTRODUÇÃO

Os vírus da dengue pertencem à família *Flaviviridae*, figurando atualmente como os principais patógenos de importância médica no mundo (Lindenbach, 2001).

Consistem de um genoma de RNA fita simples polaridade positiva, que funciona como RNA mensageiro após a entrada do mesmo no citosol (Lindenbach and Rice, 2003; Lindenbach, 2001). Sendo um arbovírus, sua transmissão é feita através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de hábitos urbanos e diurnos (McBride and Bielefeldt-Ohmann, 2000). Após entrada no organismo, os vírus da dengue infectam principalmente as células da linhagem monocítica, entretanto já foram encontrados antígenos virais em diversos tipos celulares, incluindo hepatócitos e células dendríticas (Guzman and Kouri, 2002).

A sintomatologia da dengue pode ser caracterizada nos casos de doença clássica por dores musculares, cefaléia, artralgias, aparecimento de petéquias. Já no caso das manifestações mais severas estes sintomas podem ser acompanhados de hemorragias e extravasamento de fluido vascular, trombocitopenia e hepatomegalia (Bente and Rico-Hesse, 2006). Não existe ainda um tratamento antiviral específico. No caso da dengue clássica os pacientes geralmente se recuperam após tratamento com

reposição de líquidos e eletrólitos. Em se tratando dos casos de dengue hemorrágica, o rápido reconhecimento dos sintomas e o início imediato da terapia de reposição são de importância crucial na redução da taxa de mortalidade (Guzmán e Kouri, 2002).

A ausência de um tratamento específico e de uma vacina que proteja os indivíduos do dengue, o único meio de se combater a doença é o controle do *A. aegypti*. Apesar da tentativa de contenção do mosquito vetor, nos últimos anos, tem sido observado grande aumento na incidência de dengue, acompanhada pelo aumento na gravidade e fatalidade dos casos (Fonte:OMS).

Tendo em vista os aspectos citados anteriormente, assim como a morbidade e o impacto econômico causado pelas infecções com os vírus da dengue, a Organização Mundial de Saúde tem considerado de grande importância o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra estes patógenos (Costa et al., 2007; Gubler, 2002).

Desse modo vários grupos de pesquisa se lançaram à busca de um candidato vacinal eficiente na proteção contra o vírus Dengue, utilizando para tanto desde métodos clássicos de atenuação viral até técnicas avançadas de biologia molecular.

Nesse trabalho, nossa proposta reside no aprimoramento de um plasmídeo vacinal que possui um cassete de expressão da proteína E do vírus Dengue-2, através da inserção do fragmento responsável por codificar a proteína prM. Este plasmídeo foi construído pelo nosso grupo e análises

bioquímicas demonstraram que a proteína E foi pouco expressa, o que pode explicar a baixa ativação imunológica dos animais inoculados com o mesmo.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os Vírus Dengue

2.1.1. Características Gerais

O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 80 vírus e, entre eles destacam-se os vírus da *Dengue*. O nome “*Flavivirus*” é derivado do latim *flavus*, que significa amarelo, e remete à cor dos pacientes acometidos de febre amarela, doença causada pelo vírus de mesmo nome, e também pertencente a este grupo. Juntamente com outros dois gêneros, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, os *Flavivirus* compõem a Família *Flaviviridae*, e compartilham características morfológicas comuns, tais como estrutura genômica, estratégias de replicação e tradução (Halstead, 2007; Wilder-Smith and Gubler, 2008)

Os *Flavivirus* são facilmente inativados em alta temperatura, sendo que em apenas 10 minutos a 50°C, perde-se 50% da infectividade, e para fins práticos, a inativação viral em amostras de soro ou outras fontes é feita através de aquecimento a 56°C por 30 minutos. Luz ultravioleta, radiação gama, desinfetantes tais como formaldeído 3 a 8%, glutaraldeído 2%, peróxido de hidrogênio, álcool, iodo e fenóis também causam inativação destes vírus. Os vírus *Dengue* apresentam quatro sorotipos antigenicamente relacionados denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que apresentam de 62 a 77% desimilaridade aminoacídica, sendo DENV-1 e

DENV-3 os mais relacionados com 77% de similaridade, seguidos por DENV-2 e DENV-4, que possuem 62% (Lindenbach and Rice, 2003).

Os vírus da dengue pertencem à família *Flaviviridae*, figurando atualmente como os principais patógenos de importância médica no mundo (Lindenbach, 2001).

Consistem de um genoma de RNA fita simples polaridade positiva, que funciona como RNA mensageiro após a entrada do mesmo no citosol (Lindenbach and Rice, 2003; Lindenbach, 2001). Sendo um arbovírus, sua transmissão é feita através da picada do mosquito *Aedes aegypti*, vetor de hábitos urbanos e diurnos (McBride and Bielefeldt-Ohmann, 2000). Após entrada no organismo, os vírus da dengue infectam principalmente as células da linhagem monocítica, entretanto já foram encontrados antígenos virais em diversos tipos celulares, incluindo hepatócitos e células dendríticas (Guzman and Kouri, 2002).

A sintomatologia da dengue pode ser caracterizada nos casos de doença clássica por dores musculares, cefaléia, artralgias, aparecimento de petéquias. Já no caso das manifestações mais severas estes sintomas podem ser acompanhados de hemorragias e extravasamento de fluido vascular, trombocitopenia e hepatomegalia (Bente and Rico-Hesse, 2006). Não existe ainda um tratamento antiviral específico. No caso da dengue clássica os pacientes geralmente se recuperam após tratamento com reposição de líquidos e eletrólitos. Em se tratando dos casos de dengue hemorrágica, o rápido reconhecimento dos sintomas e o início imediato da terapia de reposição são de importância crucial na redução da taxa de mortalidade (Guzmán e Kouri, 2002).

A ausência de um tratamento específico e de uma vacina que proteja os indivíduos do dengue, o único meio de se combater a doença é o controle do *A. aegypti*. Apesar da tentativa de contenção do mosquito vetor, nos últimos anos, tem sido observado grande aumento na incidência de dengue, acompanhada pelo aumento na gravidade e fatalidade dos casos (Fonte:OMS).

Tendo em vista os aspectos citados anteriormente, assim como a morbidade e o impacto econômico causado pelas infecções com os vírus da dengue, a Organização Mundial de Saúde tem considerado de grande importância o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra estes patógenos (Costa et al., 2007; Gubler, 2002).

Desse modo vários grupos de pesquisa se lançaram à busca de um candidato vacinal eficiente na proteção contra o vírus Dengue, utilizando para tanto desde métodos clássicos de atenuação viral até técnicas avançadas de biologia molecular.

Nesse trabalho, nossa proposta reside no aprimoramento de um plasmídeo vacinal que possui um cassete de expressão da proteína E do vírus Dengue-2, através da inserção do fragmento responsável por codificar a proteína prM. Este plasmídeo foi construído pelo nosso grupo e análises bioquímicas demonstraram que a proteína E foi pouco expressa, o que pode explicar a baixa ativação imunológica dos animais inoculados com o mesmo.

IV. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os Vírus Dengue

2.1.1. Características Gerais

O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 80 vírus e, entre eles destacam-se os vírus da *Dengue*. O nome “*Flavivirus*” é derivado do latim *flavus*, que significa amarelo, e remete à cor dos pacientes acometidos de febre amarela, doença causada pelo vírus de mesmo nome, e também pertencente a este grupo. Juntamente com outros dois gêneros, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, os *Flavivirus* compõem a Família *Flaviviridae*, e compartilham características morfológicas comuns, tais como estrutura genômica, estratégias de replicação e tradução (Halstead, 2007; Wilder-Smith and Gubler, 2008)

Os *Flavivirus* são facilmente inativados em alta temperatura, sendo que em apenas 10 minutos a 50°C, perde-se 50% da infectividade, e para fins práticos, a inativação viral em amostras de soro ou outras fontes é feita através de aquecimento a 56°C por 30 minutos. Luz ultravioleta, radiação gama, desinfetantes tais como formaldeído 3 a 8%, glutaraldeído 2%, peróxido de hidrogênio, álcool, iodo e fenóis também causam inativação destes vírus.

Os vírus *Dengue* apresentam quatro sorotipos antigenicamente relacionados denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que apresentam de 62 a 77% desimilaridade aminoacídica, sendo DENV-1 e DENV-3 os mais relacionados com 77% de similaridade, seguidos por DENV-2 e DENV-4, que possuem 62% similaridade (Lindenbach and Rice, 2003).

2.1.2. Aspectos Morfológicos das Partículas Virais

Micrografias eletrônicas revelam que os vírions são caracterizados por uma superfície relativamente lisa, com diâmetro de aproximadamente 500 Å e um núcleo elétron-denso envolto por uma bicamada lipídica (Lindenbach, 2001)

Mais recentemente foi demonstrado que em sobrenadantes de células infectadas são encontradas partículas virais maduras e imaturas com diâmetros de 50 nm e 60 nm respectivamente. Ambos os tipos de partículas são constituídas de uma camada externa de glicoproteínas ancoradas a uma bicamada lipídica mais interna de cerca de 10 nm de espessura derivada da célula hospedeira. Interiormente a esta camada lipídica existe um núcleo elétron-denso formado por uma cadeia de RNA fita simples complexada com múltiplas cópias de uma proteína de caráter básico, formando um nucleocapsídeo (Kuhn et al., 2002; Perera and Kuhn, 2008).

Apesar da aparência exterior esférica, imagens de microscopia crio-eletrônica (cryo-electron microscopy - cryo-EM) revelam que o envelope lipídico viral é poligonal, sendo que as proteínas a ele ancoradas formam os vértices do polígono (Zhang et al., 2003).

A concha glicoprotéica que reveste a partícula externamente está bem caracterizada e consiste de 180 cópias das proteínas E e prM/M. Estas proteínas apresentam diferentes conformações nas partículas maduras e imaturas, conferindo características intrínsecas a estas partículas durante o processo de maturação viral (Kuhn et al., 2002).

Nas partículas imaturas as proteínas prM/E formam 90 heterodímeros que se projetam na forma de 60 espículas triméricas para o exterior da bicamada lipídica. Nos vírions maduros, a proteína E se estende na forma de 90 homodímeros na superfície da partícula viral formando uma concha protéica de aspecto liso (Perera and Kuhn, 2008).

A transição estrutural da forma imatura (espículas projetadas) para a madura (superfície lisa) ocorre durante o trânsito da partícula através da rede Trans Golgi, e é dirigida predominantemente por alterações na conformação de E, conforme descrito no item Estrutura Genômica e Ciclo Replicativo (Lindenbach and Rice, 2003)

2.1.3. Estrutura genômica e ciclo replicativo

O genoma viral é constituído por uma molécula de RNA fita simples polaridade positiva de aproximadamente 11Kb, que funciona como RNA mensageiro após a entrada do genoma do vírus no citosol. Contem um CAP 5' mas não apresenta cauda poliA. Possui uma única ORF que codifica uma poliproteína precursora, que é posteriormente processada por proteases virais e celulares, dando origem a três proteínas estruturais C, prM e E (capsidial, precursora de membrana e envelope, respectivamente) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Liu et al., 2006) (Lindenbach, 2001).

Análises estruturais da proteína E revelam a existência de três domínios distintos ligados por ligações S-S (Halstead et al., 2005; Kuhn et al., 2002). O domínio I compreende a região entre os resíduos 50-125 na porção N terminal e está envolvido na endocitose da partícula viral. O

domínio II encontra-se entre os resíduos 200 e 250 e contém os epítomos neutralizantes específicos de sorotipo e de reação cruzada com outros membros da família, enquanto o domínio III é composto de um “loop” livre de ligações S-S e nele encontra-se o sítio de glicosilação no resíduo 157 da cadeia polipeptídica (Halstead et al., 2005; Kuhn et al., 2002).

A importância das ligações S-S na conformação de E e na indução de anticorpos neutralizantes foi comprovada quando a proteína E reduzida foi incapaz de induzir a resposta imune em camundongos. Demonstrou-se também que alguns epítomos de E requerem a co-expressão de prM para que a conformação correta de E seja mantida durante a maturação, o que explica a incapacidade de células transformadas expressando somente E induzirem a resposta imune de forma eficiente e reprodutível em camundongos (Halstead et al., 2005; Kuhn et al., 2002)

Os *Flavivirus* entram nas células hospedeiras através da interação de sua proteína de envelope com moléculas de superfície das membranas celulares, e já foi demonstrado que anticorpos neutralizantes específicos para esta proteína são capazes de inibir a entrada das partículas virais nas células hospedeiras (He et al., 1995; Simantini and Banerjee, 1995). Para adentrar as células, os vírus *Dengue* podem utilizar múltiplos receptores, sendo que apenas a menor parte é identificada como “dengue específicos”. Moléculas DC-SIGN e receptores tipo GAG podem ser a primeira linha de receptores utilizados pelos vírus *Dengue*, já que grande parte dos vírus se liga a tais moléculas. A segunda linha, ou os receptores “Dengue vírus-específicos” ainda não foram identificados, entretanto considera-se que

estes devam interagir com o Domínio III da proteína E (Halstead et al., 2005).

Os vírus da dengue são capazes de se replicar em diversos tipos celulares. As células das linhagens monocíticas têm sido apontadas desde o princípio como os principais alvos da replicação viral. Antígenos virais têm sido encontrados em células de Kupffer, macrófagos alveolares, fagócitos mononucleares da pele e monócitos circulantes (Guzman and Kouri, 2002). Estudos indicam que DENV em estado imaturo infectam as células dendríticas e de Langerhans, podendo estas servir de sítios de replicação no início da infecção.

2.1.4. Transmissão

Os *Dengue* vírus são transmitidos principalmente pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, caracterizando-se por ser predominantemente urbano em sua distribuição. É encontrado geograficamente entre 30° de latitude norte e 20° de latitude sul. Esta localização é altamente relacionada com as regiões onde se encontram as maiores incidências da dengue (Rico-Hesse, 1997). Após picar e alimentar-se de um indivíduo infectado durante a fase de viremia que pode ser de 4 a 5 dias após a entrada do vírus no indivíduo, o mosquito adquire e poderá transmitir o vírus a outras pessoas enquanto se multiplica no interior de suas glândulas salivares. O *A. aegypti* infectado torna-se capaz de transmitir o vírus durante toda sua vida através inclusive da infecção transovariana de sua progênie (McBride and Bielefeldt-Ohmann, 2000).

2.2. A Doença

2.2.1. Sintomatologia e Diagnóstico

As manifestações da dengue variam desde infecções assintomáticas até quadros graves de doença hemorrágica. A dengue clássica é uma doença febril acompanhada de mialgia, cefaléia, dor retro-orbital e rash maculopapular. No entanto, a infecção pode resultar em um quadro mais severo apresentando hemorragias, trombocitopenia, hepatomegalia, desequilíbrios homeostáticos que podem evoluir para um choque hipovolêmico (Bente and Rico-Hesse, 2006).

A patologia da dengue hemorrágica não está ainda totalmente estabelecida, existindo algumas teorias que tentam esclarecê-la. Uma das mais aceitas na comunidade científica é a teoria de “antibody dependent enhancement (ADE)”, ou aumento da infecção dependente de anticorpos, segundo a qual indivíduos previamente infectados por um sorotipo do *Dengue* e reinfectados com um sorotipo distinto do primeiro são mais propensas a desenvolver a forma hemorrágica da doença (Wang et al., 1995). Anticorpos produzidos em decorrência de uma infecção anterior com o sorotipo diferente seriam capazes de se ligar aos epítomos do vírus causador da segunda infecção sem, no entanto, conseguir neutralizá-lo. Seriam deste modo, formados complexos vírus-anticorpos não neutralizantes. Estes complexos seriam então capazes de aumentar a eficiência da infecção viral (Azeredo et al., 2001). Como resultado, a ativação de linfócitos T cresce pronunciadamente, refletindo um maior nível de apresentação de antígeno, maior frequência de células T específicas para os DENV numa infecção secundária, e a ativação e proliferação mais rápidas de células T de memória. Essas células T produzem citocinas como

o IFN- γ , IL-2 e TNF- α , e lisam monócitos infectados pelo DENV. O TNF- α é também produzido pelos monócitos ativados. Experimentalmente, este fenômeno tem sido relacionado com o aumento da produção de quimiocinas e citocinas vasoativas, e com a indução de apoptose caspase-dependente em mastócitos (Brown et al., 2009; Brown et al., 2006). Ainda como consequência do aumento da infecção viral, as proteínas do complemento são sobremaneira ativadas por complexos vírus-anticorpo, assim como por diversas citocinas, a liberar C3a e C5a, que por sua vez também têm efeitos diretos na permeabilidade vascular. Os efeitos sinérgicos de IFN- γ , TNF- α e das proteínas do complemento ativadas desencadeiam um extravazamento de plasma sangüíneo entre as células endoteliais numa infecção secundária pelo vírus dengue. Entretanto, vários aspectos permanecem ainda não explicados por essa teoria. Por exemplo, nem todos os casos de dengue hemorrágica são causados por infecções secundárias. A ativação do complemento pode ser resultado de doença severa, e não a causa da doença hemorrágica (Lei et al., 2001).

O “enhancement” também pode resultar da resposta de células T durante infecções secundárias heterólogas, onde o aumento da apresentação dos antígenos da dengue aos linfócitos T acarreta uma grande ativação e proliferação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, e a consequente liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (Tan and Alonso, 2009).

Circunstâncias não relacionadas com o aumento da infecção (“non-enhancement”) também ajudam a explicar as formas graves de dengue. A instalação de formas mais severas da doença pode estar relacionada com a produção de anticorpos com capacidade auto-reativa direcionados contra a

proteína viral NS1 (Tan and Alonso, 2009). Corroborando esta teoria, experimentos de análise proteômica demonstraram diversos autoantígenos nas células endoteliais passíveis de reconhecimento por anticorpos anti-NS1 (Basu and Chaturvedi, 2008).

Um outro enfoque em estudo é a relação entre a NS1 e a indução do complemento. Tanto a proteína quanto os anticorpos anti-NS1 têm sido largamente relacionados com a ativação do complemento. Além do mais, a formação de complexos entre a NS1 e a proteína clusterina, inibidora do complemento interfere no controle da atividade deste componente do sistema imunológico, contribuindo para o aumento do extravasamento de plasma (Kurosu et al., 2007; Tan and Alonso, 2009).

Por fim, a virulência da cepa viral é uma hipótese alternativa para a produção de doença hemorrágica pelos DENV. As diferentes intensidades de manifestações (desde a forma clássica da dengue até a doença hemorrágica e síndrome de choque) podem ser causadas por variantes dos DENV com diferentes graus de virulência. Aparentemente, também o alto título de carga viral contribui para o aparecimento da doença hemorrágica, e pode ser reflexo da maior virulência da cepa viral. O risco de doença hemorrágica em infecções secundárias parece ser mais alto para o sorotipo 2 em comparação com os outros (Lei et al., 2001)

2.2.2. Prevenção e Tratamento

Não existe ainda um tratamento antiviral específico. No caso da dengue clássica os pacientes geralmente se recuperam após tratamento com reposição de líquidos e eletrólitos. Em se tratando dos casos de dengue

hemorrágica, o rápido reconhecimento dos sintomas e o início imediato da terapia de reposição são de importância crucial na redução da taxa de mortalidade associadas a esta doença (Guzman and Kouri, 2002).

Enquanto uma vacina contra a dengue não estiver disponível, a única forma de reduzir as infecções será o controle do mosquito vetor, prática que tem se mostrado sobremaneira ineficiente, haja vista a crescente incidência da dengue observada nos últimos 5 anos. Desse modo, devido à importância adquirida pela doença ao considerar-se sua morbidade, mortalidade e grande distribuição mundial o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o DENV tem sido considerado de alta prioridade pela Organização Mundial de saúde - OMS (Costa et al., 2007; Gubler, 2002).

Uma vez que ainda não há a disponibilidade de um tratamento antiviral e tendo em vista a ineficiência do controle do mosquito vetor, os esforços de vários grupos de pesquisa em todo mundo têm se voltado para a busca de uma vacina que previna eficazmente a infecção por esses vírus.

Neste ínterim, diferentes tipos de estratégias têm sido avaliadas envolvendo desde os métodos mais clássicos de confecção de candidatos vacinais, como a atenuação viral clássica, até métodos para a expressão de antígenos virais recombinantes em vetores de expressão. Entretanto, até então, esses esforços não têm obtido sucesso na produção de um candidato vacinal que seja capaz de produzir imunidade protetora duradoura (Guzman and Kouri, 2002).

Vacinas de vírus vivos atenuados através de mutações têm sido investigadas como uma alternativa viável. Alguns princípios básicos têm norteado pesquisadores na busca do desenvolvimento de vacinas de vírus

atenuados. O primeiro deles é o fato de que a vacina deverá ser capaz de induzir respostas imunes humoral e celular duradouras, mimetizando as características de uma infecção viral. Segundo, estes vírus atenuados deverão apresentar uma replicação seguramente restrita a fim de evitar o surgimento de sintomas. Terceiro, os vírus deverão apresentar uma transmissibilidade reduzida pelo mosquito vetor, o que pode ser alcançado reduzindo-se o período de viremia. Quarto, a vacina viral deverá apresentar alta infectividade em humanos para que uma pequena dose da mesma seja capaz de replicar e produzir uma resposta imunológica eficiente e duradoura no indivíduo, além de conseguir replicar-se com facilidade em culturas celulares de modo a reduzir os custos de produção e transporte, e quinto, a estabilidade genética deverá ser passível de acompanhamento durante as etapas de produção e testes da vacina. As mutações responsáveis por conferir atenuação ao vírus deverão ser estáveis mesmo após a replicação viral (Whitehead et al., 2007).

Wuyang Zhu e colaboradores conduziram um estudo no qual foram construídos vírus atenuados através da deleção de partes da cauda hidrofóbica da proteína Capsidial envolvidas na montagem das partículas virais infecciosas. Seus resultados mostraram que os vírus foram capazes de induzir uma alta produção de anticorpos em camundongos e naquelas partículas com maiores deleções, a indução da produção de anticorpos foi consideravelmente reduzida, indicando uma possível alternativa para atenuação viral e produção de vacinas eficazes contra o vírus *Dengue* (Zhu et al., 2007).

Outra alternativa buscada é a criação de vacinas de subunidades utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Antígenos virais tais como as proteínas E e NS1 têm sido produzidos em sistemas de expressão a fim de se construir uma vacina de subunidade. Nesses casos, a maioria das preparações induziu produção de anticorpos de média à alta eficiência em camundongos imunizados (Whitehead et al., 2007).

A expressão de proteínas prM, E e NS1 do vírus *Dengue* por baculovírus (Deubel et al., 1991), pelo vírus da vaccinia (Fonseca et al., 1994) e pela *Salmonella typhimurium* (Cohen et al., 1990) também têm sido utilizadas, entretanto, os resultados não são coerentes, existindo na literatura uma discrepância em relação aos dados obtidos nos experimentos de análise da eficácia de tais vacinas, já que alguns estudos mostram a presença de títulos adequados de anticorpos neutralizantes mas com baixa sobrevivência em experimentos de desafio dos animais imunizados com cepas virulentas (Fonseca et al., 1994; Men, Bray, and Lai, 1991). Outros relatam proteção contra o desafio com as cepas virulentas, porém descrevem ausência de anticorpos neutralizantes que na verdade, são os responsáveis pela proteção contra a infecção viral (Bray and Lai, 1991; Zhao et al., 1987). Isto pode ser explicado em parte, pelo fato de que o *Dengue* não tem um modelo animal confiável, onde os resultados de proteção pós-vacinal sejam reprodutíveis. Além disso, a via de inoculação das cepas virulentas nos experimentos de desafio é a via intra-cerebral, o que é uma via artificial no caso dos vírus *Dengue*, pois estes vírus raramente causam encefalite. Wen-Tssann Liu e colaboradores (Liu et al., 2006) construíram uma vacina recombinante utilizando uma cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*

expressando a proteína não estrutural NS1 do vírus Dengue-2. No entanto, os resultados mostraram que esta construção não obteve êxito em conferir proteção efetiva em camundongos vacinados oralmente e posteriormente desafiados com o vírus dengue-2. Testes subsequentes demonstraram que a co-administração de anfotericina B e a vacina recombinante mudaram este quadro, levando ao desenvolvimento de imunidade em camundongos co-inoculados. Entretanto, o uso do vírus da vaccinia como vetor tem sido associado ao aparecimento de reações adversas e efeitos colaterais que normalmente são de baixa severidade, mas podem levar a óbito (Liu et al., 2006).

