

Vania Aparecida Mareze

**Avaliação em camundongos da capacidade imunogênica e da atividade neutralizante *in vitro* dos anticorpos induzidos pela imunização por um candidato vacinal contra Dengue, constituído por partículas quiméricas do vírus Junín e peptídeos conservados do vírus da Dengue**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Bruña-Romero

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mareze, Vania Aparecida

Avaliação em camundongos da capacidade imunogênica e da atividade neutralizante in vitro dos anticorpos induzidos pela imunização por um candidato vacinal contra Dengue, constituído por partículas quiméricas do vírus Junín e peptídeos conservados do vírus da Dengue / Vania Aparecida Mareze ; orientador, Oscar Bruña-Romero - Florianópolis, SC, 2015.

95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Dengue. 3. proteína Z. 4. vírus-like-particle. 5. peptídeos conservados. I. Bruña-Romero, Oscar. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Vania Aparecida Mareze

**Avaliação em camundongos da capacidade imunogênica e da atividade neutralizante *in vitro* dos anticorpos induzidos pela imunização por um candidato vacinal contra Dengue, constituído por partículas quiméricas do vírus Junín e peptídeos conservados do vírus da Dengue**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 23 de Fevereiro de 2015.

---

Prof. Marcelo Maraschin Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Oscar Bruña-Romero, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Juan Arbiza, Dr.  
Universidad de La Republica, Uruguay



Dedico este trabalho a todas as pessoas que vivem em área endêmica e/ou já foram infectadas com o vírus da Dengue e anseiam por melhorias na prevenção e tratamento desta doença.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a todos aqueles que contribuíram e, me apoiaram durante a realização deste projeto de mestrado.

Aos meus pais Paulo Roberto e Ivanilde, meu irmão Paulo Henrique e ao meu companheiro Marco Aurélio por apoiarem à continuação dos meus estudos. A torcida de vocês foi fundamental durante esta trajetória. Não tenho palavras suficientes para demonstrar meu carinho e meu sentimento de gratidão.

Ao meu orientador Dr. Oscar Bruña-Romero, por me receber de braços abertos em seu laboratório, pela amizade e pela orientação durante estes dois anos. Sua contribuição foi muito importante para o meu amadurecimento científico e profissional. Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao professor da UFSC, Dr. Daniel Santos Mansur pela identificação dos peptídeos conservados do vírus da Dengue e por ceder a utilização dos mesmos neste trabalho. Aos pesquisadores Dra. Cristina S. Borio, Dr. Mario E. Lozano da Universidad Nacional de Quilmes (Buenos Aires, Argentina), Dr. Santiago Mirazo e Dr. Juan Arbiza da Universidad de La República (Montevidéo, Uruguai) por colaborar com o estudo da plataforma tecnológica do vírus Junín.

Ao suporte financeiro: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) e CABBIO (Centro Argentino-Brasileiro de Biotecnologia). Sem esta contribuição não seria possível a realização deste projeto.

A equipe técnica do LAMEB I (Laboratório de Multiusuários em Estudos em Biologia I): Vanessa, Bibiana e Dênis, por auxiliar na utilização de alguns equipamentos como ultracentrífuga, leitora de placas de ELISA, entre outros. Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, em especial a Eliana, a Thaís e a professora Zenilda. Agradeço a equipe do biotério setorial pela compreensão e apoio técnico, em especial a bioterista Fernanda. Em geral, a todos os demais integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA): Iris, Amanda, Mariane, Antônio, Mariana (Nana), Albert, Tiago e Luan e Paola. Agradeço também aos professores Dr. Aguinaldo R. Pinto e Dr. Carlos Zanetti pelo espaço cedido no laboratório.

Agradeço aos colegas de turma, secretários e professores do programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC. A todos os membros e professores dos laboratórios vizinhos, pela troca de conhecimento, pelo empréstimo de reagentes e equipamentos: ao

LVA (Laboratório de Virologia Aplicada), a PROTO (Laboratório de Protozoologia) principalmente as pós-doutorandas Patrícia e Milene e ao LIDI (Laboratório de Imunobiologia) em especial a Paula, Renata e a Steffany (Puka). Agradeço também a Mariana Oliveira Dias, mestre em Microbiologia pela UFMG.