Desse modo, métodos de biologia molecular têm sido empregados na busca de novas estratégias para o desenvolvimento de candidatos vacinais. As vacinas produzidas por engenharia genética têm o apelo de serem potencialmente mais seguras, menos termolábeis e mais facilmente administráveis, além de serem de fácil produção em larga escala. Entre esses métodos tem se destacado a pesquisa por estratégias de vacinação utilizando vacinas de DNA, que se baseiam na inserção de genes provenientes do vírus em vetores plasmidiais, com o intuito de expressar tais genes em células do receptor, culminando com a produção de determinantes antigênicos capazes de induzir resposta imune protetora (Gurunathan, Klinman, and Seder, 2000; Gurunathan et al., 2000).

As vacinas de DNA consistem de um plasmídeo bacteriano que possui características de vetores para expressão *in vitro*, visando à expressão de genes dos vírus *Dengue in vivo*. Estes plasmídeos incluem uma origem de replicação disponível para sua produção na bactéria, um

gene de resistência a antibiótico que auxilia na seleção da bactéria transformada com o plasmídeo e seqüências promotora e de poliadenilação/término do RNA mensageiro para direcionar a expressão da proteína em células de mamíferos. Após transfecção com o plasmídeo recombinante, a célula processa o gene, e a proteína viral sintetizada é submetida às vias de processamento existentes no interior da célula. O resultado deste processo inclui o transporte de peptídeos imunogênicos até a membrana celular, ligados a moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade – classe I/II (MHC-I/II), e a secreção da proteína no espaço extracelular. Essa localização celular da proteína expressa permite a ativação do sistema imune produzindo-se uma resposta de tipo celular e humoral (Donnelly et al., 1997; McDonnell and Askari, 1996; Ulmer et al., 1997). A demonstração de que inoculação direta com DNA plasmidial pode estimular imunidade protetora, tanto celular quanto humoral, promete transformar este método numa poderosa estratégia para o desenvolvimento de vacinas.

Assim, uma nova forma de vacinação, a vacina de DNA, está atualmente sob intensa investigação no que concerne à imunização contra a dengue. Ela utiliza um DNA que contém o gene de interesse antigênico inserido em um plasmídeo. A base teórica para um modelo de vacinação por moléculas de DNA reside no fato de que a transferência gênica direta de um DNA recombinante *in vivo* e *in vitro* resulta em expressão protéica (Donnelly et al., 1997; Gurunathan, Klinman, and Seder, 2000). Wolf e colaboradores demonstraram que a inoculação intramuscular de plasmídeos codificando genes repórter induzia a produção daquelas proteínas exógenas em células

musculares sem a integração do DNA nas células hospedeiras (Wolff et al., 1992a; Wolff et al., 1992b).

A vacinação de DNA apresenta vantagens importantes em relação às outras vacinas. Essas seriam, em primeiro lugar, as capacidades de mimetização dos efeitos das vacinas atenuadas no que tange à indução da resposta imune celular e, em segundo, as vacinas de DNA poderiam ser produzidas em larga escala com redução da relação custo/benefício, além de serem de fácil estocagem e aplicação. Entretanto, algumas questões têm sido levantadas em relação ao uso deste tipo vacinal. Estas incluem, principalmente, a possibilidade dos plasmídeos se integrarem no cromossomo do hospedeiro e induzirem respostas imunes contra as células transfectadas, gerando respostas auto-imunes. Até o momento não existe nenhuma evidência de integração dos plasmídeos, e experimentos indicam que o nível de auto-anticorpos induzidos pela vacina de DNA é incapaz de dar início a um processo de auto-imunidade (Gurunathan, Klinman, and Seder, 2000).

A introdução do DNA dentro das células do receptor é feita por injeção intramuscular ou através de micro-partículas de ouro cobertas com o DNA recombinante (biobalística), que são injetadas no músculo por um revólver de imunização (“gene guns”). Este método de imunização genética baseia-se na capacidade das células em receber, incorporar e expressar DNA exógeno, diferente do DNA celular (Gurunathan et al., 2000).

Costa e colaboradores construíram plasmídeos recombinantes expressando a proteína NS1 do vírus Dengue-2 e obtiveram resultados

satisfatórios em experimentos de imunização e desafio de camundongos (Costa et al., 2007; Costa, Freire, and Alves, 2006).

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

Em um estudo realizado por nosso grupo foram construídos plasmídeos expressando as proteínas prM/E do vírus Dengue-3. Dos plasmídeos obtidos, três foram analisados *in vivo* a fim de determinar suas capacidades de induzirem resposta imune em camundongos. Todos os animais inoculados com as construções desenvolveram anticorpos neutralizantes e apresentaram linfoproliferação após estímulo específico. Após imunização e desafio com vírus Dengue-3, os animais apresentaram maior taxa de sobrevivência em relação ao controle, sendo que um dos plasmídeos conferiu 80% a mais de proteção, em relação ao grupo controle não imunizado. Estes resultados indicam que este último plasmídeo figura como bom candidato vacinal, capaz de induzir imunidade duradoura e proteção contra o desafio com Dengue-3 em camundongos (De Paula et al., 2008).

Ocazonez e Fonseca (Ocazonez e Fonseca, 2001) construíram um plasmídeo recombinante expressando a proteína do Envelope viral de Dengue-2 sem a expressão concomitante de prM. Testes bioquímicos demonstraram que a proteína E foi corretamente expressa, no entanto, não foram encontradas em boa concentração no sobrenadante, indicando que a

expressão apesar de correta não foi eficiente. Testes imunológicos avaliaram a capacidade de indução da resposta imune do plasmídeo vacinal e de proteção de camundongos contra desafio com Dengue-2. Os resultados indicaram que camundongos inoculados intramuscularmente com o plasmídeo não produziram anticorpos anti-E e nem houve proliferação de células linfóides. Apesar destes resultados, houve um aumento de 20% nas taxas de sobrevivência e morbidade dos animais imunizados. Tais observações levam a crer que a baixa proteção dos animais pode ser explicada pela leve ativação do sistema imunológico decorrente da secreção ineficiente de E. Esta deficiência na secreção de E pode ser devida a ausência da co-expressão da proteína prM, sabidamente envolvida nos processos de maturação do vírus e dobramento correto de E. Desse modo, é possível que a ausência da proteína prM no plasmídeo recombinante tenha prejudicado os eventos de síntese e processamento de E, levando a uma redução na sua expressão, ou acarretando a modificação de algumas de suas características biológicas envolvidas na indução de resposta imune, ou ambos os fatores.

Assim, os resultados obtidos nos experimentos supracitados justificam o aprimoramento deste candidato vacinal através da inserção do gene de prM no mesmo.

V. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Construir um novo candidato vacinal pCID2Et por meio da inserção dos genes prM/DENV-2 ou prM/DENV-3, criando assim, dois plasmídeos diferentes e realizar uma análise comparativa entre a eficiência de cada plasmídeo na indução do sistema imune de camundongos imunizados.

3.2. Objetivos específicos

- Amplificar os genes de prM/DENV-2 e prM/DENV-3.
- Clonar os genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 em vetor de clonagem (pGEM-T, Promega Corporation).
- Clonar os genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 em vetor de expressão (pCID2Et) já modificado para expressão da proteína E truncada de DENV-2.
- Selecionar os clones recombinantes.
- Proceder à análise imunológica dos plasmídeos recombinantes em animais imunizados.

VI. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Células e plasmídeos

Células C6/36 (oriundas de *Aedes albopictus*) foram mantidas a 28°C em meio L15 (meio Leibovitz) suplementado com 10% de triptose, 10% de soro fetal bovino inativado e L-glutamina. As células Vero foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, antibióticos e fungizona. As células utilizadas para transformação bacteriana foram da cepa *E.coli* DH5α competentes já em uso no Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM).

Plasmídeos de clonagem pGEM-T foram adquiridos junto à Promega Corporation, Madison, Wisconsin e posteriormente acrescidos dos genes de prM/DENV-2 ou prM/DENV-3.

O vetor pCID2Et foi construído em um trabalho anterior através da inserção do gene que codifica a proteína E truncada do vírus Dengue-2 cepa New Guinea C em plasmídeo de expressão pCI Vector (Promega Corporation) entre os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* (“upstream”) e *KpnI* (“downstream”). Os plasmídeos pCI Vector originalmente modificados contêm uma potente região promotora (“enhancer”) derivada do citomegalovírus (CMV), um íntron quimérico, um sinal de poliadenilação proveniente do Simian Virus 40 (SV40) e uma região contendo um “polycloning site”. Também possuem sequências de dinucleotídeos não metilados ligados por ligações fosfodiéster (motivos cistidina-fosfatoguanosina, ou CpG) (Gurunathan, Klinman, and Seder, 2000; Gurunathan et al., 2000).

4.2. Estoques virais

4.2.1. Estoques Virais provenientes de cultura celular

Os vírus *Dengue* utilizados nesse trabalho são da cepa New Guinea C (DENV-2) e H87 (DENV-3), já em uso no Laboratório de Imunovirologia Molecular.

O estoque viral em cultivo celular foi produzido em células C6/36 crescidas em meio L15 contendo 10% de soro fetal bovino, com incubação a 28°C. Para tanto, garrafas de 25 cm³ contendo monocamadas confluentes de células C6/36 foram inoculadas com 25 µL de vírus Dengue-2 cepa New Guinea C e incubadas a 28°C por 7 dias. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em ultrafreezer à temperatura de -70°C. Uma Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) foi realizada para confirmar a positividade de cada sobrenadante de cultura celular.

4.2.2. Estoques Virais provenientes do macerado de cérebro de camundongo

Cem µL de vírus Dengue-2 cepa New Guinea C foram inoculados via intracerebral em camundongos Swiss recém-nascidos obtidos junto ao Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFV. Os animais foram monitorados 3 vezes ao dia buscando sinais de encefalite viral. Após 5 dias de infecção com vírus DENV-2 e 7 dias com vírus DENV-3 os animais apresentaram os primeiros sintomas foram sacrificados e estocados a -70°C.

Após 24 horas, os animais foram descongelados e o cérebro foi extraído com auxílio de seringa de insulina, macerado em solução PBS e centrifugado a 2500 x *g* a 4°C, por 10 min. Ao sobrenadante foi feita adição de soro fetal bovino para uma concentração final de 5%, e o mesmo foi estocado a -70°C. A presença do vírus foi confirmada por PCR.

4.3. Preparação dos RNAs e cDNAs virais

4.3.1. Extração do RNA

Células C6/36 foram infectadas com o vírus *Dengue* como descrito no item 3.2.1. O RNA total foi preparado por tratamento do sobrenadante do cultivo celular com TRIzol® (Invitrogen, CA, USA). Brevemente, foram homogeneizados 500 µL da amostra de sobrenadante de células ou de macerado de cérebro de camundongo com 750 µL de TRIzol® e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. A seguir foram adicionados 300 µL de clorofórmio agitando-se os tubos por 15 min manualmente e incubando-os a temperatura ambiente por mais 2 min. As amostras foram centrifugadas a 12000 x *g* por 15 min a uma temperatura de 4°C, após a qual a fase aquosa transparente foi separada e transferida para um outro tubo. Em seguida procedeu-se a adição de 350 µL de isopropanol, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min a fim de promover a precipitação do RNA e posteriormente submetidas à centrifugação por 10 min a uma temperatura de 4°C. Os precipitados foram lavados com 750 µL de etanol 75% gelado e foram mantidos a -70°C. Após 24 horas foi feita mais uma centrifugação (10 min, 7500 x *g*) e os precipitados foram secos a temperatura ambiente por 30 min. Após a secagem, os precipitados foram suspensos em 20 µL de água DEPC.

Aproximadamente 10 µg de cada RNA total, obtidos conforme este protocolo, foram usados para sintetizar as primeiras fitas de cDNA, usando “primers” randômicos (Random Primers, Pharmacia®, São Paulo).

4.3.2. Confeção do cDNA

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

A 11µL do RNA foi adicionado 1µL do primer randômico (pd(N)₆) (Amersham-Pharmacia®, USA), submetidos a aquecimento a 70°C por minutos e colocado no gelo por 2 minutos, período após o qual as amostras foram centrifugadas a 13000 x g por 1 minuto. Rapidamente, foi adicionado uma mistura reacional contendo 4µL de 5X Reaction Buffer, 2µL dNTP, 1µL H₂O milliQ, seguindo-se da incubação a 37°C por 5 minutos. Decorrido este tempo foi feita adição de 1µL (200u) de transcriptase reversa. As amostras foram então primeiramente incubadas a 42°C por 60 minutos e depois a 70°C por 10 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

4.4. Amplificação dos genes prM

4.4.1. Construção dos *primers* para amplificação dos genes prM

Foram construídos dois pares de *primers* flanqueando a região dos genomas de DENV-2 e DENV-3 responsáveis pela codificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3. Esses iniciadores sintéticos foram construídos de forma a inserir nas fitas amplificadas sítios únicos de restrição para as enzimas *XhoI* e *EcoRI*, as quais serão utilizadas posteriormente para a clivagem dos fragmentos amplificados assim como para a clonagem dos mesmos no vetor de expressão pCID2Et.

4.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Parte da amostra contendo a fita híbrida de RNA/cDNA foi amplificada empregando-se a técnica da PCR. Iniciadores sintéticos de DNA, flanqueando as regiões de interesse foram sintetizados e utilizados na amplificação das mesmas. A mistura reacional foi constituída de aproximadamente 100 ng do cDNA, 0,5 pmol/ μ L dos *primers sense* e *antisense*, 0,2 mM dNTPs, tampão 1X da enzima, 2,5 mM de $MgCl_2$ e 2,5U de Taq-DNA Polimerase, para um volume final de 25 μ L. A amplificação do DNA foi feita em 35 ciclos, cada um contando com três etapas de um minuto de duração. A temperatura utilizada para separar as fitas de DNA foi de 94°C, a de ligação dos *primers* ao cDNA foi de 55°C e a de extensão do fragmento de DNA a ser amplificado, de 72°C. O resultado das amplificações foi detectado através de eletroforese em gel de agarose (Sigma®, St. Louis, MI), a 1,5%, corado com brometo de etídeo 1 μ g/mL, visualizado à luz ultravioleta e digitalizado pelo fotodocumentador Alpha DigiDoc (Sigma-Aldrich®, Alemanha).

4.4.3. Purificação dos amplicons

Os fragmentos de DNA amplificados corretamente foram separados em gel de agarose, recuperados e purificados com o Kit de Purificação de DNA a partir de gel de agarose (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega). Para tanto, as bandas de 540 pb foram identificadas por coloração com brometo de etídeo, excisadas do gel e os fragmentos pesados. Para cada mg de gel foi adicionado 10 μ L de Membrane Binding Solution, que após

incubação à 65°C por 10 min, foi aplicada em uma coluna e centrifugada a 14000 x g por 1 minuto. Após duas lavagens com a solução *Membrane Wash Solution*, os DNAs foram eluídos da coluna por 50 µL de água ultrapura.

4.5. Ensaios de clonagem

4.5.1. Preparação de bactérias competentes para a transformação

Bactérias *E. coli* DH5α, previamente estocadas em nosso laboratório em meio LB/DMSO 10% (dimetilsulfóxido) foram semeadas em placas contendo LB/ágar 1,5% e incubadas a 37°C por 18 horas. Uma das colônias isoladas foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido para crescimento durante 18-20 horas a 37°C em agitação constante de 180 rpm, e então 0,5 mL desta cultura foi inoculado em 50 mL de meio LB para novo crescimento a 18°C. As bactérias foram colhidas em fase exponencial de crescimento, detectada quando a absorbância a 550 nm estava em aproximadamente 0,6 (OD 0,6). As bactérias foram então sedimentadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C, e em seguida suspensas em 0,5 volume de uma solução de CaCl₂ 50 mM. Após 2 horas de incubação em gelo, as bactérias foram novamente centrifugadas e o precipitado foi suspenso em 0,08 volume de solução tampão FSB (acetato de potássio 10 mM pH 7,5; MnCl₂.4H₂O 45 mM; CaCl₂.2 H₂O 10 mM; KCl 100 mM; glicerol 10%). Para armazenamento das bactérias em freezer -70°C foi adicionado DMSO a 10%. As bactérias foram aliquotadas em volumes de 200 µL, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente estocadas a -70°C.

4.5.2. Clonagem dos genes prM no plasmídeo de clonagem pGEM-T

A ligação dos fragmentos de DNA purificados ao plasmídeo foi feita com a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Beverly, MA/Bioagency, São Paulo). A ligação foi realizada a 4°C durante 12 horas. Para a reação, foram utilizados 150 ng dos produtos amplificados e 50 ng de vetor pGEM-T numa reação de 10 µL que continha 5 µL da solução tampão 2X e 1 µL da enzima T4 ligase. O produto dessa reação foi utilizado para a transformação de células competentes pelo método do choque térmico.

4.5.3. Transformação de células *E. coli* DH5α

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

4.5.4. Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas

Os plasmídeos recombinantes contendo cDNA viral foram identificados através de minipreparação de DNA plasmidial pelo método da lise alcalina. As bactérias isoladas das placas de transformação foram crescidas “overnight” em meio LB acrescido de ampicilina em rotação constante de 190 rpm. Em seguida, foi feita centrifugação das culturas por 1 min a 18000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 µL de solução de lise. Após 1 min a temperatura ambiente, seguiu-se a adição de 400 µL de uma solução alcalina fresca e os tubos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente e acrescidos de 300 µL de solução de acetato de amônio 7,5 M. Após um período de 10 min em banho de gelo seguido de uma centrifugação a 14000 x *g* por 3 min, o sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e feita adição de 0,6 V de isopropanol. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min e centrifugados a 14000 x *g* por 10 min para precipitação do DNA plasmidial. Os precipitados foram lavados com etanol 70% , secos a temperatura ambiente e suspensos em 50 µL de água ultrapura. Os plasmídeos foram analisados inicialmente através da Reação em Cadeia da Polimerase e confirmados por meio da análise dos produtos de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* e purificados em colunas de separação de DNA. Após confirmação da presença dos plasmídeos recombinantes nos clones bacterianos, estes foram sequenciados pelo Laboratório de Genômica - BIOAGRO/UFV, utilizando o seqüenciador automático MegaBACE™ 500 (GE Healthcare, Inglaterra).

4.5.5. Ensaios de restrição enzimática

Os plasmídeos recombinantes identificados foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. As reações foram realizadas conforme instruções do fabricante, para um volume final de 40 µl. A mistura reacional continha 1U de enzima por µg de DNA e tampão da enzima para uma concentração de 1X. O *mix* foi incubado a 37°C por 4 horas. Os fragmentos digeridos foram identificados por visualização sob luz ultravioleta depois de serem submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, a uma voltagem constante de 80V. Os fragmentos cujo tamanho correspondia ao esperado foram extraídos do gel e purificados em colunas de separação de DNA.

4.5.6. Clonagem dos genes prM no plasmídeo de expressão pCID2Et

Os plasmídeos pGEM-T recombinantes foram submetidos a digestão enzimática com *XhoI* e *EcoRI* de modo a liberar o inserto de prM. Os fragmentos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% a uma voltagem constante de 80V. Os fragmentos de 540 pb foram extraídos do gel e purificados em colunas de separação de DNA fazendo-se o uso do Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). O plasmídeo pCID2Et foi, de igual modo, digerido com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* e a banda correspondente àquela de tamanho esperado foi excisada do gel e purificada com o Kit supracitado de acordo com o mesmo protocolo.

Para inserção do gene de prM no vetor de expressão, feita uma reação de ligação utilizando-se para tanto a enzima T4 ligase (New England Biolabs, Beverly, MA/Bioagency, São Paulo). A reação ocorreu a 4°C/12

horas e os produtos desta ligação foram usados para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α , com objetivo de se produzir clones de plasmídeos recombinantes que expressem a proteína prM e E dos vírus *Dengue*. A seguir foi feita a extração do DNA plasmidial das colônias obtidas e os plasmídeos recombinantes foram identificados pela Reação em Cadeia da Polimerase, para a qual foram usados os *primers* específicos para amplificação do gene de prM.

4.6. Avaliação dos plasmídeos vacinais

4.6.1. Imunização de Camundongos

Para avaliar a imunogenicidade da vacina aprimorada, quatro grupos de cinco camundongos Swiss, obtidos junto ao Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFV, foram inoculados intramuscularmente com 100 μ g dos plasmídeos vacinais (pCID2EtprMD3 e pCID2EtprMD2) e controle (pCID2Et) em intervalos de 15 dias, durante 45 dias. A primeira inoculação foi realizada quando os animais estavam com três semanas de vida. Antes de cada vacinação e 15 dias após a última imunização foi realizada coleta de sangue dos animais por punção do plexo retro-orbitário e o soro acondicionado a -70°C. As amostras de soro foram posteriormente agrupadas em *pools* e testadas para a presença de anticorpos específicos para os vírus da dengue e para a reatividade da resposta imune celular. Seguidos 15 dias da última inoculação plasmidial, foi realizado o sacrifício dos animais para extração do baço a fim de dar início aos ensaios de proliferação e dosagem de citocinas. Os testes usados para estes fins são descritos a seguir.

4.6.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A fim de avaliar a presença de anticorpos específicos para a proteína E do vírus Dengue-2 no soro dos animais inoculados foi realizado um ensaio de ELISA indireto. Com esta finalidade, placas de fundo chato (Corning, México) foram sensibilizadas por 24 horas a 4°C com 5 µg da proteína E purificada diluída em tampão carbonato 0,1M pH 8,6, lavadas e bloqueadas com solução de PBS/albumina 3% pH 7,2 sob incubação a 37°C durante 60 min. Dez µL do soro dos animais foram diluídos em 100 µl de solução PBS 1% de Albumina e 25 µl/poço desta diluição adicionados na placa sensibilizada. Nesta etapa, a placa permaneceu por 2 horas a uma temperatura constante de 37°C, período após o qual foram realizadas 10 lavagens com PBS Tween 20 0,05% (PBS-T 0,05%) para a retirada dos anticorpos não reativos. Na próxima etapa foi feita a adição de um anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, Alemanha) diluído a 1:200 em PBS 1X. Após 2 horas de incubação a 37°C, foram novamente realizadas 10 lavagens com PBS-T 0,05%, e o substrato Sigma FAST™ OPD (diidrocloreto de orto-fenilediamina) (Sigma-Aldrich, Alemanha), preparado conforme instruções do fabricante, foi adicionado a cada poço da placa. A placa foi incubada com o substrato até a observação de cor e procedeu-se à leitura das densidades óticas (OD) de cada amostra a 450 nm. Foram consideradas positivas as amostras cujas ODs foram maiores do que a média das ODs dos controles negativos acrescidos de 2 desvios-padrão.

4.6.3. Obtenção das células do baço

Decorridos 15 dias da última inoculação, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical e os baços foram coletados em ambiente estéril e colocados em 5 ml de RPMI-16 incompleto com 2mM EDTA. Após homogeneização, os debris foram retirados e a suspensão celular submetida à centrifugação durante 10 min a 1200g a 4°C. O precipitado contendo os esplenócitos e hemácias foi diluído em tampão de lise gelado (NH_4Cl 0,16M; Tris HCl 0,7M pH 7,5; EDTA 2mM) e incubado a temperatura ambiente por 4 minutos para lise das hemácias. Após 2 lavagens com meio RPMI-1640 incompleto seguidas de centrifugação o precipitado de esplenócitos foi suspenso em 3 ml de RPMI-1640 completo e as células contadas em câmara de Neubauer.

4.6.4. Ensaios de Proliferação

Para avaliação da linfoproliferação frente ao estímulo com o vírus Dengue-2 foi utilizado o protocolo de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). Neste ensaio, células extraídas do baço dos animais inoculados foram estimuladas com Dengue-2 a fim de verificar se há proliferação das mesmas. Para tanto, as células foram contadas e semeadas em placas de 96 wells na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/poço juntamente com 0,5 e 0,1 MOI do vírus. Para o controle negativo foi utilizado meio RPMI-1640 completo e para o controle positivo, a concavalina A ($0,2\mu\text{g/mL}$). Após 44 horas de cultura a 37°C foi feita adição de $5\mu\text{g/mL}$ de MTT em PBS, homogeneizado por 5 min a 150 rpm e incubado a 37°C por 4 horas. O produto do metabolismo do MTT (formazan) foi suspenso em 200 μL de DMSO (Dimethyl sulfoxide), homogeneizado por 5 min a 150 rpm até completa

solubilização. A leitura da absorbância foi feita a 560 nm. A densidade óptica é diretamente correlacionada com a quantidade de células viáveis.

4.6.5. Caracterização fenotípica de células do baço

Para avaliar a indução de células de memória e de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pelos plasmídeos em estudo, foi realizada uma citometria de fluxo. Os anticorpos utilizados foram adquiridos junto à BD Pharmingen, NJ USA (anti-CD44-PE Cy5.5) e Caltag Laboratories, Thailand (anti-CD4-FITC e anti-CD8-FITC). Células extraídas do baço dos animais inoculados foram incubadas com uma mistura de anticorpos contendo anti-CD4/anti-CD44 ou anti-CD8/anti-CD44, para avaliar a expressão de linfócitos TCD4⁺ de memória ou TCD8⁺ de memória, respectivamente. Após 2h de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 x g/10 min e ressuspensas em PBS – Formol 1%. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo GUAVA (Guava EasyCyte Mini System, Millipore) e os dados analisados no software Guava CytoSoft 4.2.1.

4.6.6. Expressão de Citocinas

A expressão das citocinas que indicam estímulo da resposta imune celular Th-1 (interferon- γ) ou Th-2 (IL-4 e IL-10) foram realizadas por PCR em tempo real, utilizando-se para tanto iniciadores sintéticos específicos para amplificação dos genes de β -actina (controle endógeno), INF- γ , IL-4 e IL-10. A PCR foi realizada no Laboratório de Infectologia Molecular Animal – BIOAGRO, utilizando o equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Após 3 imunizações, o baço dos animais imunizados foi extraído e processado. Uma alíquota de 5×10^6 células/poço foi semeada em placas de

24 poços e submetidas a estímulo com 0,5 e 0,1 MOI de vírus Dengue-2. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI-1640 completo e para o controle positivo as células foram estimuladas com Concanavalina A (ConA) na concentração 0,2 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas, período após o qual as células foram coletadas e processadas para extração do RNA e confecção do cDNA.

VII. RESULTADOS

5.1. CONSTRUÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

5.1.1. Amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3

Após extração de RNA dos vírus DENV-2 (New Guinea C) e DENV-3 (H87), foi realizada a confecção do cDNA dos respectivos vírus. Este cDNA foi utilizado como molde em uma reação em cadeia da polimerase, utilizando os “primers” específicos para os genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3. A figura 1 demonstra a amplificação dos fragmentos prM/DENV-2 e prM/DENV-3.

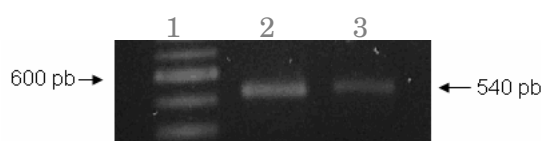


Figura 1. Amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3. Eletroforese dos produtos de amplificação dos cDNAs DENV-2 e DENV-3 em gel de agarose 0,8%. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador 100pb (100 pb DNA Ladder, Invitrogen, Califórnia, EUA), canaleta 2: banda de 540 pb referente à amplificação do gene prM/DENV-2, canaleta 3: banda de 540 pb referente à amplificação do gene prM/DENV-3.

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

Os fragmentos obtidos por PCR foram purificados conforme especificado na metodologia, e utilizados para ligação em plasmídeo de clonagem pGEM-T. A reação de ligação foi realizada a 4°C, e os produtos desta reação inseridos em bactérias *E. coli* DH5α ultracompetentes. As colônias transformadas foram selecionadas em meio contendo ampicilina e submetidas à extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina. Conforme pode ser observado nas figuras 2 e 3, tanto os fragmentos de

prM/DENV-2 quanto os de prM/DENV-3 foram eficientemente clonados no plasmídeo pGEM-T. Foram selecionados para dar continuidade ao trabalho, os clones de número 51 (prM/DENV-2) e 13 (prM/DENV-3).

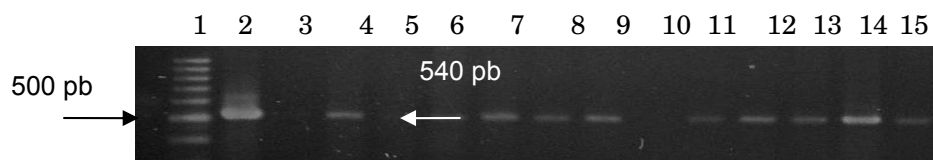


Figura 2. Clonagem de prM/DENV-2 em vetor pGEM-T. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos plasmídeos pGEM-T/prMDENV-2 extraídos das colônias selecionadas por resistência ao antibiótico ampicilina. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador 100 pb, canaleta 2: cDNA DENV-2 (controle positivo), canaleta 3: controle negativo. Nas canaletas 4, 6, 7, 8, 9, 11 a 15 as bandas com tamanho aproximado de 540 pb são correspondentes ao fragmento prM/DENV-2 amplificado.

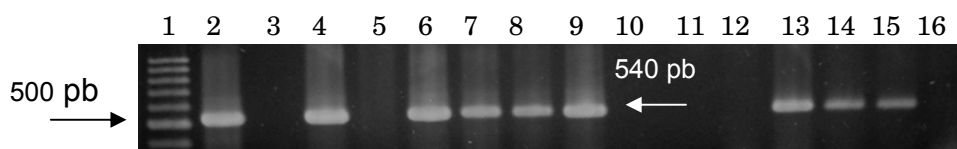


Figura 3. Clonagem de prM/DENV-3 em vetor pGEM-T. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos plasmídeos pGEM-T/prMDENV-3 extraídos das colônias selecionadas por resistência ao antibiótico ampicilina. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador 100 pb, canaleta 2: cDNA DEN-3 (controle positivo), canaleta 3: controle negativo. Nas canaletas 4, 6 a 9 e 13 a 15, as bandas com tamanho aproximado de 540 pb são correspondentes ao fragmento prM/DENV-3 amplificado.

5.1.3. Análise por sequenciamento dos fragmentos clonados

Os plasmídeos recombinantes obtidos após ligação dos amplicons no vetor pGEM-T foram enviados ao laboratório de Genômica - BIOAGRO/UFV, onde foi realizado o sequenciamento de ambos os clones, utilizando o seqüenciador automático MegaBACE™ 500 (GE Healthcare, Inglaterra). As seqüências obtidas foram analisadas através do alinhamento com as seqüências presentes no banco de dados NCBI.

Para análise da identidade dos fragmentos, a seqüência obtida foi alinhada através da ferramenta *Basic Local Alignment Tool* (BLAST). No BLASTn, para o clone 51 (pGEM-T-prM/DENV-2), foi obtida uma identidade de 98% do fragmento clonado com o gene codificante da proteína prM do vírus Dengue-2, com apenas 1% de *gaps* na seqüência. Já para o clone 13, referente ao gene da prM/DENV-3, o alinhamento demonstrou identidade de 96% com a seqüência do gene responsável por codificar a proteína prM do vírus Dengue-3, com 2% de *gaps*.

No BLASTx, em relação ao clone 51, sua seqüência traduzida obteve uma identidade de 97%, e uma similaridade de 98% com a proteína prM do vírus Dengue-2, não apresentando nenhum *gap*. Para o clone 13, a tradução de sua seqüência revelou que existia 76% de identidade, 86% de similaridade e apenas 1 *gap* em relação a seqüência aminoacídica da proteína prM do vírus Dengue-3.

Para acessar a proximidade entre as seqüências das proteínas prM de ambos os vírus, as mesmas foram alinhadas utilizando a ferramenta *BLAST two sequences*. Nos isolados selvagens, a identidade entre as seqüências codantes das proteínas prM dos vírus DENV-2 e DENV-3 é de

71%, apresentando 2% de *gaps*. Entretanto, apresentam 70% de seus resíduos de aminoácidos idênticos, e 84% de similaridade sem *gaps*.

A Última fase da análise das seqüências teve como objetivo verificar se os clones obtidos apresentavam os mesmos padrões em termos de similaridade e identidade observados nos genes selvagens. Em relação à seqüência nucleotídica, nossos clones acompanham o padrão de identidade dos isolados de ocorrência natural, 70% de identidade nucleotídica, com 3% de *gaps*. Entretanto, em termos de seqüências aminoacídicas, esta tendência se desloca para uma maior proximidade entre os genes clonados. Após a tradução e comparação das seqüências traduzidas de ambos os fragmentos, verificou-se uma identidade de 75% de seus resíduos aminoacídicos com 91% de similaridade e nenhum *gap*.

Tabela 1. Avaliação da similaridade de seqüências aminoacídicas das proteínas prM. (*Dados mostrados em valores percentuais).

	Identidade*	Similaridade*	“Gaps”*
pGEM-T/prMD2 vs prMDEN-2	97	98	0
pGEM-T/prMD3 vs prMDEN-3	76	83	1
prMDEN-2 vs prMDEN-3	70	84	0
pGEM-T/prMD2 vs pGEM-T/prMD3	75	91	0

```

prM2      -----CPLLKQNEPEDIDC 14
prM3      TSRDGEPRMIVGEEKRKIPTFDSLWNQHVHTHSHGFGPRDVHGQLTNAPTLPKWSLKTITA 60
              . * * : . : : .

prM2      WCNSTSTWVITYGCTTTGHEHREKRSVALVPHVGMGLETRTETWMSSEGAWKHAQRIETW 74
prM3      GATLHRTWVITYGACNQAGEHRRDKRSVALAPHVGMGLDTRTQTWMSAEGAWRQVEKVEIW 120
              ..      *****:*. :*****:*****.*****:***:****:*****:..:::***

prM2      ILRHGFTIMAAILAYTIGTHFQRA 100
prM3      ALRHG----- 126
              *****

```

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

lxi

canaletas 5, 6 e 7: bandas de aproximadamente 540 pb, referentes ao fragmento prM/DENV-3.

Após digestão dupla, os produtos de clivagem foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (figura 5) e o plasmídeo pCID2Et em gel de agarose 0,8% (figura 6).

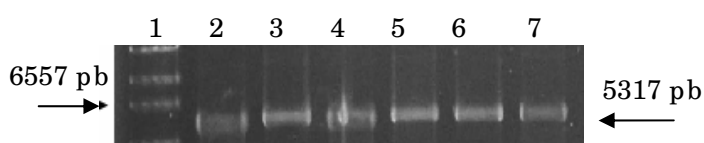


Figura 6. Mapa de restrição do plasmídeo pCID2Et. Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos pCID2Et digeridos com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador λ *HindIII*, canaletas 2 a 7: bandas de aproximadamente 5300 pb, referente ao plasmídeo pCID2Et digerido.

Dando prosseguimento aos experimentos para clonagem dos fragmentos de prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no pCID2Et, as bandas de 540 e as de 5300 pb foram excisadas do gel e utilizadas para purificação dos fragmentos. Finalizada a purificação dos produtos de digestão, estes foram utilizados em uma reação de ligação a fim de inserir o gene de prM no plasmídeo de expressão já modificado para expressão de E. Os clones recombinantes foram isolados em uma placa réplica e processados para extração do DNA plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram utilizados em reações de PCR para verificar a presença do inserto de interesse. Observando as figuras 7 e 8 é possível notar que tanto o fragmento

prM/DENV-2, quanto o prM/DENV-3 foram inseridos de modo eficiente no vetor vacinal.

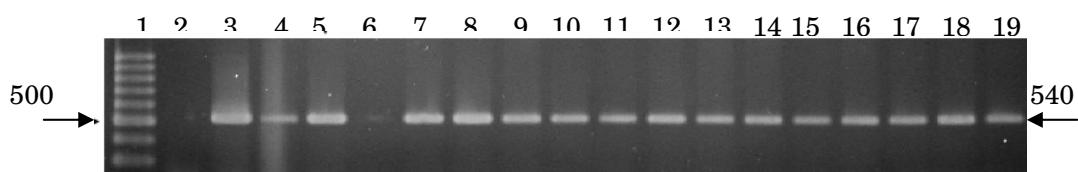


Figura 7. Inserção de prM/DENV-2 no plasmídeo pCID2Et. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos PCR dos plasmídeos pCID2Et/prM/DENV-2 recombinantes. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador 100 pb, canaleta 2: controle negativo, canaleta 3: controle positivo, canaletas 4 e 5, 7 a 19: bandas de aproximadamente 540 pb, referentes ao inserto prM/DENV-2.



Figura 8. Inserção de prM/DENV-3 no plasmídeo pCID2Et. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos PCR dos plasmídeos pCID2Et/prM/DENV-3 recombinantes. Da esquerda para a direita: : canaleta 1: marcador 100 pb, canaleta 2: controle negativo, canaleta 3: controle positivo, canaletas 9, 12 e 13: bandas de aproximadamente 540 pb, referentes ao inserto prM/DENV-3.

Os plasmídeos vacinais aprimorados expressando as proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 foram denominados pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM, respectivamente.

O clone 42 (pCID2EtD2prM) e o 26 (pCID2EtD3prM) foram escolhidos para desenvolvimento de análises quanto à expressão de E à imunogenicidade destas duas construções vacinais.

As análises bioquímicas demonstraram que a expressão da proteína E foi maior nas células transfectadas com o plasmídeo pCID2EtD3prM. Na imunoprecipitação seguida de separação eletroforética das proteínas as bandas protéicas obtidas foram submetidas à densitometria ótica que apresentou a indicação de que a proteína prM/DENV-3 aumentou a expressão da proteína E truncada em 67,02% com relação à proteína prM/DENV-2 (figura 9).

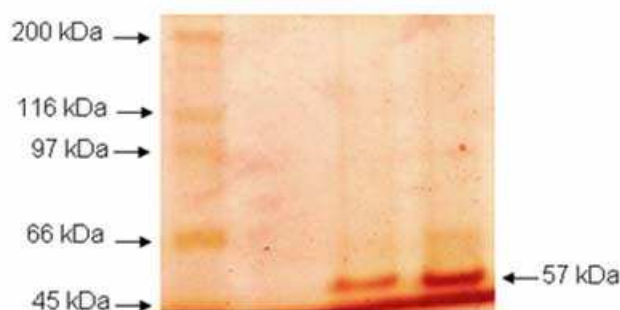


Figura 9. Detecção da expressão da proteína E por células transfectadas com os plasmídeos recombinantes. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de peso molecular de proteínas (“Molecular Weight Marker”, Sigma-Aldrich, Alemanha), controle negativo de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

A seguir são demonstrados os resultados dos testes realizados para avaliar se este aumento da expressão de E pelo plasmídeo pCID2EtD3prM acarreta alguma alteração na resposta imune induzida pelo mesmo.

5.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

5.2.1. ELISA

A fim de verificar se os animais inoculados haviam produzido anticorpos específicos para a proteína E, o soro dos mesmos foi coletado antes da primeira imunização (controle negativo), e quinze dias após cada inoculação e avaliados por ELISA indireto. Os dados indicam que os animais vacinados com plasmídeo pCID2EtD3prM apresentaram maior soroconversão tanto em relação ao plasmídeo controle pCID2Et quanto à construção pCID2EtD2prM (figura 10).

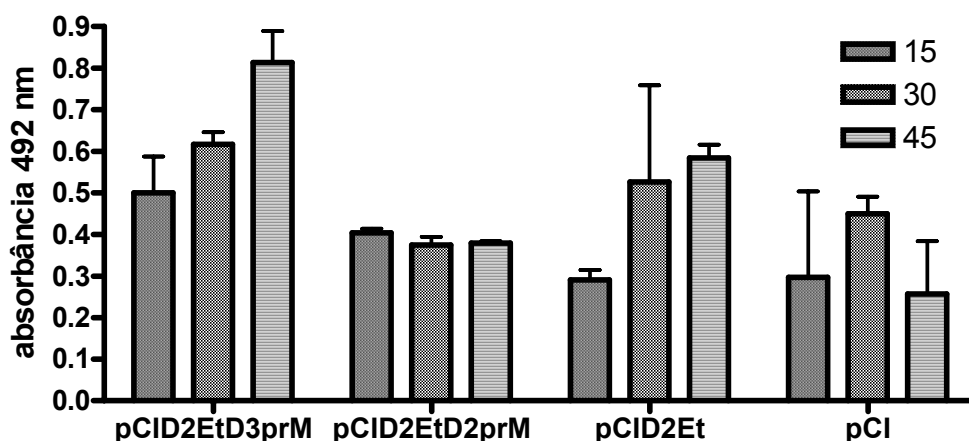


Figura 10. ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos para a proteína E do vírus Dengue-2. As barras indicam a quantidade dos anticorpos com 15, 30 e 45 dias após a primeira vacinação, respectivamente.

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Bonferroni a 0,05 de significância. Os resultados demonstraram que a diferença foi estatisticamente significativa entre o grupo pCID2EtD3prM e pCID2EtD2prM.

5.2.2. Linfoproliferação

Para avaliar a resposta das células linfóides de camundongos imunizados com os plasmídeos recombinantes frente ao estímulo com Dengue-2, foi realizado um ensaio de linfoproliferação. As células de todos os grupos apresentaram proliferação, entretanto os resultados demonstraram maior ativação das células linfóides provenientes do baço dos animais vacinados com pCID2EtD3prM. Esta diferença se torna mais evidente quando é utilizado um MOI 0,1. pCID2Et e pCID2EtD2prM apresentaram valores similares de linfoproliferação (figura 11). Análises estatísticas utilizando o teste de Bonferroni demonstraram que a diferença foi significativa para todos os grupos estimulados com 0,1 MOI de vírus. Entretanto, em relação ao MOI 0,5, a diferença estatisticamente significativa foi encontrada apenas entre os plasmídeos contendo o inserto de prM em relação a construção original, não havendo diferença estatística entre pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM.

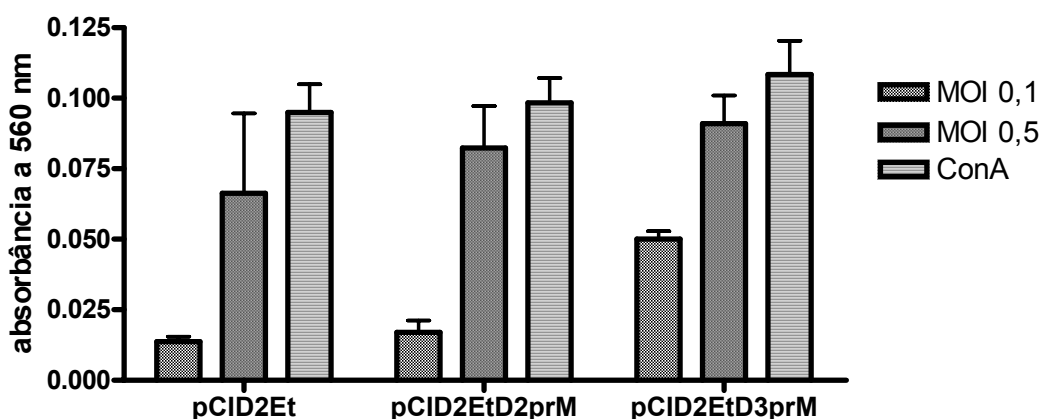


Figura 11. Ensaio de Linfoproliferação. Proliferação das células linfóides extraídas dos animais imunizados com os plasmídeos pCID2Et, pCID2EtD2prM e

pCID2EtD3prM após estímulo com DEN-2 (MOI 0,5 e 0,1) e ConA (controle positivo).

5.2.3. Caracterização fenotípica das células imunes

Os resultados apresentados nas figuras 12 e 13 e na tabela 2 apontam para uma maior indução de células de memória de ambos os tipos ($CD4^+$ e $CD8^+$) nos animais imunizados com o plasmídeo pCID2EtD3prM, quando em comparação com os grupos vacinados com pCID2Et e pCID2EtD2prM. Este padrão se manteve no que tange ao número de linfócitos TCD8⁺, e em relação à quantidade total de linfócitos T ($CD4 + CD8$). Entretanto, quando se comparou a quantidade de linfócitos TCD4⁺ induzida pela imunização com os plasmídeos construídos, observou-se que animais imunizados com pCID2EtD3prM e pCID2EtD2prM apresentaram quantidades similares deste tipo celular. Avaliação estatística dos dados realizada por teste T a 0,05 de significância indicou diferença estatisticamente significativa entre pCID2EtD3prM e os demais grupos analisados, tanto em relação à quantidade de células TCD4, quanto TCD8.