A todos os meus amigos, inclusive os novos amigos que fiz em Florianópolis. Em especial, aos amigos paranaenses, que apesar da distância física estiveram sempre presentes, mesmo que de coração.

Agradeço as doutoras Maria Aparecida Fernandez, Fabrícia Gimenes, Márcia Portilho e Cecília Edna Mareze da Costa da Universidade Estadual de Maringá por incentivar desde o princípio a minha entrada no mundo da pesquisa, começando pela graduação.

“As grandes ideias surgem da observação dos  
pequenos detalhes.”

Augusto Cury



## RESUMO

A Dengue é uma doença infecciosa viral humana, transmitida por mosquitos, que tem se tornado de grande importância para a saúde pública mundial nos últimos anos, devido a sua alta prevalência, atingindo mais de cem países no mundo. No entanto, nenhum tratamento específico ou vacina licenciada estão disponíveis no mercado. Por esta razão, uma vacina multivalente capaz de induzir uma resposta imune de longo prazo contra os quatro sorotipos do vírus (DENV) seria a melhor alternativa para prevenir esta doença. Como proposta para o desenvolvimento de um candidato vacinal foram escolhidos como antígenos dois peptídeos altamente conservados (peptídeo de fusão 1 e peptídeo 2), presentes na proteína E de todos os sorotipos de DENV e, como sistema carreador, a proteína Z do vírus Junín da Febre Hemorrágica da Argentina (JUNV), que foi utilizado como partícula pseudoviral (VLP). As VLPs são partículas que possuem a capacidade de mimetizar a estrutura de um vírion sem conter, no entanto, o material genético infeccioso, além disso, possuem uma boa capacidade imunogênica. O presente trabalho teve como objetivo construir este candidato vacinal possivelmente multivalente contra Dengue através de engenharia genética e, posteriormente, avaliar em camundongos a sua capacidade imunogênica e, *in vitro* a atividade neutralizante dos anticorpos induzidos pela imunização. Para confirmação da expressão das VLPs foram realizados ensaios de imunofluorescência e de microscopia eletrônica de transmissão. As imunizações em camundongos C57BL/6 seguiram o protocolo dose-reforço heterólogo. Primeiramente, foi administrado DNA plasmidial, contendo genes para Z-JUNV e para o peptídeo 1 (DENV-P1) ou o peptídeo 2 (DENV-P2), separadamente, em adjuvante monofosforil lipídeo A, via intramuscular. Após seis semanas foram administrados, via subcutânea, os peptídeos sintéticos DENV-P1 e DENV-P2, separadamente, em adjuvante incompleto de Freund. Em relação ao peptídeo 1, não foi possível obter uma conclusão estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), ou seja a respeito da imunogenicidade humoral induzida nos camundongos. Entretanto, a vacina constituída pelo antígeno peptídeo 2 induziu altos títulos de anticorpos nos camundongos imunizados. Além disto, os anticorpos mostraram uma importante atividade neutralizante, comparável àquela do anticorpo monoclonal 4G2, já descrito na literatura e, reduziram em até 50% o número de placas virais. Como conclusão, a vacina constituída pelo peptídeo 2 (dose DNA pZ-DENV-P2 e reforço peptídeo DENV-P2) é pode ser considerado um promissor

candidato vacinal multivalente contra Dengue. Estudos posteriores são necessários para compreender o papel destes dois peptídeos na proteção contra a infecção pelo vírus da Dengue *in vivo*.