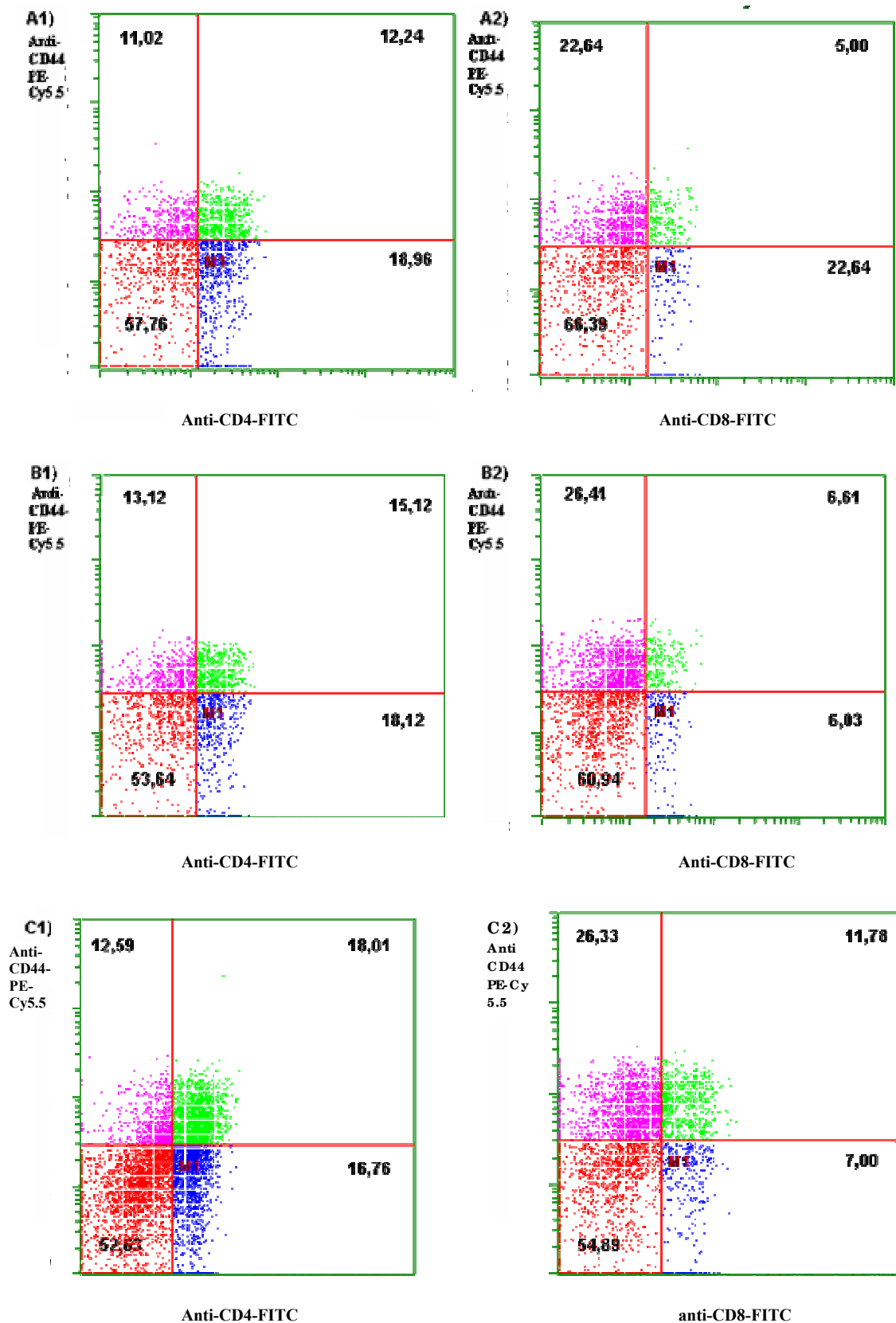


Figura 12. Análise do fenótipo das células extraídas do baço dos animais imunizados. **A)** grupo imunizado com pCID2Et, marcação de células CD4⁺ de

memória em A1 e de células TCD8⁺ de memória em A2; **B)** grupo imunizado com pCID2EtD2prM, marcação de células CD4⁺CD44⁺ em B1 e de células CD8⁺CD44⁺ em B2; **C)** imunização com o plasmídeo pCID2EtD3prM, marcação de Linfócitos TCD4⁺ de memória em C1 e linfócitos TCD8⁺ de memória em C2. Os valores citados correspondem à média de dois experimentos.

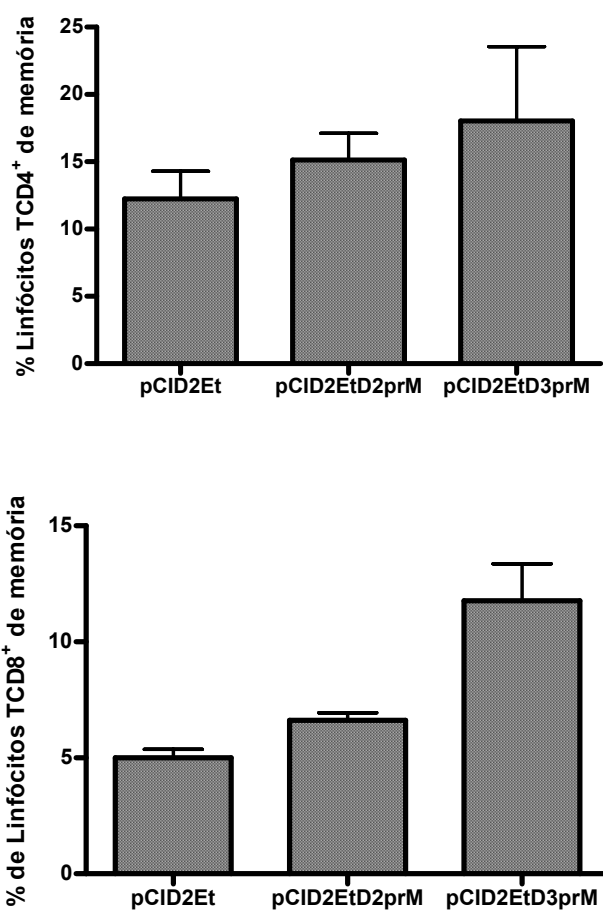


Figura 13. Análise da indução de células de memória nos animais imunizados. **A)** Porcentagem de linfócitos TCD4⁺ de memória; **B)** Porcentagem de linfócitos TCD8⁺ de memória.

Tabela 2. Porcentagem de linfócitos induzida nos animais imunizados com as construções plasmidiais.

	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD44 ⁺	CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD44 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Total de LT
pCID2Et	31,2± 3,01	12,2 ± 2,09	10,9 ± 1,09	5,0 ± 0,52	3,09	42,17
pCID2EtD2prM	33,2 ± 6,15	15,1 ± 2,82	12,6 ± 0,43	6,6 ± 0,47	2,75	45,9
pCID2EtD3prM	34,8± 18,0	18,0± 7,83	18,8± 4,41	11,8± 2,25	1,85	53,55

5.2.4. Detecção de citocinas

As células extraídas do baço dos animais foram cultivadas durante 2 horas sob estímulo específico DENV-2 a fim de mensurar a expressão de RNA mensageiro de IL-4 e IL-10 (perfil TH2 de resposta) e INF-γ (perfil de resposta TH1).

Os dados obtidos demonstram um perfil predominantemente TH1, com grande expressão de INF-γ. A síntese de IL-10 também foi detectada, não superando, entretanto a expressão de INF-γ (tabela 3).

Tabela 3. Expressão de IL-4, IL-10 e INF-γ em comparação com o grupo controle, após estímulo com vírus Dengue-2.

Grupo	IL-4	IL-10	INF-γ
pCID2Et	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,01	5,56 ± 4,8
pCID2EtprMD2	0,015 ± 0,01	0,09 ± 0,03	6,62 ± 3,45
pCID2EtprMD3	0,125 ± 0,12	0,14 ± 0,04	53,0 ± 20,5

VIII. DISCUSSÃO

Tendo em vista a atual situação epidemiológica da dengue no Brasil e no mundo, é de consenso da comunidade científica em geral que existe uma necessidade crescente de uma vacina eficaz e de fácil acesso para prevenção da doença. Várias estratégias têm sido adotadas com esta finalidade, desde os métodos de atenuação viral clássicos ou através da engenharia genética, até as vacinas de DNA, dentro das quais se encaixa o presente estudo.

Especificamente, o objetivo deste estudo foi observar se a presença da proteína prM em um plasmídeo vacinal expressando a proteína E representaria aumento na capacidade do mesmo em gerar resposta imune em camundongos inoculados, tendo como suporte a observação em nosso laboratório de que esta construção apresentou aumento na expressão de E “in vitro”. Estudos demonstram que a proteína E co-expressando a proteína prM leva a indução da secreção de anticorpos neutralizantes e proteção de camundongos (Heinz et al., 1995). Outros trabalhos sugerem que há uma correlação entre os níveis de expressão da proteína E e a indução de anticorpos neutralizantes (Konishi, Fujii, and Mason, 2001; Konishi, Terazawa, and Fujii, 2003; Konishi et al., 1998; Konishi et al., 2000).

Estudos com outros flavivirus e com o próprio *Dengue* vírus evidenciam que para a correta manutenção da conformação de E é necessário a expressão concomitante da proteína prM (Guirakhoo and Roehrig, 1992; Konishi and Mason, 1993). Foi observado que no vírus da encefalite de Murray Valley, os vírions que continham a proteína prM não processada eram mais ácido-resistentes, sugerindo que a prM tem uma função de “chaperona” e protetora da proteína E de mudanças conformacionais irreversíveis no compartimento ácido da via secretória celular (Guirakhoo et al., 2006; Guirakhoo and Roehrig, 1992). Além do mais, evidências experimentais sugerem que os epítomos neutralizantes da proteína E contra os vírus *Dengue* sejam conformacionais (Henchal et al., 1985).

Ocazionez e Fonseca também demonstraram que a baixa proteção de uma vacina de DNA contra o DENV-2 pode ser resultante de uma fraca ativação do sistema imune como consequência de uma imperfeita secreção da proteína E truncada devido a ausência de prM (Ocazionez and Fonseca 2000).

Além do mais, nota-se que grande parte das pesquisas envolvendo construções plasmidiais expressando a proteína prM/E do vírus Dengue-3 apresentam melhores resultados em relação àquelas onde os plasmídeos continham o cassete de expressão da prM/E Dengue-2 (Blair et al., 2006; De Paula et al., 2008; Konishi et al., 2000). Estas observações levam a crer que a proteína prM/DENV-3 possa apresentar maior capacidade de chaperona, já que é sabido que prM tem papel fundamental na síntese, processamento

e correta conformação de E (Lindenbach and Rice, 2003; Lindenbach, 2001; Ocazionez and Fonseca 2000).

Com o intuito de investigar esta possibilidade foram construídos dois plasmídeos através da inserção dos genes de prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no vetor plasmidial pCID2Et previamente construído a fim de expressar a proteína E/DENV-2 truncada (Ocazionez and Fonseca 2000).

Os plasmídeos foram denominados pCID2EtD2pM e pCID2EtD3pM, e expressavam respectivamente as proteínas prM/DENV-2-E/DENV-2 e prM/DENV-3-E/DENV-2.

O sequenciamento dos insertos clonados revelou alta identidade com os genes selvagens postados no banco de dados. Para pCID2EtD2pM, foi observada 98% de identidade e para o pCID2EtD3pM, 96%. Em relação à seqüência aminoacídica, o inserto de prM/DENV-2 apresentou 97% de seus aminoácidos traduzidos idênticos à proteína original e 98% de similaridade. Já o inserto prM/DENV-3, a identidade aminoacídica foi de 76% e a similaridade de 86% com a proteína prM do vírus DENV-3. Como existe a possibilidade de prM/DENV-3 desempenhar melhor função de chaperona do que prM/DENV-2, foi feito também o alinhamento da seqüência destas duas proteínas, resultando em 71% de identidade nucleotídica entre os mRNAs e 70% de identidade e 84% de similaridade entre seus resíduos de aminoácidos. No alinhamento das seqüências dos dois insertos foi observado 70% de identidade na seqüência de nucleotídeos e 75% de identidade e 91% de similaridade entre as seqüências aminoacídicas. Estes dados evidenciam que as proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 expressas

pelos plasmídeos recombinantes apresentam maior proximidade entre si do que a encontrada entre as proteínas prM dos DENV-2 e DENV-3.

Os plasmídeos pCID2EtD2prM, pCID2EtD3prM e pCID2Et foram utilizados para imunização de camundongos para avaliação de indução da resposta imune induzida pelos candidatos vacinais.

No ELISA, após 3 inoculações, constatamos 40% a mais de anticorpos específicos contra a proteína E/DENV-2 nos animais vacinados com pCID2EtD3prM em relação àqueles inoculados com pCID2Et. No grupo vacinado com pCID2EtD2prM, os níveis de anticorpos não apresentaram aumento após duas ou mesmo três doses, o que também foi observado por Konishi, onde os animais foram inoculados três vezes com 200 µg de plasmídeo expressando prM/E do DENV-2 (Konishi et al., 2000).

No ensaio de linfoproliferação, a melhor resposta dos animais vacinados com pCID2EtD3prM foi mantida. Neste caso, a diferença foi mais evidente quando o estímulo se faz com o MOI de 0,1, onde a proliferação alcançou 280% a mais em relação ao pCID2Et e 194% em relação ao pCID2EtD2prM. Além do mais, ambas as construções contendo prM apresentaram melhores respostas de proliferação quando comparadas com o candidato pCID2Et. Estes resultados vão contra a teoria proposta por Rothman e colaboradores, que sugeria que os epítomos reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos estariam localizados na região C e não nas regiões prM e E (Rothman et al., 1993).

Foi observado após citometria de fluxo que a expressão de linfócitos T de memória foi maior nos grupos vacinados com plasmídeos apresentando a proteína prM. A indução da expressão de células T de memória foi ampliada

nos animais vacinados com pCID2EtD3prM, principalmente em relação à população TCD8⁺. Nos animais vacinados com o plasmídeo pCID2EtD3prM foi observado aumento de 32% na quantidade de células TCD8⁺ e 136% de aumento em relação às células TCD8⁺ de memória quando comparados com o grupo controle imunizado com pCID2Et. Quando comparado com o grupo inoculado com a construção pCID2EtD2prM, as quantidades de TCD8⁺ e TCD8⁺ de memória obtiveram aumento de 16% e 72%, respectivamente. No que tange à população de linfócitos TCD4⁺, também foi observado acréscimo de células de memória no grupo pCID2EtD3prM em relação aos demais. Os dados indicam aumento de 6% e 25% respectivamente nas quantidades de células TCD4⁺ e TCD4⁺ de memória para o grupo vacinado com o plasmídeo pCID2EtD2prM. Para a construção pCID2EtD3prM estes valores são de 12% e 50%, respectivamente.

Ainda discorrendo sobre o resultado da citometria de fluxo, temos que a população total de linfócitos T nos grupos vacinados com os plasmídeos pCID2EtD3prM e pCID2EtprD2M foram maiores 7% e 26% quando comparadas com o grupo pCID2Et. Konishi e colaboradores não observaram indução da expressão de células T de memória nos animais vacinados com a construção pcD2ME construída por eles, entretanto foram evidenciadas células B de memória responsivas ao vírus Dengue-2 (Konishi et al., 2000).

A análise do padrão de resposta imune induzida pelos plasmídeos vacinais demonstram predominância do perfil TH1, tendo em vista a alta expressão de INF- γ em detrimento da síntese de IL-4 e IL-10. Conforme ocorrido nos demais ensaios, a resposta dos grupos vacinados com os plasmídeos pCID2EtD3prM e pCID2EtD2prM foram maiores em relação ao

pCID2Et. Mais uma vez, observa-se que a expressão de INF- γ foi superior nos animais inoculados com pCID2EtD3prM, desta vez, tanto em relação ao vacinados com pCID2Et quanto àqueles inoculados com pCID2EtD2prM.

Baseados nos dados citados, é possível inferir que a proteína prM do vírus Dengue-3 possivelmente realiza de forma mais eficiente a função de auxiliadora do *folding* da proteína E, consequentemente, aumentando sua expressão e apresentação para as células TCD4⁺ e aprimorando, desse modo, a resposta imunológica.

IX. CONCLUSÕES

Diante do exposto, concluímos que:

- A clonagem dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no vetor vacinal pré-existente pCID2Et foi eficaz;
- A expressão da proteína E foi maior nas células transfectadas com o plasmídeo pCID2EtD3prM;
- Todos os animais inoculados com as construções plasmidiais apresentaram soroconversão, entretanto, a quantidade de anticorpos específicos para a proteína E foi maior naqueles imunizados com a construção plasmidial p CID2EtD3prM em relação ao plasmídeo pCID2EtD2prM;
- A quantidade de células CD8⁺ e CD8⁺ de memória foi maior nos animais imunizados com o plasmídeo pCID2EtD3prM em relação às demais construções plasmidiais;
- A resposta imunológica dos animais vacinados com os plasmídeos pCID2EtprMD3 e pCID2EtprMD2 foi melhor do que a dos animais vacinados com pCID2Et
- A introdução da proteína prM/DENV-3 resultou em melhor ativação do sistema imunológico quando comparada com a proteína prM/DENV-2

X. PERSPECTIVAS

Para dar continuidade a este trabalho, as próximas etapas terão como objetivos a análise de sobrevivência dos camundongos imunizados com os

plasmídeos recombinantes pós-desafio com vírus Dengue-2 e a dosagem de anticorpos neutralizantes induzidos nos animais vacinados contra este mesmo vírus.

VIII. GLOSSÁRIO

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 1. Anticorpos neutralizantes | Anticorpos capazes de se ligar e impedir a entrada do patógenos nas células-alvo. |
| 2. Auto-anticorpos | Anticorpos que reconhecem antígenos próprios |
| 3. Biobalística | Técnica que utiliza microprojéteis em alta |

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

4. CAP 5’

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

5. Cauda PoliA

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

6. Carga Viral

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

- 7. Choque Hipovolêmico** Forma de choque; uma condição onde o coração é incapaz de fornecer sangue suficiente para o corpo devido a perda de sangue, distúrbio circulatório ou volume sangüíneo inadequado.
- 8. Complemento** Proteínas solúveis no plasma que participam das defesas inatas e adquiridas do organismo.
- 9. DNA recombinante** Sequência de DNA artificial que resulta da combinação de diferentes seqüências de DNA, inclusive provenientes de diferentes tipos de organismos.
- 10.Domínio** Regiões específicas dentro de uma molécula protéica, geralmente responsáveis por funções específicas da molécula.
- 11.Envelope** Membrana que envolve o nucleocapsídeo de alguns vírus, composta basicamente de glicoproteínas e fosfolipídeos provenientes da membrana da célula hospedeira e proteínas virais.
- 12.Epítopo** Determinante antigênico. Parte da molécula imunogênica que é reconhecida pelo sistema imune. É a menor porção do antígeno com potencial de gerar a resposta imune.

13. Gene “repórter”	Gene que pode ser acoplado a outro gene de interesse, usados para determinar se esse gene de interesse está sendo expresso pela célula. Geralmente oferecem características que podem ser detectadas e quantificadas, como emissão de fluorescência.
14. Hepatomegalia	Aumento do tamanho do fígado
15. MOI	Multiplicidade de infecção. Quantidade de vírus por célula.
16. Morbidade	Estado do que é doente; debilitação da condição física do enfermo.
17. Nucleocapsídeo	Genoma viral recoberto por proteína capsidial
18. ORF	“Open Reading Frame”. Um fragmento de DNA que é transcrito em uma molécula única de RNA mensageiro, independentemente de codificar para um ou mais genes. Localiza-se entre uma sequência de iniciação (“start codon”) e uma sequência de terminação (“stop codon”).
19. Plasmídeos	Moléculas circulares duplas de DNA que se reproduzem independentemente do DNA cromossômico, aparecem principalmente em células bacterianas.

20. Quimera	Segmento de DNA que contém fragmentos provenientes de espécies ou cepas distintos.
21. Rash maculopapular	Manchas avermelhadas sobressaltadas na pele
22. Reatogenicidade	Aparecimento de efeitos colaterais em resposta à administração de algum imunógeno, como uma vacina.
23. Termolábel	Sensível a variações de temperatura
24. Trombocitopenia	Redução da contagem de plaquetas no sangue periférico (inferior a $150.000/\text{mm}^3$).
25. Virulência	Capacidade patogênia de um microorganismo, medida pela gravidade dos sintomas que produzem ou por seu poder de invadir os tecidos do hospedeiro.

XI. REFERÊNCIAS

1. Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Santiago, M. A., Gouvea, A. S., Santana, A. A., Neves-Souza, P. C., Nogueira, R. M., Miagostovich, M. P., and Kubelka, C. F. (2001). Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* **204**(4), 494-507.
2. Basu, A., and Chaturvedi, U. C. (2008). Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**(3), 287-99.
3. Bente, D. A., and Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models* **3**(1), 97-103.
4. Blair, P. J., Kochel, T. J., Raviprakash, K., Guevara, C., Salazar, M., Wu, S. J., Olson, J. G., and Porter, K. R. (2006). Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in Aotus nancymae monkeys. *Vaccine* **24**(9), 1427-32.
5. Bray, M., and Lai, C. J. (1991). Dengue virus premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response. *Virology* **185**(1), 505-8.
6. Brown, M. G., Huang, Y. Y., Marshall, J. S., King, C. A., Hoskin, D. W., and Anderson, R. (2009). Dramatic caspase-dependent apoptosis in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells. *J Leukoc Biol* **85**(1), 71-80.
7. Brown, M. G., King, C. A., Sherren, C., Marshall, J. S., and Anderson, R. (2006). A dominant role for FcγRII in antibody-enhanced

- dengue virus infection of human mast cells and associated CCL5 release. *J Leukoc Biol* **80**(6), 1242-50.
8. Chang, G. J., Hunt, A. R., Holmes, D. A., Springfield, T., Chiueh, T. S., Roehrig, J. T., and Gubler, D. J. (2003). Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. *Virology* **306**(1), 170-80.
 9. Cohen, S., Powell, C. J., Dubois, D. R., Hartman, A., Summers, P. L., and Eckels, K. H. (1990). Expression of the envelope antigen of dengue virus in vaccine strains of Salmonella. *Res Microbiol* **141**(7-8), 855-8.
 10. Costa, S. M., Azevedo, A. S., Paes, M. V., Sarges, F. S., Freire, M. S., and Alves, A. M. (2007). 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* **358**(2), 413-23.
 11. Costa, S. M., Freire, M. S., and Alves, A. M. (2006). DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* **24**(21), 4562-4.
 12. De Paula, S. O., Lima, D. M., de Oliveira Franca, R. F., Gomes-Ruiz, A. C., and da Fonseca, B. A. (2008). A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *Arch Virol* **153**(12), 2215-23.

13. Deubel, V., Bordier, M., Megret, F., Gentry, M. K., Schlesinger, J. J., and Girard, M. (1991). Processing, secretion, and immunoreactivity of carboxy terminally truncated dengue-2 virus envelope proteins expressed in insect cells by recombinant baculoviruses. *Virology* **180**(1), 442-7.
14. Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W., and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* **15**, 617-48.
15. Fonseca, B. A., Pincus, S., Shope, R. E., Paoletti, E., and Mason, P. W. (1994). Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* **12**(3), 279-85.
16. Gubler, D. J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* **10**(2), 100-3.
17. Guirakhoo, F., Kitchener, S., Morrison, D., Forrat, R., McCarthy, K., Nichols, R., Yoksan, S., Duan, X., Ermak, T. H., Kanesa-Thanan, N., Bedford, P., Lang, J., Quentin-Millet, M. J., and Monath, T. P. (2006). Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin* **2**(2), 60-7.
18. Guirakhoo, F., and Roehrig, J. T. (1992). The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* **191**(2), 921-31.

19. Gurunathan, S., Klinman, D. M., and Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* **18**, 927-74.
20. Gurunathan, S., Wu, C. Y., Freidag, B. L., and Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* **12**(4), 442-7.
21. Guzman, M. G., and Kouri, G. (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* **2**(1), 33-42.
22. Halstead, S. B. (2007). Dengue. *Lancet* **370**(9599), 1644-52.
23. Halstead, S. B., Heinz, F. X., Barrett, A. D., and Roehrig, J. T. (2005). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine* **23**(7), 849-56.
24. He, R. T., Innis, B. L., Nisalak, A., Usawattanakul, W., Wang, S., Kalayanarooj, S., and Anderson, R. (1995). Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *J Med Virol* **45**(4), 451-61.
25. Heinz, F. X., Allison, S. L., Stiasny, K., Schalich, J., Holzmann, H., Mandl, C. W., and Kunz, C. (1995). Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* **13**(17), 1636-42.
26. Henchal, E. A., McCown, J. M., Burke, D. S., Seguin, M. C., and Brandt, W. E. (1985). Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* **34**(1), 162-9.