**Palavras-chave:** Dengue, proteína Z, *virus-like particle*

## ABSTRACT

Dengue is a human infectious viral disease transmitted by mosquitoes that has become of great importance for global public health in recent years, due to its high prevalence, reaching over one hundred countries worldwide. However, no specific treatment or licensed vaccine is available in the market. On top of that, a multivalent vaccine capable of inducing a long-term immune response against the four serotypes of the virus (DENV) would be the best alternative to prevent this disease. As a proposal for the development of a vaccine candidate two highly conserved peptides (fusion peptide 1 and peptide 2), present on the E protein in all DENV serotypes were chosen as antigens, and as a system carrier the Z protein from Junín virus (JUNV) of Argentine Hemorrhagic Fever, which was used as virus-like particle (VLP). The VLPs are particles that have the ability to mimic the structure of a virion, however, containing no infectious genetic material, furthermore, they have good immunogenicity. This study aimed to build this possibly multivalent vaccine candidate against Dengue virus by genetic engineering and evaluate, in mice, its immunogenicity and neutralizing activity, *in vitro*, of antibodies induced by immunization. To confirm the expression of VLPs, immunofluorescence and transmission electron microscopy tests were carried out. The immunizations in C57BL/6 mice were in accordance with the heterologous dose-boost protocol. First, was administered plasmid DNA, containing genes for Z-JUNV and peptide 1 (DENV-P1) or peptide 2 (DENV-P2), separately, in monophosphoryl lipid A, intramuscularly. After six weeks, were administered, subcutaneously, synthetic peptides DENV-P1 and DENV-P2, separately, in incomplete Freund's adjuvant. About peptide 1, was not possible to have a conclusion statistically significant ( $p > 0,05$ ) about the humoral immunogenicity induced in mice. However, the vaccine comprising the peptide 2 antigen induced high titers of antibodies in immunized mice. Moreover, neutralizing antibodies showed a important activity, comparable to that of the 4G2 monoclonal antibody, as described in the literature, and reduced by 50% the number of viral plaques (DENV-2). In conclusion, the vaccine comprising the peptide 2 (dose DNA pZ-DENV-P2 and boost peptide DENV-P2) is a promising multivalent vaccine candidate against Dengue virus. Further studies are needed to understand the role of these two peptides in protection against infection by the Dengue virus *in vivo*.

**Keywords:** Dengue, Z protein, virus-like particle.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático de um vírus e de uma VLP.....	23
Figura 2 – RNA dos Arenavírus.....	31
Figura 3 – Microscopia eletrônica de transmissão e desenho esquemático de JUNV.....	31
Figura 4 – Estrutura linear da proteína Z de JUNV .....	32
Figura 5 – Funções da proteína dentro da célula.....	34
Figura 6 – Célula expressando VLP Z-JUNV/GFP .....	35
Figura 7 – Genoma do vírus da Dengue.....	39
Figura 8 – Resposta imune contra o vírus DENV mediada por IFN I .....	42
Figura 9 – Fenômeno ADE na Dengue .....	43
Figura 10 – Mecanismo de maturação do vírus DENV .....	46
Figura 11 – Estrutura da partícula viral imatura e madura dos flavivírus ....	47
Figura 12 – Mecanismo de fusão de DENV com a célula hospedeira .....	48
Figura 13 – Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína E dos 4 sorotipos do vírus da Dengue .....	49
Figura 14 – Estrutura de aminoácidos e do dímero e trímero da proteína E do vírus DENV maduro.....	50
Figura 15 – Fluxograma geral das atividades práticas .....	54
Figura 16 – Desenho esquemático da construção dos fragmentos gênicos codificantes dos peptídeos DENV-P1 e DENV-P2.....	55
Figura 17 – Desenho ilustrativo da estratégia de clonagem a partir do plasmídeo pZ-eGFP .....	58
Figura 18 – Tubo da ultracentrífuga após a purificação do DNA com cloreto de céσιο.....	61
Figura 19 – Estratégia de clonagem e gel de agarose.....	68
Figura 20 – Alinhamento da sequência do plasmídeo clonado pZ-DENV-P1 com o oligonucleotídeo sintético DENV-P1 .....	69
Figura 21 – Alinhamento da sequência do plasmídeo clonado pZ-DENV-P2 com o oligonucleotídeo sintético DENV-P2 .....	70
Figura 22 – Sequência da proteína Z/DENV-P1 .....	70
Figura 23 – Sequência da proteína Z/DENV-P2.....	71
Figura 24 – Foto de um dos tubos da ultracentrífuga após a purificação do DNA plasmidial .....	72
Figura 25 – Microscopia de fluorescência .....	73
Figura 26 – Fotos das VLPs obtidos por MET.....	74
Figura 27 – Gráficos obtidos a partir do ensaio de ELISA dos soros dos camundongos imunizados somente com vacina de DNA (dose) .....	75
Figura 28 – Gráficos obtidos a partir do ensaio de ELISA dos soros dos camundongos imunizados somente com dose-reforço (DNA + peptídeo)...	76

Figura 29 – Fotos do ensaio de PRNT.....	77
Figura 30 – Gráfico do ensaio de PRNT .....	78

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Arenavírus do Novo e Velho Mundo .....	28
Quadro 2 – Oligonucleotídeos para peptídeo DENV-P1 .....	56
Quadro 3 – Oligonucleotídeos para peptídeo DENV-P2 .....	56
Quadro 4 – Esquema de imunização dos camundongos .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE – *antibody dependent enhancement*  
AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida  
ALLV – vírus Allpahuayo  
AMAV – vírus Amapari  
BCNV – vírus Bear Canyon  
CFA – adjuvante completo de Freund  
DC – célula dendrítica  
DC-SIGN – *dendritic cell-specific intercelular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*  
DENV – vírus da Dengue  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
dsRNA – RNA dupla fita  
eIF4E – fator da Iniciação da Tradução eucariótica  
ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*  
ESCRT-1 – *endosomal sorting complex requiring for transport-1*  
FLXV – vírus Flexal  
GFP – proteína verde fluorescente  
GTOV – vírus Guanarito  
HBcAg – antígeno do *core* da Hepatite B  
HBsAg – antígeno da superfície da Hepatite B  
HEK 293 – células embrionárias de rim humano  
HPV – papilomavírus humano  
IFA – adjuvante incompleto de Freund  
IFN – interferon  
Ig – imunoglobulina  
IGR – região intergênica  
IL – interleucina  
imDCs - células dendríticas imaturas  
IPPV – vírus Ippy  
IRF – fator regulatório de interferon  
ISG – *interferon stimulating genes*  
JUNV – vírus Junín  
LASV – vírus Lassa  
LATV – vírus Latino  
LCMV – vírus da coriomeningite linfocítica  
MACV – vírus Machupo  
MDA5 – *myeloma differentiation-associated gene 5*  
MET – microscopia eletrônica de transmissão  
MHC – complexo principal de histocompatibilidade

MOBV – vírus Mobala  
MOPV – vírus Mopeia  
MPLA – adjuvante monofosforil lipídeo A  
OLVV – vírus Oliveros  
NF $\kappa$ B – fator nuclear kappa B  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PAHO – Organização Pan Americana de Saúde  
PAMP – padrões moleculares associados a agentes patogênicos  
PARV – vírus Paraná  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
PEI - polietilenimina  
PICV – vírus Pichindé  
PIRV – vírus Pirital  
PML – proteína da leucemia promielocítica  
PRH – proteína do homeodomínio rico em prolina  
PRNT – *plaque reduction neutralization test*  
PRR – receptor de reconhecimento de padrão  
RdRp – RNA polimerase dependente de RNA  
RE – retículo endoplasmático  
RIG-I – *Retinoic acid inducible gene I product*  
RNA – ácido ribonucleico  
RNAi – RNA de interferência  
RT-PCR – Reação de Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase  
SABV – vírus Sabiá  
SSP – peptídeo sinal estável  
ssRNA – RNA simples fita  
STAT – sinal de transdução e ativação da transcrição  
TAMV – vírus Tamiami  
TCRV – vírus Tacaribe  
TGN- região trans-Golgi  
TLR – receptor Toll-like  
TRIF – *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon  $\beta$*   
UTR – região não traduzida  
VLP – *virus-like particle*  
WWAV – vírus Whitewater Arroyo