27. Konishi, E., Fujii, A., and Mason, P. W. (2001). Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. *J Virol* **75**(5), 2204-12.
28. Konishi, E., and Mason, P. W. (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* **67**(3), 1672-5.
29. Konishi, E., Terazawa, A., and Fujii, A. (2003). Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice. *Vaccine* **21**(25-26), 3713-20.
30. Konishi, E., Yamaoka, M., Khin Sane, W., Kurane, I., and Mason, P. W. (1998). Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *J Virol* **72**(6), 4925-30.
31. Konishi, E., Yamaoka, M., Kurane, I., and Mason, P. W. (2000). A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* **18**(11-12), 1133-9.
32. Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., and Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**(5), 717-25.

33. Kurosu, T., Chaichana, P., Yamate, M., Anantapreecha, S., and Ikuta, K. (2007). Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* **362**(4), 1051-6.
34. Lei, H. Y., Yeh, T. M., Liu, H. S., Lin, Y. S., Chen, S. H., and Liu, C. C. (2001). Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* **8**(5), 377-88.
35. Lindenbach, B. D., and Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* **59**, 23-61.
36. Lindenbach, B. D., Rice, C.M. (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication. In **"Fields Virology"** (Lippincott Williams and Wilkins, Ed.), pp. 991-1041.
37. Liu, W. T., Lin, W. T., Tsai, C. C., Chuang, C. C., Liao, C. L., Lin, H. C., Hung, Y. W., Huang, S. S., Liang, C. C., Hsu, H. L., Wang, H. J., and Liu, Y. T. (2006). Enhanced immune response by amphotericin B following NS1 protein prime-oral recombinant Salmonella vaccine boost vaccination protects mice from dengue virus challenge. *Vaccine* **24**(31-32), 5852-61.
38. McBride, W. J., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* **2**(9), 1041-50.
39. McDonnell, W. M., and Askari, F. K. (1996). DNA vaccines. *N Engl J Med* **334**(1), 42-5.
40. Men, R. H., Bray, M., and Lai, C. J. (1991). Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell

- surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. *J Virol* **65**(3), 1400-7.
41. Ocazionez , R., and Fonseca , B. A. (2000). Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice. *Vaccine* **19**(6), 648-54.
 42. Perera, R., and Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* **11**(4), 369-77.
 43. Rothman, A. L., Kurane, I., Lai, C. J., Bray, M., Falgout, B., Men, R., and Ennis, F. A. (1993). Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* **67**(2), 801-6.
 44. Simantini, E., and Banerjee, K. (1995). Epitope mapping of dengue 1 virus E glycoprotein using monoclonal antibodies. *Arch Virol* **140**(7), 1257-73.
 45. Tan, G. K., and Alonso, S. (2009). Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. *Curr Opin Infect Dis* **22**(3), 302-8.
 46. Ulmer, J. B., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Donnelly, J. J., Friedman, A., Montgomery, D. L., Yawman, A. M., Orme, I. M., Denis, O., Content, J., Huygen, K., and Liu, M. A. (1997). Induction of immunity by DNA vaccination: application to influenza and tuberculosis. *Behring Inst Mitt*(98), 79-86.
 47. Wang, S., He, R., Patarapotikul, J., Innis, B. L., and Anderson, R. (1995). Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology* **213**(1), 254-7.

48. Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., and Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* **5**(7), 518-28.
49. Wilder-Smith, A., and Gubler, D. J. (2008). Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am* **92**(6), 1377-90, x.
50. Wolff, J. A., Dowty, M. E., Jiao, S., Repetto, G., Berg, R. K., Ludtke, J. J., Williams, P., and Slautterback, D. B. (1992a). Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci* **103 (Pt 4)**, 1249-59.
51. Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., and Jani, A. (1992b). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* **1**(6), 363-9.
52. Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G., and Kuhn, R. J. (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* **10**(11), 907-12.
53. Zhao, B. T., Prince, G., Horswood, R., Eckels, K., Summers, P., Chanock, R., and Lai, C. J. (1987). Expression of dengue virus structural proteins and nonstructural protein NS1 by a recombinant vaccinia virus. *J Virol* **61**(12), 4019-22.
54. Zhu, W., Qin, C., Chen, S., Jiang, T., Yu, M., Yu, X., and Qin, E. (2007). Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein

derived from an infectious full-length cDNA clone. *Virus Res* **126**(1-2), 226-32.

Rice, 2003).

2.1.2. Aspectos Morfológicos das Partículas Virais

Micrografias eletrônicas revelam que os vírions são caracterizados por uma superfície relativamente lisa, com diâmetro de aproximadamente 500 Å e um núcleo elétron-denso envolto por uma bicamada lipídica (Lindenbach, 2001)

Mais recentemente foi demonstrado que em sobrenadantes de células infectadas são encontradas partículas virais maduras e imaturas com diâmetros de 50 nm e 60 nm respectivamente. Ambos os tipos de partículas são constituídas de uma camada externa de glicoproteínas ancoradas a uma bicamada lipídica mais interna de cerca de 10 nm de espessura derivada da célula hospedeira. Interiormente a esta camada lipídica existe um núcleo elétron-denso formado por uma cadeia de RNA fita simples complexada com múltiplas cópias de uma proteína de caráter básico, formando um nucleocapsídeo (Kuhn et al., 2002; Perera and Kuhn, 2008).

Apesar da aparência exterior esférica, imagens de microscopia crio-eletrônica (cryo-electron microscopy - cryo-EM) revelam que o envelope

lipídico viral é poligonal, sendo que as proteínas a ele ancoradas formam os vértices do polígono (Zhang et al., 2003).

A concha glicoprotéica que reveste a partícula externamente está bem caracterizada e consiste de 180 cópias das proteínas E e prM/M. Estas proteínas apresentam diferentes conformações nas partículas maduras e imaturas, conferindo características intrínsecas a estas partículas durante o processo de maturação viral (Kuhn et al., 2002).

Nas partículas imaturas as proteínas prM/E formam 90 heterodímeros que se projetam na forma de 60 espículas triméricas para o exterior da bicamada lipídica. Nos vírions maduros, a proteína E se estende na forma de 90 homodímeros na superfície da partícula viral formando uma concha protéica de aspecto liso (Perera and Kuhn, 2008).

A transição estrutural da forma imatura (espículas projetadas) para a madura (superfície lisa) ocorre durante o trânsito da partícula através da rede Trans Golgi, e é dirigida predominantemente por alterações na conformação de E, conforme descrito no item Estrutura Genômica e Ciclo Replicativo (Lindenbach and Rice, 2003)

2.1.3. Estrutura genômica e ciclo replicativo

O genoma viral é constituído por uma molécula de RNA fita simples polaridade positiva de aproximadamente 11Kb, que funciona como RNA mensageiro após a entrada do genoma do vírus no citosol. Contem um CAP 5' mas não apresenta cauda poliA. Possui uma única ORF que codifica uma poliproteína precursora, que é posteriormente processada por proteases virais e celulares, dando origem a três proteínas estruturais C, prM e E

(capsidial, precursor de membrana e envelope, respectivamente) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Liu et al., 2006) (Lindenbach, 2001).

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

A importância das ligações S-S na conformação de E e na indução de anticorpos neutralizantes foi comprovada quando a proteína E reduzida foi incapaz de induzir a resposta imune em camundongos. Demonstrou-se também que alguns epítomos de E requerem a co-expressão de prM para que a conformação correta de E seja mantida durante a maturação, o que explica a incapacidade de células transformadas expressando somente E induzirem a resposta imune de forma eficiente e reprodutível em camundongos (Halstead et al., 2005; Kuhn et al., 2002)

Os *Flavivirus* entram nas células hospedeiras através da interação de sua proteína de envelope com moléculas de superfície das membranas celulares, e já foi demonstrado que anticorpos neutralizantes específicos para esta proteína são capazes de inibir a entrada das partículas virais nas células hospedeiras (He et al., 1995; Simantini and Banerjee, 1995). Para

adentrar as células, os vírus *Dengue* podem utilizar múltiplos receptores, sendo que apenas a menor parte é identificada como “dengue específicos”. Moléculas DC-SIGN e receptores tipo GAG podem ser a primeira linha de receptores utilizados pelos vírus *Dengue*, já que grande parte dos vírus se liga a tais moléculas. A segunda linha, ou os receptores “Dengue vírus-específicos” ainda não foram identificados, entretanto considera-se que estes devam interagir com o Domínio III da proteína E (Halstead et al., 2005).

Os vírus da dengue são capazes de se replicar em diversos tipos celulares. As células das linhagens monocíticas têm sido apontadas desde o princípio como os principais alvos da replicação viral. Antígenos virais têm sido encontrados em células de Kupffer, macrófagos alveolares, fagócitos mononucleares da pele e monócitos circulantes (Guzman and Kouri, 2002). Estudos indicam que DENV em estado imaturo infectam as células dendríticas e de Langerhans, podendo estas servir de sítios de replicação no início da infecção.

2.1.4. Transmissão

Os *Dengue* vírus são transmitidos principalmente pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, caracterizando-se por ser predominantemente urbano em sua distribuição. É encontrado geograficamente entre 30° de latitude norte e 20° de latitude sul. Esta localização é altamente relacionada com as regiões onde se encontram as maiores incidências da dengue (Rico-Hesse, 1997). Após picar e alimentar-se de um indivíduo infectado durante a fase de viremia que pode ser de 4 a 5 dias após a entrada do vírus no

indivíduo, o mosquito adquire e poderá transmitir o vírus a outras pessoas enquanto se multiplica no interior de suas glândulas salivares. O *A. aegypti* infectado torna-se capaz de transmitir o vírus durante toda sua vida através inclusive da infecção transovariana de sua progênie (McBride and Bielefeldt-Ohmann, 2000).

2.2. A Doença

2.2.1. Sintomatologia e Diagnóstico

As manifestações da dengue variam desde infecções assintomáticas até quadros graves de doença hemorrágica. A dengue clássica é uma doença febril acompanhada de mialgia, cefaléia, dor retro-orbital e rash maculopapular. No entanto, a infecção pode resultar em um quadro mais severo apresentando hemorragias, trombocitopenia, hepatomegalia, desequilíbrios homeostáticos que podem evoluir para um choque hipovolêmico (Bente and Rico-Hesse, 2006).

A patologia da dengue hemorrágica não está ainda totalmente estabelecida, existindo algumas teorias que tentam esclarecê-la. Uma das mais aceitas na comunidade científica é a teoria de “antibody dependent enhancement (ADE)”, ou aumento da infecção dependente de anticorpos, segundo a qual indivíduos previamente infectados por um sorotipo do *Dengue* e reinfectados com um sorotipo distinto do primeiro são mais propensas a desenvolver a forma hemorrágica da doença (Wang et al., 1995). Anticorpos produzidos em decorrência de uma infecção anterior com o sorotipo diferente seriam capazes de se ligar aos epítomos do vírus causador da segunda infecção sem, no entanto, conseguir neutralizá-lo.

Seriam deste modo, formados complexos vírus-anticorpos não neutralizantes. Estes complexos seriam então capazes de aumentar a eficiência da infecção viral (Azeredo et al., 2001). Como resultado, a ativação de linfócitos T cresce pronunciadamente, refletindo um maior nível de apresentação de antígeno, maior frequência de células T específicas para os DENV numa infecção secundária, e a ativação e proliferação mais rápidas de células T de memória. Essas células T produzem citocinas como o IFN- γ , IL-2 e TNF- α , e lisam monócitos infectados pelo DENV. O TNF- α é também produzido pelos monócitos ativados. Experimentalmente, este fenômeno tem sido relacionado com o aumento da produção de quimiocinas e citocinas vasoativas, e com a indução de apoptose caspase-dependente em mastócitos (Brown et al., 2009; Brown et al., 2006). Ainda como consequência do aumento da infecção viral, as proteínas do complemento são sobremaneira ativadas por complexos vírus-anticorpo, assim como por diversas citocinas, a liberar C3a e C5a, que por sua vez também têm efeitos diretos na permeabilidade vascular. Os efeitos sinérgicos de IFN- γ , TNF- α e das proteínas do complemento ativadas desencadeiam um extravazamento de plasma sangüíneo entre as células endoteliais numa infecção secundária pelo vírus dengue. Entretanto, vários aspectos permanecem ainda não explicados por essa teoria. Por exemplo, nem todos os casos de dengue hemorrágica são causados por infecções secundárias. A ativação do complemento pode ser resultado de doença severa, e não a causa da doença hemorrágica (Lei et al., 2001).

O “enhancement” também pode resultar da resposta de células T durante infecções secundárias heterólogas, onde o aumento da

apresentação dos antígenos da dengue aos linfócitos T acarreta uma grande ativação e proliferação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, e a conseqüente liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (Tan and Alonso, 2009).

Circunstâncias não relacionadas com o aumento da infecção (“non-enhancement”) também ajudam a explicar as formas graves de dengue. A instalação de formas mais severas da doença pode estar relacionada com a produção de anticorpos com capacidade auto-reativa direcionados contra a proteína viral NS1 (Tan and Alonso, 2009). Corroborando esta teoria, experimentos de análise proteômica demonstraram diversos autoantígenos nas células endoteliais passíveis de reconhecimento por anticorpos anti-NS1 (Basu and Chaturvedi, 2008).

Um outro enfoque em estudo é a relação entre a NS1 e a indução do complemento. Tanto a proteína quanto os anticorpos anti-NS1 têm sido largamente relacionados com a ativação do complemento. Além do mais, a formação de complexos entre a NS1 e a proteína clusterina, inibidora do complemento interfere no controle da atividade deste componente do sistema imunológico, contribuindo para o aumento do extravasamento de plasma (Kurosu et al., 2007; Tan and Alonso, 2009).

Por fim, a virulência da cepa viral é uma hipótese alternativa para a produção de doença hemorrágica pelos DENV. As diferentes intensidades de manifestações (desde a forma clássica da dengue até a doença hemorrágica e síndrome de choque) podem ser causadas por variantes dos DENV com diferentes graus de virulência. Aparentemente, também o alto título de carga viral contribui para o aparecimento da doença hemorrágica, e pode ser reflexo da maior virulência da cepa viral. O risco de doença

hemorrágica em infecções secundárias parece ser mais alto para o sorotipo 2 em comparação com os outros (Lei et al., 2001)

2.2.2. Prevenção e Tratamento

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

Enquanto uma vacina contra a dengue não estiver disponível, a única forma de reduzir as infecções será o controle do mosquito vetor, prática que tem se mostrado sobremaneira ineficiente, haja vista a crescente incidência da dengue observada nos últimos 5 anos. Desse modo, devido à importância adquirida pela doença ao considerar-se sua morbidade, mortalidade e grande distribuição mundial o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o DENV tem sido considerado de alta prioridade pela Organização Mundial de saúde - OMS (Costa et al., 2007; Gubler, 2002).

Uma vez que ainda não há a disponibilidade de um tratamento antiviral e tendo em vista a ineficiência do controle do mosquito vetor, os esforços de vários grupos de pesquisa em todo mundo têm se voltado para a busca de uma vacina que previna eficazmente a infecção por esses vírus.

Neste ínterim, diferentes tipos de estratégias têm sido avaliadas envolvendo desde os métodos mais clássicos de confecção de candidatos vacinais, como a atenuação viral clássica, até métodos para a expressão de

antígenos virais recombinantes em vetores de expressão. Entretanto, até então, esses esforços não têm obtido sucesso na produção de um candidato vacinal que seja capaz de produzir imunidade protetora duradoura (Guzman and Kouri, 2002).

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

Wuyang Zhu e colaboradores conduziram um estudo no qual foram construídos vírus atenuados através da deleção de partes da cauda hidrofóbica da proteína Capsidial envolvidas na montagem das partículas

virais infecciosas. Seus resultados mostraram que os vírus foram capazes de induzir uma alta produção de anticorpos em camundongos e naquelas partículas com maiores deleções, a indução da produção de anticorpos foi consideravelmente reduzida, indicando uma possível alternativa para atenuação viral e produção de vacinas eficazes contra o vírus *Dengue* (Zhu et al., 2007).

Outra alternativa buscada é a criação de vacinas de subunidades utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Antígenos virais tais como as proteínas E e NS1 têm sido produzidos em sistemas de expressão a fim de se construir uma vacina de subunidade. Nesses casos, a maioria das preparações induziu produção de anticorpos de média à alta eficiência em camundongos imunizados (Whitehead et al., 2007).

A expressão de proteínas prM, E e NS1 do vírus *Dengue* por baculovírus (Deubel et al., 1991), pelo vírus da vaccinia (Fonseca et al., 1994) e pela *Salmonella typhimurium* (Cohen et al., 1990) também têm sido utilizadas, entretanto, os resultados não são coerentes, existindo na literatura uma discrepância em relação aos dados obtidos nos experimentos de análise da eficácia de tais vacinas, já que alguns estudos mostram a presença de títulos adequados de anticorpos neutralizantes mas com baixa sobrevivência em experimentos de desafio dos animais imunizados com cepas virulentas (Fonseca et al., 1994; Men, Bray, and Lai, 1991). Outros relatam proteção contra o desafio com as cepas virulentas, porém descrevem ausência de anticorpos neutralizantes que na verdade, são os responsáveis pela proteção contra a infecção viral (Bray and Lai, 1991; Zhao et al., 1987). Isto pode ser explicado em parte, pelo fato de que o *Dengue* não tem um modelo

animal confiável, onde os resultados de proteção pós-vacinal sejam reprodutíveis. Além disso, a via de inoculação das cepas virulentas nos experimentos de desafio é a via intra-cerebral, o que é uma via artificial no caso dos vírus *Dengue*, pois estes vírus raramente causam encefalite. Wen-Tssann Liu e colaboradores (Liu et al., 2006) construíram uma vacina recombinante utilizando uma cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* expressando a proteína não estrutural NS1 do vírus Dengue-2. No entanto, os resultados mostraram que esta construção não obteve êxito em conferir proteção efetiva em camundongos vacinados oralmente e posteriormente desafiados com o vírus dengue-2. Testes subsequentes demonstraram que a co-administração de anfotericina B e a vacina recombinante mudaram este quadro, levando ao desenvolvimento de imunidade em camundongos co-inoculados. Entretanto, o uso do vírus da vaccinia como vetor tem sido associado ao aparecimento de reações adversas e efeitos colaterais que normalmente são de baixa severidade, mas podem levar a óbito (Liu et al., 2006).

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

antigênicos capazes de induzir resposta imune protetora (Gurunathan, Klinman, and Seder, 2000; Gurunathan et al., 2000).

As vacinas de DNA consistem de um plasmídeo bacteriano que possui características de vetores para expressão *in vitro*, visando à expressão de genes dos vírus *Dengue in vivo*. Estes plasmídeos incluem uma origem de replicação disponível para sua produção na bactéria, um gene de resistência a antibiótico que auxilia na seleção da bactéria transformada com o plasmídeo e seqüências promotora e de poliadenilação/término do RNA mensageiro para direcionar a expressão da proteína em células de mamíferos. Após transfecção com o plasmídeo recombinante, a célula processa o gene, e a proteína viral sintetizada é submetida às vias de processamento existentes no interior da célula. O resultado deste processo inclui o transporte de peptídeos imunogênicos até a membrana celular, ligados a moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade – classe I/II (MHC-I/II), e a secreção da proteína no espaço extracelular. Essa localização celular da proteína expressa permite a ativação do sistema imune produzindo-se uma resposta de tipo celular e humoral (Donnelly et al., 1997; McDonnell and Askari, 1996; Ulmer et al., 1997). A demonstração de que inoculação direta com DNA plasmidial pode estimular imunidade protetora, tanto celular quanto humoral, promete transformar este método numa poderosa estratégia para o desenvolvimento de vacinas.

Assim, uma nova forma de vacinação, a vacina de DNA, está atualmente sob intensa investigação no que concerne à imunização contra a dengue. Ela utiliza um DNA que contém o gene de interesse antigênico

inserido em um plasmídeo. A base teórica para um modelo de vacinação por moléculas de DNA reside no fato de que a transferência gênica direta de um DNA recombinante *in vivo* e *in vitro* resulta em expressão protéica (Donnelly et al., 1997; Gurunathan, Klinman, and Seder, 2000). Wolf e colaboradores demonstraram que a inoculação intramuscular de plasmídeos codificando genes repórter induzia a produção daquelas proteínas exógenas em células musculares sem a integração do DNA nas células hospedeiras (Wolff et al., 1992a; Wolff et al., 1992b).

A vacinação de DNA apresenta vantagens importantes em relação às outras vacinas. Essas seriam, em primeiro lugar, as capacidades de mimetização dos efeitos das vacinas atenuadas no que tange à indução da resposta imune celular e, em segundo, as vacinas de DNA poderiam ser produzidas em larga escala com redução da relação custo/benefício, além de serem de fácil estocagem e aplicação. Entretanto, algumas questões têm sido levantadas em relação ao uso deste tipo vacinal. Estas incluem, principalmente, a possibilidade dos plasmídeos se integrarem no cromossomo do hospedeiro e induzirem respostas imunes contra as células transfectadas, gerando respostas auto-imunes. Até o momento não existe nenhuma evidência de integração dos plasmídeos, e experimentos indicam que o nível de auto-anticorpos induzidos pela vacina de DNA é incapaz de dar início a um processo de auto-imunidade (Gurunathan, Klinman, and Seder, 2000).

A introdução do DNA dentro das células do receptor é feita por injeção intramuscular ou através de micro-partículas de ouro cobertas com o DNA recombinante (biobalística), que são injetadas no músculo por um

revólver de imunização (“gene guns”). Este método de imunização genética baseia-se na capacidade das células em receber, incorporar e expressar DNA exógeno, diferente do DNA celular (Gurunathan et al., 2000).

Costa e colaboradores construíram plasmídeos recombinantes expressando a proteína NS1 do vírus Dengue-2 e obtiveram resultados satisfatórios em experimentos de imunização e desafio de camundongos (Costa et al., 2007; Costa, Freire, and Alves, 2006).

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

Em um estudo realizado por nosso grupo foram construídos plasmídeos expressando as proteínas prM/E do vírus Dengue-3. Dos plasmídeos obtidos, três foram analisados *in vivo* a fim de determinar suas capacidades de induzirem resposta imune em camundongos. Todos os animais inoculados com as construções desenvolveram anticorpos neutralizantes e apresentaram linfoproliferação após estímulo específico. Após imunização e desafio com vírus Dengue-3, os animais apresentaram maior taxa de sobrevivência em relação ao controle, sendo que um dos plasmídeos conferiu 80% a mais de proteção, em relação ao grupo controle não imunizado. Estes resultados indicam que este último plasmídeo figura como bom candidato vacinal, capaz de induzir imunidade duradoura e proteção contra o desafio com Dengue-3 em camundongos (De Paula et al., 2008).

Ocazonez e Fonseca (Ocazonez e Fonseca, 2001) construíram um plasmídeo recombinante expressando a proteína do Envelope viral de Dengue-2 sem a expressão concomitante de prM. Testes bioquímicos demonstraram que a proteína E foi corretamente expressa, no entanto, não foram encontradas em boa concentração no sobrenadante, indicando que a expressão apesar de correta não foi eficiente. Testes imunológicos avaliaram a capacidade de indução da resposta imune do plasmídeo vacinal e de proteção de camundongos contra desafio com Dengue-2. Os resultados indicaram que camundongos inoculados intramuscularmente com o plasmídeo não produziram anticorpos anti-E e nem houve proliferação de células linfóides. Apesar destes resultados, houve um aumento de 20% nas taxas de sobrevivência e morbidade dos animais imunizados. Tais observações levam a crer que a baixa proteção dos animais pode ser explicada pela leve ativação do sistema imunológico decorrente da secreção ineficiente de E. Esta deficiência na secreção de E pode ser devida a ausência da co-expressão da proteína prM, sabidamente envolvida nos processos de maturação do vírus e dobramento correto de E. Desse modo, é possível que a ausência da proteína prM no plasmídeo recombinante tenha prejudicado os eventos de síntese e processamento de E, levando a uma redução na sua expressão, ou acarretando a modificação de algumas de suas características biológicas envolvidas na indução de resposta imune, ou ambos os fatores.