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>23</b>
2.1 <i>VIRUS-LIKE PARTICLES</i> : O QUE SÃO E FUNÇÕES	23
2.2 ARENAVÍRUS, VÍRUS JUNÍN E A FEBRE HEMORRÁGICA DA ARGENTINA: ASPECTOS GERAIS	26
2.2.1 Proteína Z: estrutura, funções e o papel como VLP	32
2.3 DENGUE	35
2.3.1 Aspectos imunológicos	39
2.3.2 Vacinas experimentais contra Dengue: principais candidatos	43
2.3.3 Proteína do envelope e estratégia de vacinação	45
<b>3 HIPÓTESE</b>	<b>52</b>
4.1 OBJETIVO GERAL	53
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
<b>5 METODOLOGIA</b>	<b>54</b>
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CONSERVADOS DA PROTEÍNA DO ENVELOPE (E) DO VÍRUS DA DENGUE	54
5.2 CONSTRUÇÕES DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES	55
5.2.1 Fragmentos gênicos codificantes dos peptídeos conservados DENV-P1 e DENV-P2	55
5.2.2 Transformação dos plasmídeos e extração do DNA plasmidial	56
5.2.3 Clonagem dos fragmentos de DNA DENV-P1 e DENV-P2 no plasmídeo pZ	57
5.2.4 Confirmação do inserto e sequenciamento	58
5.2.5 Maxiprep para obtenção do DNA plasmidial em grande quantidade	58
5.3 CULTIVO CELULAR E EXPRESSÃO DAS VLPS (Z/GFP, Z/DENV-P1 E Z/DENV-P2)	61
5.4 ENSAIO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VLPS	61
5.5 PURIFICAÇÃO DAS VLPS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO	62
5.6 VISUALIZAÇÃO DAS VLPS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	63
5.7 IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS	63

5.8 ENSAIOS DE ELISA ( <i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> ) E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	65
5.9 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA VIRAL ( <i>PRNT – PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST</i> ) UTILIZANDO VÍRUS DA DENGUE .....	66
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
6.1 CLONAGEM PLASMIDIAL.....	68
<b>6.1.1 Confirmação da clonagem através de análise eletroforética .....</b>	<b>68</b>
<b>6.1.2 Confirmação da clonagem através de sequenciamento .....</b>	<b>69</b>
6.2 MAXIPREP PARA OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM GRANDE QUANTIDADE.....	71
6.3 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VLPs ATRAVÉS DE ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....	72
6.4 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VLPS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	74
6.5 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DAS VACINAS CONSTRUÍDAS.....	74
6.6 ENSAIOS DE PROTEÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	76
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Dengue é uma doença infecciosa viral humana, transmitida por mosquitos que se tornou uma grande preocupação de saúde pública mundial devido sua alta prevalência, atingindo mais de cem países tropicais e subtropicais. Nos últimos cinquenta anos, a incidência global desta doença aumentou cerca 30 vezes e continua crescendo nos dias atuais (WHO, 2014). Dados relatados pela Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) mostraram que em 2011, mais de um milhão de casos foram registrados na América Latina (TAPIA-CONYER, BETANCOURT-CRAVIOTO, MÉNDEZ-GALVÁN, 2012). No Brasil, somente em 2008, no estado do Rio de Janeiro, houveram mais de 158.000 casos reportados, aproximadamente 9.000 internações e 230 mortes entre os meses de Janeiro e Abril (BARRETO, TEIXEIRA, 2008). Este número crescente de incidência da doença está associado a fatores socioeconômicos, ambientais e urbanos, intimamente relacionados às baixas condições sanitárias, às condições climáticas de algumas regiões e, aos processos migratórios, devido à movimentação global dos infectados (ALIROL et al., 2011; BARCLAY, 2008; GÓMEZ-DANTÉS, WILLOQUET, 2009). Portanto, esta doença não para de espalhar e como exemplo, vale mencionar que no início de fevereiro de 2015, no município de Itajaí-SC, cidade litorânea a 100 km (quilômetros) de distância da capital de Santa Catarina, 50 casos de Dengue autóctone já foram confirmados e outros 18 pacientes aguardam os resultados dos exames (ITAJAÍ, 2015).

O vírus da Dengue (DENV) possui oficialmente quatro principais sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (WHO, 2014). Sua transmissão em humanos é realizada através da picada de mosquitos fêmeas infectados do gênero *Aedes* (LAMBRECHTS, FAILLOUX, 2012). Sob o ponto de vista patológico, a Dengue pode ser classificada através de diferentes critérios, variando de acordo com os sintomas, severidade e fatores de risco como a presença de outras doenças associadas e idade do paciente (crianças e idosos), entre outros (MALAVIGE et al., 2014).

A infecção natural com um sorotipo de Dengue resulta em imunidade longa duração para o mesmo, entretanto uma segunda infecção por outro sorotipo, o efeito se intensifica devido a um fenômeno conhecido como ADE (*antibody dependent enhancement*) (GUZMAN, VAZQUEZ, 2010). A partir de 2009, a OMS estabeleceu a seguinte classificação clínica para a doença: Dengue sem sinais de alerta, Dengue com sinais de alerta e Dengue grave (HADINEGORO,

2012). Além do diagnóstico clínico, a confirmação da doença é feita por diagnóstico laboratorial, através de técnicas imunológicas ou de Biologia Celular e Molecular (TANG, OOI, 2012).

O seu tratamento é baseado no controle dos sintomas e monitoramento da progressão da doença, incluindo um intenso suporte hidroeletrólítico e reposição sanguínea quando necessário. Até o momento não existe um método terapêutico específico ou uma vacina licenciada disponível no mercado. Além disto, os métodos profiláticos utilizados no combate do mosquito transmissor tem se demonstrado, na maioria das vezes, insuficientes. Portanto, a necessidade de uma vacina multivalente, efetiva contra a Dengue, tem se tornado uma prioridade de saúde pública mundial (RAJAPAKSE, RODRIGO, RAJAPAKSE, 2012; WHO, 2014).

Para as indústrias farmacêuticas é bastante custoso desenvolver e produzir uma vacina, pois é necessária uma tecnologia de ponta e um investimento a longo prazo, uma vez que o tempo médio de estudos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) é acima de 15 anos. Além disto, a legislação que deve ser atendida pelas empresas exige um rigoroso padrão de controle de qualidade, principalmente quando se trata de vacinas vivas. Nos últimas décadas, muitas empresas biotecnológicas deste ramo fecharam, como exemplo em 1967 haviam 26 empresas e em 1980 o número reduziu para 17. No entanto, com a descoberta das vacinas recombinantes, como exemplo contra a Hepatite B e contra o HPV (Papilomavírus Humano), esta fatia do mercado voltou a crescer. Uma estimativa sugere que o mercado de vacinas gire em torno de 24 bilhões de dólares por ano, o que corresponde de 2 a 3% do mercado trilionário da indústria farmacêutica. Apesar destas desvantagens, existem muitos benefícios para a população mundial como a possibilidade de erradicar parcial ou totalmente uma doença endêmica em alguns países, além da economia para os cofres públicos em relação a saúde e aos problemas sociais relacionados. Nos Estados Unidos, somente entre os anos de 1994 e 2013 houve uma economia de aproximadamente 295 bilhões em custos diretos e 1,38 trilhões em custos sociais (LAM, 2015). Por se tratar de uma doença de importância global, a OMS incentiva e prioriza o desenvolvimento de uma vacina contra a Dengue (WHO, 2012a).

A estrutura do vírus da Dengue é composta por sete proteínas não estruturais e, três estruturais: capsídeo (C), membrana (M), inicialmente produzida como prM (pré-membrana) e envelope (E), sendo esta última a responsável pela ligação, ao receptor, e fusão da partícula no endossomo da célula hospedeira. No endossomo, alterações no pH

realizam mudanças conformacionais na proteína E, passando do seu estado inicial de homodímero para trímero, culminando assim na fusão da partícula viral. A proteína E é considerada o maior alvo de anticorpos, incluindo anticorpos neutralizantes, capazes de bloquear a infecção contra o mesmo sorotipo de DENV e, também, anticorpos não neutralizantes, que podem contribuir para o fenômeno ADE (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH, RICE, 2003).