Assim, os resultados obtidos nos experimentos supracitados justificam o aprimoramento deste candidato vacinal através da inserção do gene de prM no mesmo.

XII. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Construir um novo candidato vacinal pCID2Et por meio da inserção dos genes prM/DENV-2 ou prM/DENV-3, criando assim, dois plasmídeos diferentes e realizar uma análise comparativa entre a eficiência de cada plasmídeo na indução do sistema imune de camundongos imunizados.

3.2. Objetivos específicos

- Amplificar os genes de prM/DENV-2 e prM/DENV-3.
- Clonar os genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 em vetor de clonagem (pGEM-T, Promega Corporation).
- Clonar os genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 em vetor de expressão (pCID2Et) já modificado para expressão da proteína E truncada de DENV-2.
- Selecionar os clones recombinantes.
- Proceder à análise imunológica dos plasmídeos recombinantes em animais imunizados.

XIII. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Células e plasmídeos

Células C6/36 (oriundas de *Aedes albopictus*) foram mantidas a 28°C em meio L15 (meio Leibovitz) suplementado com 10% de triptose, 10% de soro fetal bovino inativado e L-glutamina. As células Vero foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, antibióticos e fungizona. As células utilizadas para transformação bacteriana foram da cepa *E.coli* DH5α competentes já em uso no Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM).

Plasmídeos de clonagem pGEM-T foram adquiridos junto à Promega Corporation, Madison, Wisconsin e posteriormente acrescidos dos genes de prM/DENV-2 ou prM/DENV-3.

O vetor pCID2Et foi construído em um trabalho anterior através da inserção do gene que codifica a proteína E truncada do vírus Dengue-2 cepa New Guinea C em plasmídeo de expressão pCI Vector (Promega Corporation) entre os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* (“upstream”) e *KpnI* (“downstream”). Os plasmídeos pCI Vector originalmente modificados contêm uma potente região promotora (“enhancer”) derivada do citomegalovírus (CMV), um íntron quimérico, um sinal de poliadenilação proveniente do Simian Virus 40 (SV40) e uma região contendo um “polycloning site”. Também possuem sequências de dinucleotídeos não

metilados ligados por ligações fosfodiéster (motivos cistidina-fosfato-guanosina, ou CpG) (Gurunathan, Klinman, and Seder, 2000; Gurunathan et al., 2000).

4.2. Estoques virais

4.2.1. Estoques Virais provenientes de cultura celular

Os vírus *Dengue* utilizados nesse trabalho são da cepa New Guinea C (DENV-2) e H87 (DENV-3), já em uso no Laboratório de Imunovirologia Molecular.

O estoque viral em cultivo celular foi produzido em células C6/36 crescidas em meio L15 contendo 10% de soro fetal bovino, com incubação a 28°C. Para tanto, garrafas de 25 cm³ contendo monocamadas confluentes de células C6/36 foram inoculadas com 25 µL de vírus Dengue-2 cepa New Guinea C e incubadas a 28°C por 7 dias. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi recolhido e armazenado em ultrafreezer à temperatura de -70°C. Uma Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) foi realizada para confirmar a positividade de cada sobrenadante de cultura celular.

4.2.3. Estoques Virais provenientes do macerado de cérebro de camundongo

Cem µL de vírus Dengue-2 cepa New Guinea C foram inoculados via intracerebral em camundongos Swiss recém-nascidos obtidos junto ao Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFV. Os animais

foram monitorados 3 vezes ao dia buscando sinais de encefalite viral. Após 5 dias de infecção com vírus DENV-2 e 7 dias com vírus DENV-3 os animais apresentaram os primeiros sintomas foram sacrificados e estocados a -70°C. Após 24 horas, os animais foram descongelados e o cérebro foi extraído com auxílio de seringa de insulina, macerado em solução PBS e centrifugado a 2500 x *g* a 4°C, por 10 min. Ao sobrenadante foi feita adição de soro fetal bovino para uma concentração final de 5%, e o mesmo foi estocado a -70°C. A presença do vírus foi confirmada por PCR.

4.3. Preparação dos RNAs e cDNAs virais

4.3.1. Extração do RNA

Células C6/36 foram infectadas com o vírus *Dengue* como descrito no item 3.2.1. O RNA total foi preparado por tratamento do sobrenadante do cultivo celular com TRIzol[®] (Invitrogen, CA, USA). Brevemente, foram homogeneizados 500 µL da amostra de sobrenadante de células ou de macerado de cérebro de camundongo com 750 µL de TRIzol[®] e a mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. A seguir foram adicionados 300 µL de clorofórmio agitando-se os tubos por 15 min manualmente e incubando-os a temperatura ambiente por mais 2 min. As amostras foram centrifugadas a 12000 x *g* por 15 min a uma temperatura de 4°C, após a qual a fase aquosa transparente foi separada e transferida para um outro tubo. Em seguida procedeu-se a adição de 350 µL de isopropanol, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min a fim de promover a precipitação do RNA e posteriormente submetidas à centrifugação por 10 min a uma temperatura de 4°C. Os precipitados foram lavados com 750 µL de etanol 75% gelado e foram mantidos a -70°C. Após

24 horas foi feita mais uma centrifugação (10 min, 7500 x g) e os precipitados foram secos a temperatura ambiente por 30 min. Após a secagem, os precipitados foram suspensos em 20 µL de água DEPC. Aproximadamente 10 µg de cada RNA total, obtidos conforme este protocolo, foram usados para sintetizar as primeiras fitas de cDNA, usando “primers” randômicos (Random Primers, Pharmacia®, São Paulo).

4.3.2. Confecção do cDNA

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

A 11µL do RNA foi adicionado 1µL do primer randômico (pd(N)₆) (Amersham-Pharmacia®, USA), submetidos a aquecimento a 70°C por minutos e colocado no gelo por 2 minutos, período após o qual as amostras foram centrifugadas a 13000 x g por 1 minuto. Rapidamente, foi adicionado uma mistura reacional contendo 4µL de 5X Reaction Buffer, 2µL dNTP, 1µL H₂O milliQ, seguindo-se da incubação a 37°C por 5 minutos. Decorrido este tempo foi feita adição de 1µL (200u) de transcriptase reversa. As amostras foram então primeiramente incubadas a 42°C por 60 minutos e depois a 70°C por 10 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

4.7. Amplificação dos genes prM

4.4.1. Construção dos *primers* para amplificação dos genes prM

Foram construídos dois pares de *primers* flanqueando a região dos genomas de DENV-2 e DENV-3 responsáveis pela codificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3. Esses iniciadores sintéticos foram construídos de forma a inserir nas fitas amplificadas sítios únicos de restrição para as

enzimas *XhoI* e *EcoRI*, as quais serão utilizadas posteriormente para a clivagem dos fragmentos amplificados assim como para a clonagem dos mesmos no vetor de expressão pCID2Et.

4.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase

Parte da amostra contendo a fita híbrida de RNA/cDNA foi amplificada empregando-se a técnica da PCR. Iniciadores sintéticos de DNA, flanqueando as regiões de interesse foram sintetizados e utilizados na amplificação das mesmas. A mistura reacional foi constituída de aproximadamente 100 ng do cDNA, 0,5 pmol/μL dos *primers sense* e *antisense*, 0,2 mM dNTPs, tampão 1X da enzima, 2,5 mM de MgCl₂ e 2,5U de Taq-DNA Polimerase, para um volume final de 25 μL. A amplificação do DNA foi feita em 35 ciclos, cada um contando com três etapas de um minuto de duração. A temperatura utilizada para separar as fitas de DNA foi de 94°C, a de ligação dos *primers* ao cDNA foi de 55°C e a de extensão do fragmento de DNA a ser amplificado, de 72°C. O resultado das amplificações foi detectado através de eletroforese em gel de agarose (Sigma®, St. Louis, MI), a 1,5%, corado com brometo de etídeo 1μg/mL, visualizado à luz ultravioleta e digitalizado pelo fotodocumentador Alpha DigiDoc (Sigma-Aldrich®, Alemanha).

4.4.3. Purificação dos amplicons

Os fragmentos de DNA amplificados corretamente foram separados em gel de agarose, recuperados e purificados com o Kit de Purificação de DNA a partir de gel de agarose (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System –

Materiais e Métodos bandas de 540 pb foram identificadas por coloração com brometo de etídeo, excisadas do gel e os fragmentos pesados. Para cada mg de gel foi adicionado 10 µL de Membrane Binding Solution, que após incubação à 65°C por 10 min, foi aplicada em uma coluna e centrifugada a 14000 x g por 1 minuto. Após duas lavagens com a solução *Membrane Wash Solution*, os DNAs foram eluídos da coluna por 50 µL de água ultrapura.

4.8. Ensaios de clonagem

4.5.1. Preparação de bactérias competentes para a transformação

Bactérias *E. coli* DH5α, previamente estocadas em nosso laboratório em meio LB/DMSO 10% (dimetilsulfóxido) foram semeadas em placas contendo LB/ágar 1,5% e incubadas a 37°C por 18 horas. Uma das colônias isoladas foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido para crescimento durante 18-20 horas a 37°C em agitação constante de 180 rpm, e então 0,5 mL desta cultura foi inoculado em 50 mL de meio LB para novo crescimento a 18°C. As bactérias foram colhidas em fase exponencial de crescimento, detectada quando a absorbância a 550 nm estava em aproximadamente 0,6 (OD 0,6). As bactérias foram então sedimentadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C, e em seguida suspensas em 0,5 volume de uma solução de CaCl₂ 50 mM. Após 2 horas de incubação em gelo, as bactérias foram novamente centrifugadas e o precipitado foi suspenso em 0,08 volume de solução tampão FSB (acetato de potássio 10 mM pH 7,5; MnCl₂.4H₂O 45 mM; CaCl₂.2 H₂O 10 mM; KCl 100 mM; glicerol 10%). Para armazenamento das bactérias em freezer -70°C foi adicionado DMSO a 10%. As bactérias

foram aliquotadas em volumes de 200 µL, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente estocadas a -70°C.

4.5.2. Clonagem dos genes prM no plasmídeo de clonagem pGEM-T

A ligação dos fragmentos de DNA purificados ao plasmídeo foi feita com a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Beverly, MA/Bioagency, São Paulo). A ligação foi realizada a 4°C durante 12 horas. Para a reação, foram utilizados 150 ng dos produtos amplificados e 50 ng de vetor pGEM-T numa reação de 10 µL que continha 5 µL da solução tampão 2X e 1 µL da enzima T4 ligase. O produto dessa reação foi utilizado para a transformação de células competentes pelo método do choque térmico.

4.5.3. Transformação de células *E. coli* DH5α

Para a transformação de células competentes com o produto da ligação, as alíquotas de células foram descongeladas em banho de gelo e 5 µL das reações de ligação foram adicionados às alíquotas, que foram mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram levadas ao banho-maria a 42°C por exatamente 30 segundos e rapidamente ao gelo novamente. A cada alíquota de células foram adicionados 800 µL de meio SOC, e subsequentemente incubadas a 37°C sob agitação constante de 150 rpm, por 1 hora. Após agitação, 50-100 µL de cada cultura foram semeados em placas contendo LB/ágar 1,5% contendo antibiótico (ampicilina 100 µg/mL) com auxílio de uma alça de Drigalski, até esgotar toda a suspensão na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas

(modificado de Sambrook et al,1989). As colônias obtidas nas placas de transformação foram processadas para isolamento do DNA plasmidial.

4.5.4. Análise do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas

Os plasmídeos recombinantes contendo cDNA viral foram identificados através de minipreparação de DNA plasmidial pelo método da lise alcalina. As bactérias isoladas das placas de transformação foram crescidas “overnight” em meio LB acrescido de ampicilina em rotação constante de 190 rpm. Em seguida, foi feita centrifugação das culturas por 1 min a 18000 x *g*. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 µL de solução de lise. Após 1 min a temperatura ambiente, seguiu-se a adição de 400 µL de uma solução alcalina fresca e os tubos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente e acrescidos de 300 µL de solução de acetato de amônio 7,5 M. Após um período de 10 min em banho de gelo seguido de uma centrifugação a 14000 x *g* por 3 min, o sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e feita adição de 0,6 V de isopropanol. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min e centrifugados a 14000 x *g* por 10 min para precipitação do DNA plasmidial. Os precipitados foram lavados com etanol 70% , secos a temperatura ambiente e suspensos em 50 µL de água ultrapura. Os plasmídeos foram analisados inicialmente através da Reação em Cadeia da Polimerase e confirmados por meio da análise dos produtos de digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* e purificados em colunas de separação de DNA. Após confirmação da presença dos plasmídeos recombinantes nos clones bacterianos, estes foram sequenciados pelo

Laboratório de Genômica - BIOAGRO/UFV, utilizando o seqüenciador automático MegaBACE™ 500 (GE Healthcare, Inglaterra).

4.5.5. Ensaio de restrição enzimática

Os plasmídeos recombinantes identificados foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. As reações foram realizadas conforme instruções do fabricante, para um volume final de 40 µl. A mistura reacional continha 1U de enzima por µg de DNA e tampão da enzima para uma concentração de 1X. O *mix* foi incubado a 37°C por 4 horas. Os fragmentos digeridos foram identificados por visualização sob luz ultravioleta depois de serem submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, a uma voltagem constante de 80V. Os fragmentos cujo tamanho correspondia ao esperado foram extraídos do gel e purificados em colunas de separação de DNA.

4.5.6. Clonagem dos genes prM no plasmídeo de expressão pCID2Et

Os plasmídeos pGEM-T recombinantes foram submetidos a digestão enzimática com *XhoI* e *EcoRI* de modo a liberar o inserto de prM. Os fragmentos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% a uma voltagem constante de 80V. Os fragmentos de 540 pb foram extraídos do gel e purificados em colunas de separação de DNA fazendo-se o uso do Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). O plasmídeo pCID2Et foi, de igual modo, digerido com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* e a banda correspondente àquela de

tamanho esperado foi excisada do gel e purificada com o Kit supracitado de ***Materiais e Métodos*** protocolo.

Para inserção do gene de prM no vetor de expressão, feita uma reação de ligação utilizando-se para tanto a enzima T4 ligase (New England Biolabs, Beverly, MA/Bioagency, São Paulo). A reação ocorreu a 4°C/12 horas e os produtos desta ligação foram usados para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α , com objetivo de se produzir clones de plasmídeos recombinantes que expressem a proteína prM e E dos vírus *Dengue*. A seguir foi feita a extração do DNA plasmidial das colônias obtidas e os plasmídeos recombinantes foram identificados pela Reação em Cadeia da Polimerase, para a qual foram usados os *primers* específicos para amplificação do gene de prM.

4.9. Avaliação dos plasmídeos vacinais

4.6.1. Imunização de Camundongos

Para avaliar a imunogenicidade da vacina aprimorada, quatro grupos de cinco camundongos Swiss, obtidos junto ao Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFV, foram inoculados intramuscularmente com 100 μ g dos plasmídeos vacinais (pCID2EtprMD3 e pCID2EtprMD2) e controle (pCID2Et) em intervalos de 15 dias, durante 45 dias. A primeira inoculação foi realizada quando os animais estavam com três semanas de vida. Antes de cada vacinação e 15 dias após a última imunização foi realizada coleta de sangue dos animais por punção do plexo retro-orbitário e o soro acondicionado a -70°C. As amostras de soro foram posteriormente agrupadas em *pools* e testadas para a presença de anticorpos específicos para os vírus da dengue e

para a reatividade da resposta imune celular. Seguidos 15 dias da última inoculação plasmidial, foi realizado o sacrifício dos animais para extração do baço a fim de dar início aos ensaios de proliferação e dosagem de citocinas. Os testes usados para estes fins são descritos a seguir.

4.6.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A fim de avaliar a presença de anticorpos específicos para a proteína E do vírus Dengue-2 no soro dos animais inoculados foi realizado um ensaio de ELISA indireto. Com esta finalidade, placas de fundo chato (Corning, México) foram sensibilizadas por 24 horas a 4°C com 5 µg da proteína E purificada diluída em tampão carbonato 0,1M pH 8,6, lavadas e bloqueadas com solução de PBS/albumina 3% pH 7,2 sob incubação a 37°C durante 60 min. Dez µL do soro dos animais foram diluídos em 100 µl de solução PBS 1% de Albumina e 25 µl/poço desta diluição adicionados na placa sensibilizada. Nesta etapa, a placa permaneceu por 2 horas a uma temperatura constante de 37°C, período após o qual foram realizadas 10 lavagens com PBS Tween 20 0,05% (PBS-T 0,05%) para a retirada dos anticorpos não reativos. Na próxima etapa foi feita a adição de um anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma-Aldrich, Alemanha) diluído a 1:200 em PBS 1X. Após 2 horas de incubação a 37°C, foram novamente realizadas 10 lavagens com PBS-T 0,05%, e o substrato Sigma FAST™ OPD (diidrocloreto de orto-fenilediamina) (Sigma-Aldrich, Alemanha), preparado conforme instruções do fabricante, foi adicionado a cada poço da placa. A placa foi incubada com o substrato até a observação de cor e procedeu-se à leitura das densidades óticas (OD) de cada amostra a 450 nm. Foram consideradas

positivas as amostras cujas ODs foram maiores do que a média das ODs dos controles negativos acrescidos de 2 desvios-padrão.

4.6.3. Obtenção das células do baço

Decorridos 15 dias da última inoculação, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical e os baços foram coletados em ambiente estéril e colocados em 5 ml de RPMI-16 incompleto com 2mM EDTA. Após homogeneização, os debrís foram retirados e a suspensão celular submetida à centrifugação durante 10 min a 1200g a 4°C. O precipitado contendo os esplenócitos e hemácias foi diluído em tampão de lise gelado (NH_4Cl 0,16M; Tris HCl 0,7M pH 7,5; EDTA 2mM) e incubado a temperatura ambiente por 4 minutos para lise das hemácias. Após 2 lavagens com meio RPMI-1640 incompleto seguidas de centrifugação o precipitado de esplenócitos foi suspenso em 3 ml de RPMI-1640 completo e as células contadas em câmara de Neubauer.

4.6.4. Ensaios de Proliferação

Para avaliação da linfoproliferação frente ao estímulo com o vírus Dengue-2 foi utilizado o protocolo de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). Neste ensaio, células extraídas do baço dos animais inoculados foram estimuladas com Dengue-2 a fim de verificar se há proliferação das mesmas. Para tanto, as células foram contadas e semeadas em placas de 96 wells na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/poço juntamente com 0,5 e 0,1 MOI do vírus. Para o controle negativo foi utilizado meio RPMI-1640 completo e para o controle positivo, a concavalina A ($0,2\mu\text{g/mL}$). Após 44 horas de cultura a 37°C foi feita adição de $5\mu\text{g/mL}$ de MTT em PBS, homogeneizado

por 5 min a 150 rpm e incubado a 37°C por 4 horas. O produto do metabolismo do MTT (formazan) foi suspenso em 200 µL de DMSO (Dimethyl sulfoxide), homogeneizado por 5 min a 150 rpm até completa solubilização. A leitura da absorbância foi feita a 560 nm. A densidade óptica é diretamente correlacionada com a quantidade de células viáveis.

4.6.5. Caracterização fenotípica de células do baço

Para avaliar a indução de células de memória e de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ pelos plasmídeos em estudo, foi realizada uma citometria de fluxo. Os anticorpos utilizados foram adquiridos junto à BD Pharmingen, NJ USA (anti-CD44-PE Cy5.5) e Caltag Laboratories, Thailand (anti-CD4-FITC e anti-CD8-FITC). Células extraídas do baço dos animais inoculados foram incubadas com uma mistura de anticorpos contendo anti-CD4/anti-CD44 ou anti-CD8/anti-CD44, para avaliar a expressão de linfócitos TCD4⁺ de memória ou TCD8⁺ de memória, respectivamente. Após 2h de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 x g/10 min e ressuspensas em PBS – Formol 1%. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo GUAVA (Guava EasyCyte Mini System, Millipore) e os dados analisados no software Guava CytoSoft 4.2.1.

4.6.6. Expressão de Citocinas

A expressão das citocinas que indicam estímulo da resposta imune celular Th-1 (interferon- γ) ou Th-2 (IL-4 e IL-10) foram realizadas por PCR em tempo real, utilizando-se para tanto iniciadores sintéticos específicos para amplificação dos genes de β -actina (controle endógeno), INF- γ , IL-4 e IL-10. A PCR foi realizada no Laboratório de Infectologia Molecular Animal –

BIOAGRO, utilizando o equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Após 3 imunizações, o baço dos animais imunizados foi extraído e processado. Uma alíquota de 5×10^6 células/poço foi semeada em placas de 24 poços e submetidas a estímulo com 0,5 e 0,1 MOI de vírus Dengue-2. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI-1640 completo e para o controle positivo as células foram estimuladas com Concanavalina A (ConA) na concentração 0,2 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas, período após o qual as células foram coletadas e processadas para extração do RNA e confecção do cDNA.

XIV. RESULTADOS

5.2. CONSTRUÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

5.2.1. Amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3

Após extração de RNA dos vírus DENV-2 (New Guinea C) e DENV-3 (H87), foi realizada a confecção do cDNA dos respectivos vírus. Este cDNA foi utilizado como molde em uma reação em cadeia da polimerase, utilizando os “primers” específicos para os genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3. A figura 1 demonstra a amplificação dos fragmentos prM/DENV-2 e prM/DENV-3.

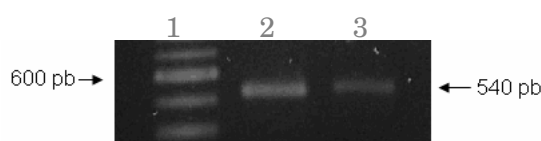


Figura 1. Amplificação dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3. Eletroforese dos produtos de amplificação dos cDNAs DENV-2 e DENV-3 em gel de agarose 0,8%. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador 100pb (100 pb DNA Ladder, Invitrogen, Califórnia, EUA), canaleta 2: banda de 540 pb referente à amplificação do gene prM/DENV-2, canaleta 3: banda de 540 pb referente à amplificação do gene prM/DENV-3.

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

Os fragmentos obtidos por PCR foram purificados conforme especificado na metodologia, e utilizados para ligação em plasmídeo de clonagem pGEM-T. A reação de ligação foi realizada a 4°C, e os produtos desta reação inseridos em bactérias *E. coli* DH5α ultracompetentes. As colônias transformadas foram selecionadas em meio contendo ampicilina e submetidas à extração de DNA plasmidial pelo método de lise alcalina. Conforme pode ser observado nas figuras 2 e 3, tanto os fragmentos de

prM/DENV-2 quanto os de prM/DENV-3 foram eficientemente clonados no plasmídeo pGEM-T. Foram selecionados para dar continuidade ao trabalho, os clones de número 51 (prM/DENV-2) e 13 (prM/DENV-3).

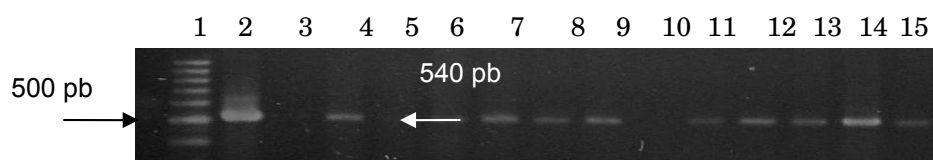


Figura 2. Clonagem de prM/DENV-2 em vetor pGEM-T. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos plasmídeos pGEM-T/prMDENV-2 extraídos das colônias selecionadas por resistência ao antibiótico ampicilina. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador 100 pb, canaleta 2: cDNA DENV-2 (controle positivo), canaleta 3: controle negativo. Nas canaletas 4, 6, 7, 8, 9, 11 a 15 as bandas com tamanho aproximado de 540 pb são correspondentes ao fragmento prM/DENV-2 amplificado.

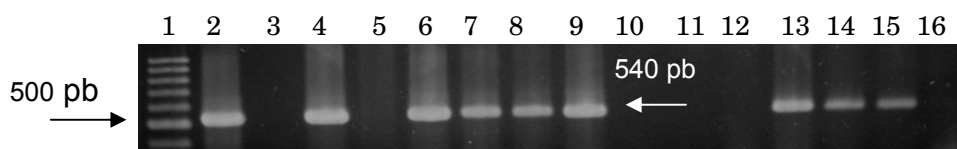


Figura 3. Clonagem de prM/DENV-3 em vetor pGEM-T. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos plasmídeos pGEM-T/prMDENV-3 extraídos das colônias selecionadas por resistência ao antibiótico ampicilina. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador 100 pb, canaleta 2: cDNA DEN-3 (controle positivo), canaleta 3: controle negativo. Nas canaletas 4, 6 a 9 e 13 a 15, as bandas com tamanho aproximado de 540 pb são correspondentes ao fragmento prM/DENV-3 amplificado.

5.2.3. Análise por sequenciamento dos fragmentos clonados

Os plasmídeos recombinantes obtidos após ligação dos amplicons no vetor pGEM-T foram enviados ao laboratório de Genômica - BIOAGRO/UFV, onde foi realizado o sequenciamento de ambos os clones, utilizando o seqüenciador automático MegaBACE™ 500 (GE Healthcare, Inglaterra). As seqüências obtidas foram analisadas através do alinhamento com as seqüências presentes no banco de dados NCBI.

Para análise da identidade dos fragmentos, a seqüência obtida foi alinhada através da ferramenta *Basic Local Alignment Tool* (BLAST). No BLASTn, para o clone 51 (pGEM-T-prM/DENV-2), foi obtida uma identidade de 98% do fragmento clonado com o gene codificante da proteína prM do vírus Dengue-2, com apenas 1% de *gaps* na seqüência. Já para o clone 13, referente ao gene da prM/DENV-3, o alinhamento demonstrou identidade de 96% com a seqüência do gene responsável por codificar a proteína prM do vírus Dengue-3, com 2% de *gaps*.

No BLASTx, em relação ao clone 51, sua seqüência traduzida obteve uma identidade de 97%, e uma similaridade de 98% com a proteína prM do vírus Dengue-2, não apresentando nenhum *gap*. Para o clone 13, a tradução de sua seqüência revelou que existia 76% de identidade, 86% de similaridade e apenas 1 *gap* em relação a seqüência aminoacídica da proteína prM do vírus Dengue-3.

Para acessar a proximidade entre as seqüências das proteínas prM de ambos os vírus, as mesmas foram alinhadas utilizando a ferramenta *BLAST two sequences*. Nos isolados selvagens, a identidade entre as seqüências codantes das proteínas prM dos vírus DENV-2 e DENV-3 é de

71%, apresentando 2% de *gaps*. Entretanto, apresentam 70% de seus resíduos de aminoácidos idênticos, e 84% de similaridade sem *gaps*.

A Última fase da análise das seqüências teve como objetivo verificar se os clones obtidos apresentavam os mesmos padrões em termos de similaridade e identidade observados nos genes selvagens. Em relação à seqüência nucleotídica, nossos clones acompanham o padrão de identidade dos isolados de ocorrência natural, 70% de identidade nucleotídica, com 3% de *gaps*. Entretanto, em termos de seqüências aminoacídicas, esta tendência se desloca para uma maior proximidade entre os genes clonados. Após a tradução e comparação das seqüências traduzidas de ambos os fragmentos, verificou-se uma identidade de 75% de seus resíduos aminoacídicos com 91% de similaridade e nenhum *gap*.

Tabela 1. Avaliação da similaridade de seqüências aminoacídicas das proteínas prM. (*Dados mostrados em valores percentuais).

	Identidade*	Similaridade*	“Gaps”*
pGEM-T/prMD2 vs prMDEN-2	97	98	0
pGEM-T/prMD3 vs prMDEN-3	76	83	1
prMDEN-2 vs prMDEN-3	70	84	0
pGEM-T/prMD2 vs pGEM-T/prMD3	75	91	0

```

CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment

prM2      -----CPLLQNEPEDIDC 14
prM3      TSRDGEFPMIVGEEKRKIPTFDSLWNQHVHSHGFGFDVHGQLTNAPTLPKWSLKTITA 60
              . * * : . : .

prM2      WCNSTSTWVTYGTCTTTGHRREKRSVALVPVHVGMLTTRTETWMSSEGAMKHAQRIETW 74
prM3      GATLHRTWVTYGACNQAGEHRRDKRSVALAPHVGMGLDTRTQTWMSAEGAMRQVEKVTW 120
              . .      * * * * * : * : * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

prM2      ILRHPGFTIMAAILAYTIGTTHFQRA 100
prM3      ALRHPG----- 126
              * * * * *

```

Figura 4. Comparação da seqüência aminoacídica das proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3. Alinhamento entre as duas seqüências de aminoácidos correspondentes às seqüências nucleotídicas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 para a detecção do grau de identidade entre ambas, realizada pelo programa “Clustal W”. Ferramentas no site: www.ebi.ac.uk/clustalw.

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

O próximo passo para possibilitar a inserção dos fragmentos de interesse no vetor vacinal pCID2Et, foi a clivagem enzimática do plasmídeo pCID2Et, assim como do fragmento contido no vetor de clonagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, cujos sítios de clivagem foram inseridos durante amplificação.

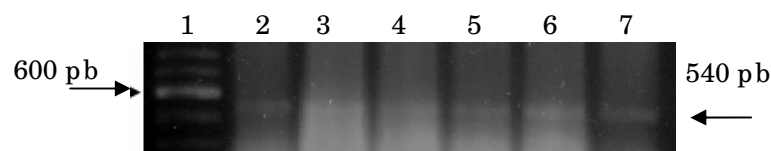


Figura 5. Mapa de restrição dos plasmídeos pGEM-T recombinantes. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos digeridos com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador λ *HindIII*, canaletas 2, 3 e 4: bandas de aproximadamente 540 pb, referentes ao fragmento prM/DENV-2 e

canaletas 5, 6 e 7: bandas de aproximadamente 540 pb, referentes ao fragmento prM/DENV-3.

Após digestão dupla, os produtos de clivagem foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (figura 5) e o plasmídeo pCID2Et em gel de agarose 0,8% (figura 6).

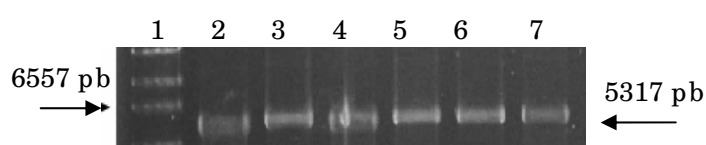


Figura 6. Mapa de restrição do plasmídeo pCID2Et. Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos plasmídeos pCID2Et digeridos com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador λ *HindIII*, canaletas 2 a 7: bandas de aproximadamente 5300 pb, referente ao plasmídeo pCID2Et digerido.

Dando prosseguimento aos experimentos para clonagem dos fragmentos de prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no pCID2Et, as bandas de 540 e as de 5300 pb foram excisadas do gel e utilizadas para purificação dos fragmentos. Finalizada a purificação dos produtos de digestão, estes foram utilizados em uma reação de ligação a fim de inserir o gene de prM no plasmídeo de expressão já modificado para expressão de E. Os clones recombinantes foram isolados em uma placa réplica e processados para extração do DNA plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram utilizados em reações de PCR para verificar a presença do inserto de interesse. Observando as figuras 7 e 8 é possível notar que tanto o fragmento

prM/DENV-2, quanto o prM/DENV-3 foram inseridos de modo eficiente no vetor vacinal.

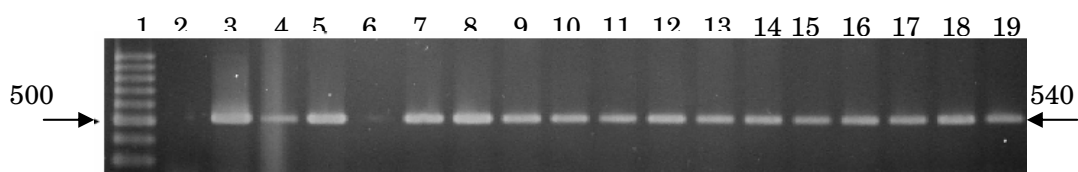


Figura 7. Inserção de prM/DENV-2 no plasmídeo pCID2Et. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos PCR dos plasmídeos pCID2Et/prM/DENV-2 recombinantes. Da esquerda para a direita: canaleta 1: marcador 100 pb, canaleta 2: controle negativo, canaleta 3: controle positivo, canaletas 4 e 5, 7 a 19: bandas de aproximadamente 540 pb, referentes ao inserto prM/DENV-2.



Figura 8. Inserção de prM/DENV-3 no plasmídeo pCID2Et. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos PCR dos plasmídeos pCID2Et/prM/DENV-3 recombinantes. Da esquerda para a direita: : canaleta 1: marcador 100 pb, canaleta 2: controle negativo, canaleta 3: controle positivo, canaletas 9, 12 e 13: bandas de aproximadamente 540 pb, referentes ao inserto prM/DENV-3.

Os plasmídeos vacinais aprimorados expressando as proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 foram denominados pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM, respectivamente.

O clone 42 (pCID2EtD2prM) e o 26 (pCID2EtD3prM) foram escolhidos para desenvolvimento de análises quanto à expressão de E à imunogenicidade destas duas construções vacinais.

As análises bioquímicas demonstraram que a expressão da proteína E foi maior nas células transfectadas com o plasmídeo pCID2EtD3prM. Na imunoprecipitação seguida de separação eletroforética das proteínas as bandas protéicas obtidas foram submetidas à densitometria ótica que apresentou a indicação de que a proteína prM/DENV-3 aumentou a expressão da proteína E truncada em 67,02% com relação à proteína prM/DENV-2 (figura 9).

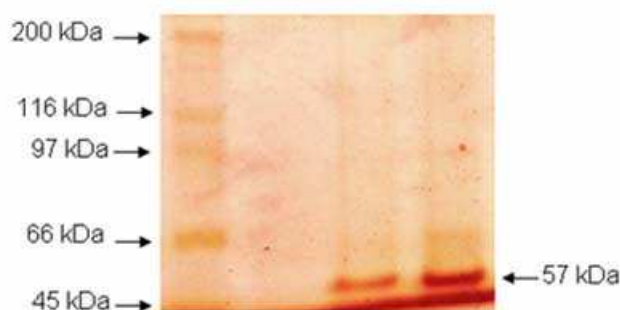


Figura 9. Detecção da expressão da proteína E por células transfectadas com os plasmídeos recombinantes. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% mostrando, da esquerda para a direita, marcador de peso molecular de proteínas (“Molecular Weight Marker”, Sigma-Aldrich, Alemanha), controle negativo de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

A seguir são demonstrados os resultados dos testes realizados para avaliar se este aumento da expressão de E pelo plasmídeo pCID2EtD3prM acarreta alguma alteração na resposta imune induzida pelo mesmo.

5.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

5.2.1. ELISA

A fim de verificar se os animais inoculados haviam produzido anticorpos específicos para a proteína E, o soro dos mesmos foi coletado antes da primeira imunização (controle negativo), e quinze dias após cada inoculação e avaliados por ELISA indireto. Os dados indicam que os animais vacinados com plasmídeo pCID2EtD3prM apresentaram maior soroconversão tanto em relação ao plasmídeo controle pCID2Et quanto à construção pCID2EtD2prM (figura 10).

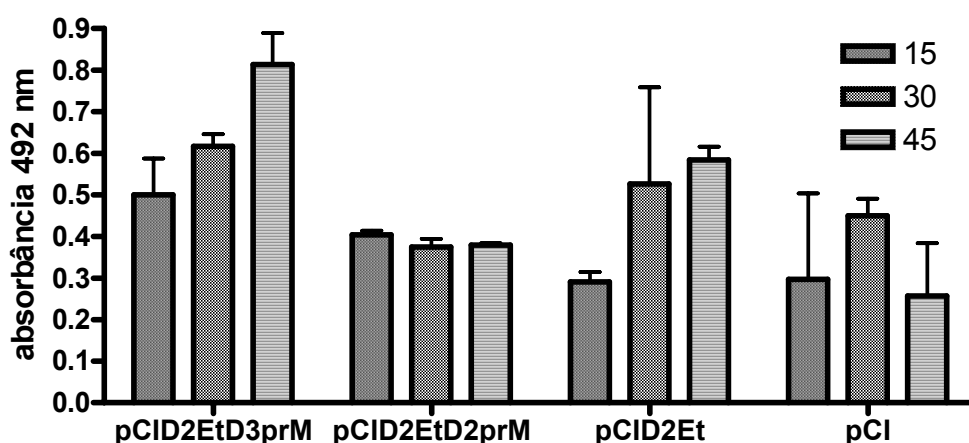


Figura 10. ELISA indireto para detecção de anticorpos específicos para a proteína E do vírus Dengue-2. As barras indicam a quantidade dos anticorpos com 15, 30 e 45 dias após a primeira vacinação, respectivamente.

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Bonferroni a 0,05 de significância. Os resultados demonstraram que a diferença foi estatisticamente significativa entre o grupo pCID2EtD3prM e pCID2EtD2prM.

5.2.2. Linfoproliferação

Para avaliar a resposta das células linfóides de camundongos imunizados com os plasmídeos recombinantes frente ao estímulo com Dengue-2, foi realizado um ensaio de linfoproliferação. As células de todos os grupos apresentaram proliferação, entretanto os resultados demonstraram maior ativação das células linfóides provenientes do baço dos animais vacinados com pCID2EtD3prM. Esta diferença se torna mais evidente quando é utilizado um MOI 0,1. pCID2Et e pCID2EtD2prM apresentaram valores similares de linfoproliferação (figura 11). Análises estatísticas utilizando o teste de Bonferroni demonstraram que a diferença foi significativa para todos os grupos estimulados com 0,1 MOI de vírus. Entretanto, em relação ao MOI 0,5, a diferença estatisticamente significativa foi encontrada apenas entre os plasmídeos contendo o inserto de prM em relação a construção original, não havendo diferença estatística entre pCID2EtD2prM e pCID2EtD3prM.

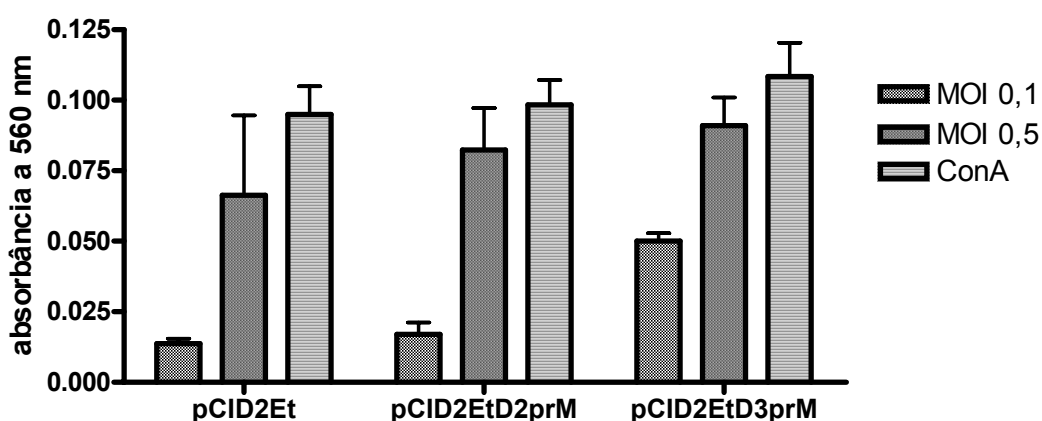


Figura 11. Ensaio de Linfoproliferação. Proliferação das células linfóides extraídas dos animais imunizados com os plasmídeos pCID2Et, pCID2EtD2prM e

pCID2EtD3prM após estímulo com DEN-2 (MOI 0,5 e 0,1) e ConA (controle positivo).

5.2.3. Caracterização fenotípica das células imunes

Os resultados apresentados nas figuras 12 e 13 e na tabela 2 apontam para uma maior indução de células de memória de ambos os tipos ($CD4^+$ e $CD8^+$) nos animais imunizados com o plasmídeo pCID2EtD3prM, quando em comparação com os grupos vacinados com pCID2Et e pCID2EtD2prM. Este padrão se manteve no que tange ao número de linfócitos TCD8⁺, e em relação à quantidade total de linfócitos T ($CD4 + CD8$). Entretanto, quando se comparou a quantidade de linfócitos TCD4⁺ induzida pela imunização com os plasmídeos construídos, observou-se que animais imunizados com pCID2EtD3prM e pCID2EtD2prM apresentaram quantidades similares deste tipo celular. Avaliação estatística dos dados realizada por teste T a 0,05 de significância indicou diferença estatisticamente significativa entre pCID2EtD3prM e os demais grupos analisados, tanto em relação à quantidade de células TCD4, quanto TCD8.

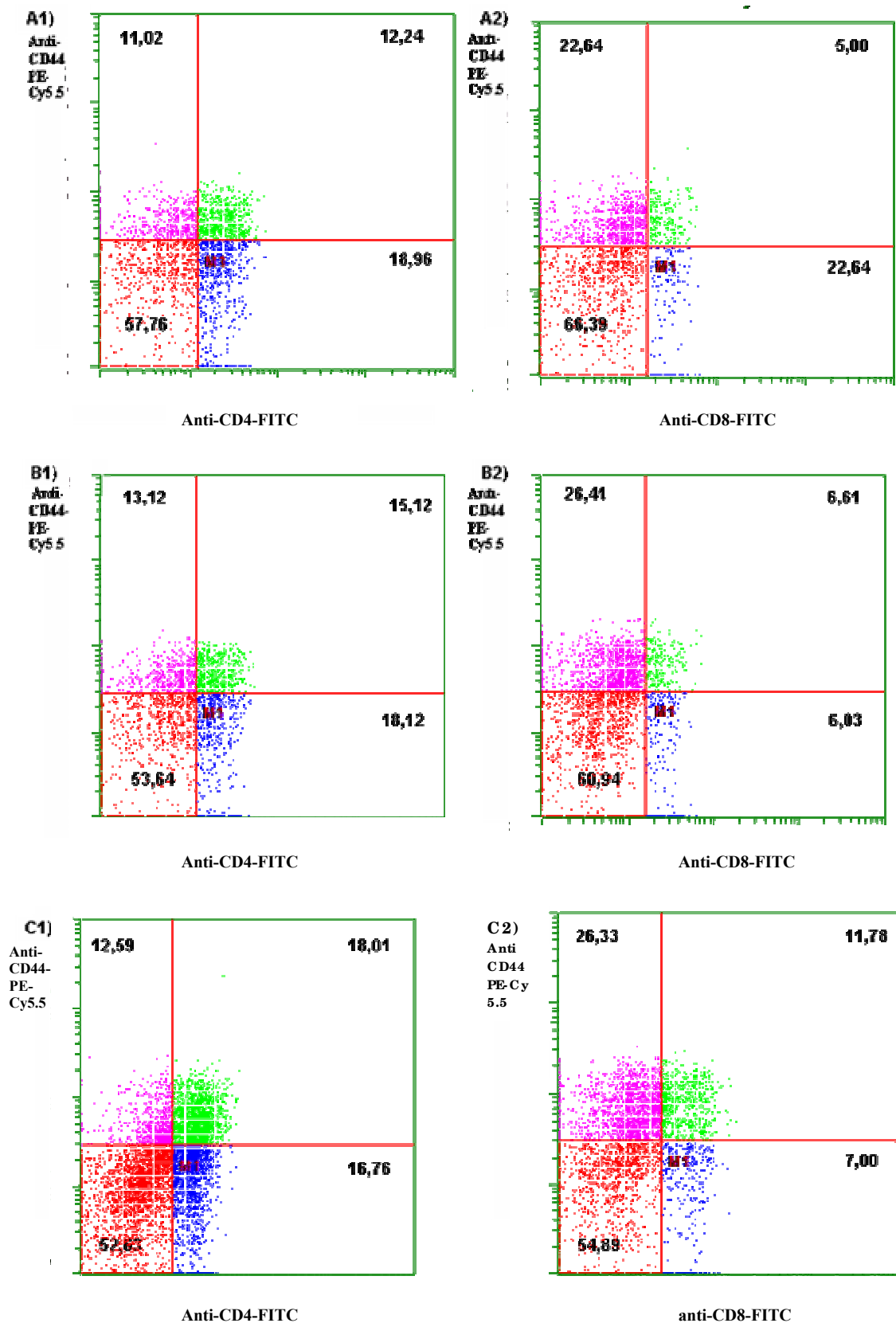


Figura 12. Análise do fenótipo das células extraídas do baço dos animais imunizados. **A)** grupo imunizado com pCID2Et, marcação de células CD4⁺ de

memória em A1 e de células TCD8⁺ de memória em A2; **B)** grupo imunizado com pCID2EtD2prM, marcação de células CD4⁺CD44⁺ em B1 e de células CD8⁺CD44⁺ em B2; **C)** imunização com o plasmídeo pCID2EtD3prM, marcação de Linfócitos TCD4⁺ de memória em C1 e linfócitos TCD8⁺ de memória em C2. Os valores citados correspondem à média de dois experimentos.

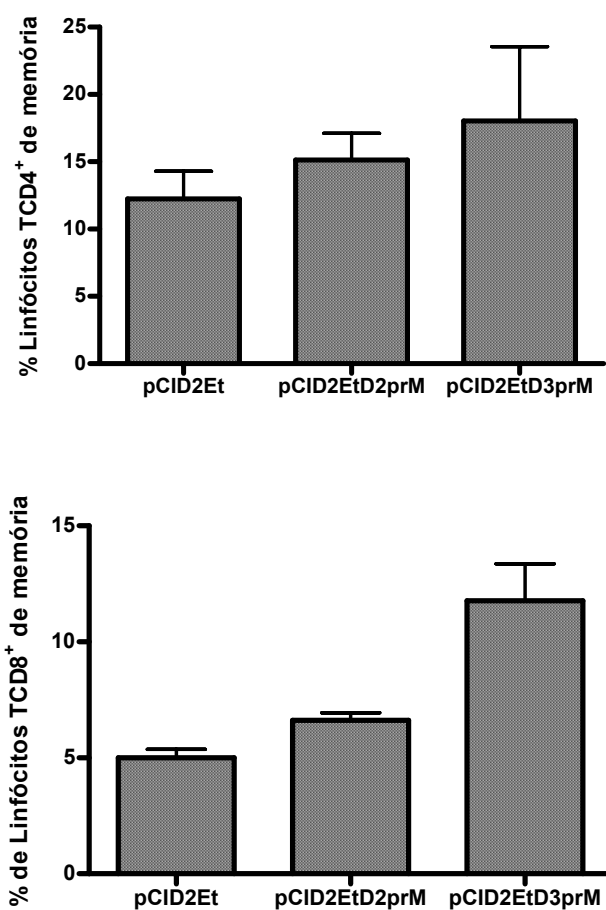


Figura 13. Análise da indução de células de memória nos animais imunizados. **A)** Porcentagem de linfócitos TCD4⁺ de memória; **B)** Porcentagem de linfócitos TCD8⁺ de memória.