Para este trabalho foram escolhidos dois peptídeos altamente conservados, identificados, previamente por bioinformática pelo professor Dr. Daniel Santos Mansur. O peptídeo de fusão 1 e o peptídeo 2 foram encontrados no domínio II da proteína do envelope de todos os sorotipos de DENV. Estes são considerados importantes, pois se apresentam ao sistema imunológico do hospedeiro apenas durante a mudança de conformação ocorrida pelo envelope viral durante a fusão com a membrana do hospedeiro. Acredita-se que eles são capazes de induzir uma resposta imune protetora, mediada por anticorpos neutralizantes e, portanto, podem ser bons antígenos para o desenvolvimento de um candidato vacinal contra a Dengue (DIAS, 2013; FLEITH, 2014). Desta forma, como proposta para o desenvolvimento do candidato vacinal foram escolhidos os *virus-like particles* (VLPs).

As VLPs são estruturas produzidas através da tecnologia do DNA recombinante, onde a(s) proteína(s), sintetizadas(s) em sistemas de expressão (procarióticos ou eucarióticos), se juntam para formar partículas que mimetizam a estrutura dos vírions nativos sem conter, no entanto, o material genético infeccioso. Esta propriedade é uma grande vantagem, pois não permite a reversão da virulência ou a integração com o genoma do hospedeiro. As VLPs possuem inúmeras aplicações, mas devido as suas características são muito empregadas como vacinas ou como sistemas de liberação vacinal, pois permitem carrear e apresentar epítopos antigênicos ao sistema imunológico de forma eficiente e segura. Alguns exemplos muito utilizados de VLPs do tipo carreador são: o antígeno do *core* da Hepatite B (HBcAg - “*Hepatitis B core antigen*”) e o Papillomavirus Humano do tipo 16 (HPV16) (JENNINGS, BACHMANN, 2008; LEVINE et al., 2009; ROY, NOAD, 2008). Outro exemplo descrito atualmente na literatura é a proteína Z do gênero *Arenavirus* (URATA, DE LA TORRE, 2011).

Os Arenavírus são vírus envelopados de RNA, que possuem três principais proteínas: proteína do nucleocapsídeo (NP), proteínas do envelope SSP, GP1 e GP2 (trímero) e proteína não glicosilada Z. Esses vírus são capazes de causar um tipo de febre hemorrágica em humanos e

sua transmissão ocorre pela infecção das células da mucosa ou por via de mordedura, alimento contaminado e inalação de aerossóis das excreções/secreções de roedores infectados. Um exemplo é o vírus Junín (JUNV) do Novo Mundo, transmitido principalmente por um roedor muito encontrado na área rural, *Calomys musculus*. O JUNV causa a Febre Hemorrágica da Argentina, uma doença severa que pode causar manifestações neurológicas e possui alto índice de mortalidade de 15 a 30% (AMBROSIO et al., 2011; URATA, DE LA TORRE, 2011).

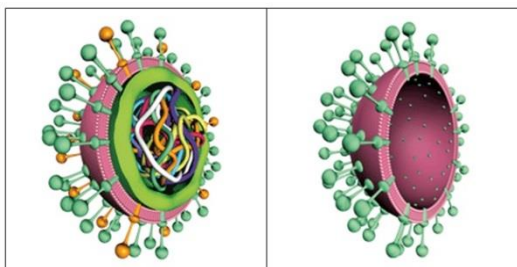
A proteína Z (11 kDa) do vírus Junín é considerada uma proteína de matriz (M). Propriedades biológicas importantes desta proteína já foram descritas na literatura, como interações com fatores celulares, tais como: a Proteína da Leucemia Promielocítica (PML) e o Fator de Iniciação da Tradução Eucariótica (eIF4E), entre outros. No entanto, o grande destaque é a propriedade que esta proteína possui em induzir o brotamento viral. Em vírus envelopados, a simples expressão de uma proteína M pode produzir partículas semelhantes a vírus (VLPs) (URATA, DE LA TORRE, 2011). Estudos realizados pela Universidad Nacional de Quilmes demonstraram esta capacidade que a proteína Z do vírus Junín tem em produzir VLPs (BORIO et al., 2012; GOÑI et al., 2010), que neste trabalho foi explorada como sistema carreador dos peptídeos antigênicos de DENV.