Tabela 2. Porcentagem de linfócitos induzida nos animais imunizados com as construções plasmidiais.

	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD44 ⁺	CD8 ⁺	CD8 ⁺ CD44 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Total de LT
pCID2Et	31,2± 3,01	12,2 ± 2,09	10,9 ± 1,09	5,0 ± 0,52	3,09	42,17
pCID2EtD2prM	33,2 ± 6,15	15,1 ± 2,82	12,6 ± 0,43	6,6 ± 0,47	2,75	45,9
pCID2EtD3prM	34,8± 18,0	18,0± 7,83	18,8± 4,41	11,8± 2,25	1,85	53,55

5.2.4. Detecção de citocinas

As células extraídas do baço dos animais foram cultivadas durante 2 horas sob estímulo específico DENV-2 a fim de mensurar a expressão de RNA mensageiro de IL-4 e IL-10 (perfil TH2 de resposta) e INF-γ (perfil de resposta TH1).

Os dados obtidos demonstram um perfil predominantemente TH1, com grande expressão de INF-γ. A síntese de IL-10 também foi detectada, não superando, entretanto a expressão de INF-γ (tabela 3).

Tabela 3. Expressão de IL-4, IL-10 e INF-γ em comparação com o grupo controle, após estímulo com vírus Dengue-2.

Grupo	IL-4	IL-10	INF-γ
pCID2Et	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,01	5,56 ± 4,8
pCID2EtprMD2	0,015 ± 0,01	0,09 ± 0,03	6,62 ± 3,45
pCID2EtprMD3	0,125 ± 0,12	0,14 ± 0,04	53,0 ± 20,5

XV. DISCUSSÃO

Tendo em vista a atual situação epidemiológica da dengue no Brasil e no mundo, é de consenso da comunidade científica em geral que existe uma necessidade crescente de uma vacina eficaz e de fácil acesso para prevenção da doença. Várias estratégias têm sido adotadas com esta finalidade, desde os métodos de atenuação viral clássicos ou através da engenharia genética, até as vacinas de DNA, dentro das quais se encaixa o presente estudo.

Especificamente, o objetivo deste estudo foi observar se a presença da proteína prM em um plasmídeo vacinal expressando a proteína E representaria aumento na capacidade do mesmo em gerar resposta imune em camundongos inoculados, tendo como suporte a observação em nosso laboratório de que esta construção apresentou aumento na expressão de E “in vitro”. Estudos demonstram que a proteína E co-expressando a proteína prM leva a indução da secreção de anticorpos neutralizantes e proteção de camundongos (Heinz et al., 1995). Outros trabalhos sugerem que há uma correlação entre os níveis de expressão da proteína E e a indução de anticorpos neutralizantes (Konishi, Fujii, and Mason, 2001; Konishi, Terazawa, and Fujii, 2003; Konishi et al., 1998; Konishi et al., 2000).

Estudos com outros flavivirus e com o próprio *Dengue* vírus evidenciam que para a correta manutenção da conformação de E é necessário a expressão concomitante da proteína prM (Guirakhoo and Roehrig, 1992; Konishi and Mason, 1993). Foi observado que no vírus da encefalite de Murray Valley, os vírions que continham a proteína prM não processada eram mais ácido-resistentes, sugerindo que a prM tem uma função de “chaperona” e protetora da proteína E de mudanças conformacionais irreversíveis no compartimento ácido da via secretória celular (Guirakhoo et al., 2006; Guirakhoo and Roehrig, 1992). Além do mais, evidências experimentais sugerem que os epítomos neutralizantes da proteína E contra os vírus *Dengue* sejam conformacionais (Henchal et al., 1985).

Ocazionez e Fonseca também demonstraram que a baixa proteção de uma vacina de DNA contra o DENV-2 pode ser resultante de uma fraca ativação do sistema imune como consequência de uma imperfeita secreção da proteína E truncada devido a ausência de prM (Ocazionez and Fonseca 2000).

Além do mais, nota-se que grande parte das pesquisas envolvendo construções plasmidiais expressando a proteína prM/E do vírus Dengue-3 apresentam melhores resultados em relação àquelas onde os plasmídeos continham o cassete de expressão da prM/E Dengue-2 (Blair et al., 2006; De Paula et al., 2008; Konishi et al., 2000). Estas observações levam a crer que a proteína prM/DENV-3 possa apresentar maior capacidade de chaperona, já que é sabido que prM tem papel fundamental na síntese, processamento

e correta conformação de E (Lindenbach and Rice, 2003; Lindenbach, 2001; Ocazonez and Fonseca 2000).

Com o intuito de investigar esta possibilidade foram construídos dois plasmídeos através da inserção dos genes de prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no vetor plasmidial pCID2Et previamente construído a fim de expressar a proteína E/DENV-2 truncada (Ocazonez and Fonseca 2000).

Os plasmídeos foram denominados pCID2EtD2pM e pCID2EtD3pM, e expressavam respectivamente as proteínas prM/DENV-2-E/DENV-2 e prM/DENV-3-E/DENV-2.

O sequenciamento dos insertos clonados revelou alta identidade com os genes selvagens postados no banco de dados. Para pCID2EtD2pM, foi observada 98% de identidade e para o pCID2EtD3pM, 96%. Em relação à seqüência aminoacídica, o inserto de prM/DENV-2 apresentou 97% de seus aminoácidos traduzidos idênticos à proteína original e 98% de similaridade. Já o inserto prM/DENV-3, a identidade aminoacídica foi de 76% e a similaridade de 86% com a proteína prM do vírus DENV-3. Como existe a possibilidade de prM/DENV-3 desempenhar melhor função de chaperona do que prM/DENV-2, foi feito também o alinhamento da seqüência destas duas proteínas, resultando em 71% de identidade nucleotídica entre os mRNAs e 70% de identidade e 84% de similaridade entre seus resíduos de aminoácidos. No alinhamento das seqüências dos dois insertos foi observado 70% de identidade na seqüência de nucleotídeos e 75% de identidade e 91% de similaridade entre as seqüências aminoacídicas. Estes dados evidenciam que as proteínas prM/DENV-2 e prM/DENV-3 expressas

pelos plasmídeos recombinantes apresentam maior proximidade entre si do que a encontrada entre as proteínas prM dos DENV-2 e DENV-3.

Os plasmídeos pCID2EtD2prM, pCID2EtD3prM e pCID2Et foram utilizados para imunização de camundongos para avaliação de indução da resposta imune induzida pelos candidatos vacinais.

No ELISA, após 3 inoculações, constatamos 40% a mais de anticorpos específicos contra a proteína E/DENV-2 nos animais vacinados com pCID2EtD3prM em relação àqueles inoculados com pCID2Et. No grupo vacinado com pCID2EtD2prM, os níveis de anticorpos não apresentaram aumento após duas ou mesmo três doses, o que também foi observado por Konishi, onde os animais foram inoculados três vezes com 200 µg de plasmídeo expressando prM/E do DENV-2 (Konishi et al., 2000).

No ensaio de linfoproliferação, a melhor resposta dos animais vacinados com pCID2EtD3prM foi mantida. Neste caso, a diferença foi mais evidente quando o estímulo se faz com o MOI de 0,1, onde a proliferação alcançou 280% a mais em relação ao pCID2Et e 194% em relação ao pCID2EtD2prM. Além do mais, ambas as construções contendo prM apresentaram melhores respostas de proliferação quando comparadas com o candidato pCID2Et. Estes resultados vão contra a teoria proposta por Rothman e colaboradores, que sugeria que os epítomos reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos estariam localizados na região C e não nas regiões prM e E (Rothman et al., 1993).

Foi observado após citometria de fluxo que a expressão de linfócitos T de memória foi maior nos grupos vacinados com plasmídeos apresentando a proteína prM. A indução da expressão de células T de memória foi ampliada

nos animais vacinados com pCID2EtD3prM, principalmente em relação à população TCD8⁺. Nos animais vacinados com o plasmídeo pCID2EtD3prM foi observado aumento de 32% na quantidade de células TCD8⁺ e 136% de aumento em relação às células TCD8⁺ de memória quando comparados com o grupo controle imunizado com pCID2Et. Quando comparado com o grupo inoculado com a construção pCID2EtD2prM, as quantidades de TCD8⁺ e TCD8⁺ de memória obtiveram aumento de 16% e 72%, respectivamente. No que tange à população de linfócitos TCD4⁺, também foi observado acréscimo de células de memória no grupo pCID2EtD3prM em relação aos demais. Os dados indicam aumento de 6% e 25% respectivamente nas quantidades de células TCD4⁺ e TCD4⁺ de memória para o grupo vacinado com o plasmídeo pCID2EtD2prM. Para a construção pCID2EtD3prM estes valores são de 12% e 50%, respectivamente.

Ainda discorrendo sobre o resultado da citometria de fluxo, temos que a população total de linfócitos T nos grupos vacinados com os plasmídeos pCID2EtD3prM e pCID2EtprD2M foram maiores 7% e 26% quando comparadas com o grupo pCID2Et. Konishi e colaboradores não observaram indução da expressão de células T de memória nos animais vacinados com a construção pcD2ME construída por eles, entretanto foram evidenciadas células B de memória responsivas ao vírus Dengue-2 (Konishi et al., 2000).

A análise do padrão de resposta imune induzida pelos plasmídeos vacinais demonstram predominância do perfil TH1, tendo em vista a alta expressão de INF- γ em detrimento da síntese de IL-4 e IL-10. Conforme ocorrido nos demais ensaios, a resposta dos grupos vacinados com os plasmídeos pCID2EtD3prM e pCID2EtD2prM foram maiores em relação ao

pCID2Et. Mais uma vez, observa-se que a expressão de INF- γ foi superior nos animais inoculados com pCID2EtD3prM, desta vez, tanto em relação ao vacinados com pCID2Et quanto àqueles inoculados com pCID2EtD2prM.

Baseados nos dados citados, é possível inferir que a proteína prM do vírus Dengue-3 possivelmente realiza de forma mais eficiente a função de auxiliadora do *folding* da proteína E, consequentemente, aumentando sua expressão e apresentação para as células TCD4⁺ e aprimorando, desse modo, a resposta imunológica.

XVI. CONCLUSÕES

Diante do exposto, concluímos que:

- A clonagem dos genes prM/DENV-2 e prM/DENV-3 no vetor vacinal pré-existente pCID2Et foi eficaz;
- A expressão da proteína E foi maior nas células transfectadas com o plasmídeo pCID2EtD3prM;
- Todos os animais inoculados com as construções plasmidiais apresentaram soroconversão, entretanto, a quantidade de anticorpos específicos para a proteína E foi maior naqueles imunizados com a construção plasmidial p CID2EtD3prM em relação ao plasmídeo pCID2EtD2prM;
- A quantidade de células CD8+ e CD8+ de memória foi maior nos animais imunizados com o plasmídeo pCID2EtD3prM em relação às demais construções plasmidiais;
- A resposta imunológica dos animais vacinados com os plasmídeos pCID2EtprMD3 e pCID2EtprMD2 foi melhor do que a dos animais vacinados com pCID2Et
- A introdução da proteína prM/DENV-3 resultou em melhor ativação do sistema imunológico quando comparada com a proteína prM/DENV-2

XVII. PERSPECTIVAS

Para dar continuidade a este trabalho, as próximas etapas terão como objetivos a análise de sobrevivência dos camundongos imunizados com os

plasmídeos recombinantes pós-desafio com vírus Dengue-2 e a dosagem de anticorpos neutralizantes induzidos nos animais vacinados contra este mesmo vírus.

VIII. GLOSSÁRIO

- 26. Anticorpos neutralizantes** Anticorpos capazes de se ligar e impedir a entrada do patógenos nas células-alvo.
- 27. Auto-anticorpos** Anticorpos que reconhecem antígenos próprios
- 28. Biobalística** Técnica que utiliza microprojéteis em alta

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

29. CAP 5'

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

30. Cauda PoliA

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

31. Carga Viral

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

32. Choque Hipovolêmico	Forma de choque; uma condição onde o coração é incapaz de fornecer sangue suficiente para o corpo devido a perda de sangue, distúrbio circulatório ou volume sangüíneo inadequado.
33. Complemento	Proteínas solúveis no plasma que participam das defesas inatas e adquiridas do organismo.
34. DNA recombinante	Seqüência de DNA artificial que resulta da combinação de diferentes seqüências de DNA, inclusive provenientes de diferentes tipos de organismos.
35. Domínio	Regiões específicas dentro de uma molécula protéica, geralmente responsáveis por funções específicas da molécula.
36. Envelope	Membrana que envolve o nucleocapsídeo de alguns vírus, composta basicamente de glicoproteínas e fosfolipídeos provenientes da membrana da célula hospedeira e proteínas virais.
37. Epítopo	Determinante antigênico. Parte da molécula imunogênica que é reconhecida pelo sistema imune. É a menor porção do antígeno com potencial de gerar a resposta imune.

38. Gene “repórter”	Gene que pode ser acoplado a outro gene de interesse, usados para determinar se esse gene de interesse está sendo expresso pela célula. Geralmente oferecem características que podem ser detectadas e quantificadas, como emissão de fluorescência.
39. Hepatomegalia	Aumento do tamanho do fígado
40. MOI	Multiplicidade de infecção. Quantidade de vírus por célula.
41. Morbidade	Estado do que é doente; debilitação da condição física do enfermo.
42. Nucleocapsídeo	Genoma viral recoberto por proteína capsidial
43. ORF	“Open Reading Frame”. Um fragmento de DNA que é transcrito em uma molécula única de RNA mensageiro, independentemente de codificar para um ou mais genes. Localiza-se entre uma sequência de iniciação (“start codon”) e uma sequência de terminação (“stop codon”).
44. Plasmídeos	Moléculas circulares duplas de DNA que se reproduzem independentemente do DNA cromossômico, aparecem principalmente em células bacterianas.

45. Quimera	Segmento de DNA que contém fragmentos provenientes de espécies ou cepas distintos.
46. Rash maculopapular	Manchas avermelhadas sobressaltadas na pele
47. Reatogenicidade	Aparecimento de efeitos colaterais em resposta à administração de algum imunógeno, como uma vacina.
48. Termolábel	Sensível a variações de temperatura
49. Trombocitopenia	Redução da contagem de plaquetas no sangue periférico (inferior a $150.000/\text{mm}^3$).
50. Virulência	Capacidade patogênia de um microorganismo, medida pela gravidade dos sintomas que produzem ou por seu poder de invadir os tecidos do hospedeiro.

XVIII. REFERÊNCIAS

55. Azeredo, E. L., Zagne, S. M., Santiago, M. A., Gouvea, A. S., Santana, A. A., Neves-Souza, P. C., Nogueira, R. M., Miagostovich, M. P., and Kubelka, C. F. (2001). Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology* **204**(4), 494-507.
56. Basu, A., and Chaturvedi, U. C. (2008). Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**(3), 287-99.
57. Bente, D. A., and Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discov Today Dis Models* **3**(1), 97-103.
58. Blair, P. J., Kochel, T. J., Raviprakash, K., Guevara, C., Salazar, M., Wu, S. J., Olson, J. G., and Porter, K. R. (2006). Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. *Vaccine* **24**(9), 1427-32.
59. Bray, M., and Lai, C. J. (1991). Dengue virus premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response. *Virology* **185**(1), 505-8.
60. Brown, M. G., Huang, Y. Y., Marshall, J. S., King, C. A., Hoskin, D. W., and Anderson, R. (2009). Dramatic caspase-dependent apoptosis in antibody-enhanced dengue virus infection of human mast cells. *J Leukoc Biol* **85**(1), 71-80.
61. Brown, M. G., King, C. A., Sherren, C., Marshall, J. S., and Anderson, R. (2006). A dominant role for FcγRII in antibody-enhanced

- dengue virus infection of human mast cells and associated CCL5 release. *J Leukoc Biol* **80**(6), 1242-50.
62. Chang, G. J., Hunt, A. R., Holmes, D. A., Springfield, T., Chiueh, T. S., Roehrig, J. T., and Gubler, D. J. (2003). Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. *Virology* **306**(1), 170-80.
63. Cohen, S., Powell, C. J., Dubois, D. R., Hartman, A., Summers, P. L., and Eckels, K. H. (1990). Expression of the envelope antigen of dengue virus in vaccine strains of Salmonella. *Res Microbiol* **141**(7-8), 855-8.
64. Costa, S. M., Azevedo, A. S., Paes, M. V., Sarges, F. S., Freire, M. S., and Alves, A. M. (2007). 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* **358**(2), 413-23.
65. Costa, S. M., Freire, M. S., and Alves, A. M. (2006). DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* **24**(21), 4562-4.
66. De Paula, S. O., Lima, D. M., de Oliveira Franca, R. F., Gomes-Ruiz, A. C., and da Fonseca, B. A. (2008). A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *Arch Virol* **153**(12), 2215-23.

67. Deubel, V., Bordier, M., Megret, F., Gentry, M. K., Schlesinger, J. J., and Girard, M. (1991). Processing, secretion, and immunoreactivity of carboxy terminally truncated dengue-2 virus envelope proteins expressed in insect cells by recombinant baculoviruses. *Virology* **180**(1), 442-7.
68. Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W., and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* **15**, 617-48.
69. Fonseca, B. A., Pincus, S., Shope, R. E., Paoletti, E., and Mason, P. W. (1994). Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* **12**(3), 279-85.
70. Gubler, D. J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* **10**(2), 100-3.
71. Guirakhoo, F., Kitchener, S., Morrison, D., Forrat, R., McCarthy, K., Nichols, R., Yoksan, S., Duan, X., Ermak, T. H., Kanesa-Thasan, N., Bedford, P., Lang, J., Quentin-Millet, M. J., and Monath, T. P. (2006). Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin* **2**(2), 60-7.
72. Guirakhoo, F., and Roehrig, J. T. (1992). The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* **191**(2), 921-31.

73. Gurunathan, S., Klinman, D. M., and Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* **18**, 927-74.
74. Gurunathan, S., Wu, C. Y., Freidag, B. L., and Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* **12**(4), 442-7.
75. Guzman, M. G., and Kouri, G. (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* **2**(1), 33-42.
76. Halstead, S. B. (2007). Dengue. *Lancet* **370**(9599), 1644-52.
77. Halstead, S. B., Heinz, F. X., Barrett, A. D., and Roehrig, J. T. (2005). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. *Vaccine* **23**(7), 849-56.
78. He, R. T., Innis, B. L., Nisalak, A., Usawattanakul, W., Wang, S., Kalayanaroj, S., and Anderson, R. (1995). Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2. *J Med Virol* **45**(4), 451-61.
79. Heinz, F. X., Allison, S. L., Stiasny, K., Schlich, J., Holzmann, H., Mandl, C. W., and Kunz, C. (1995). Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* **13**(17), 1636-42.
80. Henchal, E. A., McCown, J. M., Burke, D. S., Seguin, M. C., and Brandt, W. E. (1985). Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* **34**(1), 162-9.

81. Konishi, E., Fujii, A., and Mason, P. W. (2001). Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. *J Virol* **75**(5), 2204-12.
82. Konishi, E., and Mason, P. W. (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *J Virol* **67**(3), 1672-5.
83. Konishi, E., Terazawa, A., and Fujii, A. (2003). Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice. *Vaccine* **21**(25-26), 3713-20.
84. Konishi, E., Yamaoka, M., Khin Sane, W., Kurane, I., and Mason, P. W. (1998). Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *J Virol* **72**(6), 4925-30.
85. Konishi, E., Yamaoka, M., Kurane, I., and Mason, P. W. (2000). A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* **18**(11-12), 1133-9.
86. Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., and Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**(5), 717-25.

87. Kurosu, T., Chaichana, P., Yamate, M., Anantapreecha, S., and Ikuta, K. (2007). Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* **362**(4), 1051-6.
88. Lei, H. Y., Yeh, T. M., Liu, H. S., Lin, Y. S., Chen, S. H., and Liu, C. C. (2001). Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci* **8**(5), 377-88.
89. Lindenbach, B. D., and Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* **59**, 23-61.
90. Lindenbach, B. D., Rice, C.M. (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication. In **"Fields Virology"** (Lippincott Williams and Wilkins, Ed.), pp. 991-1041.
91. Liu, W. T., Lin, W. T., Tsai, C. C., Chuang, C. C., Liao, C. L., Lin, H. C., Hung, Y. W., Huang, S. S., Liang, C. C., Hsu, H. L., Wang, H. J., and Liu, Y. T. (2006). Enhanced immune response by amphotericin B following NS1 protein prime-oral recombinant Salmonella vaccine boost vaccination protects mice from dengue virus challenge. *Vaccine* **24**(31-32), 5852-61.
92. McBride, W. J., and Bielefeldt-Ohmann, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* **2**(9), 1041-50.
93. McDonnell, W. M., and Askari, F. K. (1996). DNA vaccines. *N Engl J Med* **334**(1), 42-5.
94. Men, R. H., Bray, M., and Lai, C. J. (1991). Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell

- surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. *J Virol* **65**(3), 1400-7.
95. Ocazionez , R., and Fonseca , B. A. (2000). Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice. *Vaccine* **19**(6), 648-54.
 96. Perera, R., and Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* **11**(4), 369-77.
 97. Rothman, A. L., Kurane, I., Lai, C. J., Bray, M., Falgout, B., Men, R., and Ennis, F. A. (1993). Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* **67**(2), 801-6.
 98. Simantini, E., and Banerjee, K. (1995). Epitope mapping of dengue 1 virus E glycoprotein using monoclonal antibodies. *Arch Virol* **140**(7), 1257-73.
 99. Tan, G. K., and Alonso, S. (2009). Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. *Curr Opin Infect Dis* **22**(3), 302-8.
 100. Ulmer, J. B., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Donnelly, J. J., Friedman, A., Montgomery, D. L., Yawman, A. M., Orme, I. M., Denis, O., Content, J., Huygen, K., and Liu, M. A. (1997). Induction of immunity by DNA vaccination: application to influenza and tuberculosis. *Behring Inst Mitt*(98), 79-86.
 101. Wang, S., He, R., Patarapotikul, J., Innis, B. L., and Anderson, R. (1995). Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. *Virology* **213**(1), 254-7.

102. Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., and Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* **5**(7), 518-28.
103. Wilder-Smith, A., and Gubler, D. J. (2008). Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin North Am* **92**(6), 1377-90, x.
104. Wolff, J. A., Dowty, M. E., Jiao, S., Repetto, G., Berg, R. K., Ludtke, J. J., Williams, P., and Slautterback, D. B. (1992a). Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci* **103** (Pt 4), 1249-59.
105. Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., and Jani, A. (1992b). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* **1**(6), 363-9.
106. Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G., and Kuhn, R. J. (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* **10**(11), 907-12.
107. Zhao, B. T., Prince, G., Horswood, R., Eckels, K., Summers, P., Chanock, R., and Lai, C. J. (1987). Expression of dengue virus structural proteins and nonstructural protein NS1 by a recombinant vaccinia virus. *J Virol* **61**(12), 4019-22.
108. Zhu, W., Qin, C., Chen, S., Jiang, T., Yu, M., Yu, X., and Qin, E. (2007). Attenuated dengue 2 viruses with deletions in capsid protein

derived from an infectious full-length cDNA clone. *Virus Res* **126**(1-2),
226-32.