Este trabalho teve como objetivo construir um possível candidato vacinal multivalente contra Dengue, constituído pela proteína Z do vírus Junín e os peptídeos conservados 1 e 2 da proteína E do vírus da Dengue e, avaliar em camundongos a produção de anticorpos e a atividade neutralizante *in vitro* induzida pelos mesmos durante a imunização.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 VIRUS-LIKE PARTICLES: O QUE SÃO E FUNÇÕES

Os vírus são organismos intracelulares obrigatórios compostos por ácido ribonucleico (RNA) ou desoxirribonucleico (DNA) envolvidos por diferentes tipos de proteínas organizadas em uma estrutura tridimensional formando o capsídeo interno (nucleocapsídeo) e o capsídeo externo. Adicionalmente, alguns vírions também possuem um envoltório lipídico com glicoproteínas, denominado de envelope. Em muitas espécies de vírus, tais proteínas são capazes de se agregar na ausência dos ácidos nucleicos, formando estruturas quiméricas denominadas *virus-like particles*. (VLPs), como indicada pela **figura 1** (MORAES, AUGUSTO, CASTILHO, 2008). Deste modo, as VLPs ou partículas pseudovirais são proteínas de automontagem de tamanho variado (geralmente de 22 nm a 150 nm) provenientes do capsídeo dos vírus, sejam eles de DNA ou RNA, envelopados ou não envelopados. As VLPs são consideradas seguras, pois são capazes de mimetizar a estrutura nativa dos vírions, sem conter, no entanto, o material genético infeccioso. Diferentemente dos vetores retrovirais, as VLPs também não possuem enzimas como protease, transcriptase reversa e integrase e, portanto, não se integram no genoma do hospedeiro e não permitem a reversão da virulência (GRGACIC, ANDERSON, 2006; LEVINE et al., 2009; ZELTINS, 2013).



**Figura 1** – Desenho esquemático de um vírus e de uma VLP. **À esquerda:** representação de uma secção longitudinal (metade) de um vírus envelopado, com destaque para o ácido nucleico no interior. **À direita:** representação de uma secção longitudinal (metade) de uma VLP, com destaque para a ausência do ácido nucleico. Fonte: MEDICAGO, 2015.

Estas quimeras (VLPs) podem ser sintetizadas em sistema eucarioto ou procarioto através da tecnologia do DNA recombinante, seja pela simples expressão das proteínas do capsídeo viral (exemplo: papilomavírus, parvovírus, proteína do *core* da Hepatite B, entre outros) ou pela co-expressão de múltiplas proteínas (orbivírus, Ebola e vírus Marburg, vírus da Herpes, rotavírus). Ou seja, podem ser produzidos em diferentes sistemas, incluindo células de mamífero, baculovírus, levedura, vacínia recombinante, *Salmonella*, *Escherichia coli*, replicons alfavírus e plantas. A única exigência para a produção deste tipo de proteína é garantir a correta formação da estrutura da VLP, no qual pode variar dependendo do vírus nativo. Algumas VLPs requerem modificações pós-traducionais complexas durante a sua formação, tais como a clivagem proteolítica, a glicosilação, a fosforilação, a amidação, o que torna possível a produção dos mesmos apenas em células eucarióticas, aumentando assim o custo. Ademais, algumas sequências gênicas podem ser tóxicas e inadequadas para a expressão das proteínas em bactérias ou leveduras (LEVINE et al., 2009; MORAES, AUGUSTO, CASTILHO, 2008). A purificação pode ser realizada através da clarificação (para retirada de restos celulares) após lise celular, por métodos cromatográficos utilizando coluna de separação (exclusão molecular, troca iônica, afinidade, entre outros), ultracentrifugação (por diferença de densidade) em cloreto de céσιο ou gradiente de sacarose (ZELTINS, 2013).

Funcionalmente, os *virus-like particles* podem servir como sistema de liberação de proteínas para dentro das células, além de serem utilizados no tratamento de doenças genéticas através da terapia gênica (KACZMARCZYK et al., 2011), técnica que utiliza a transferência de DNA ou RNA para dentro das células ou tecidos, com o objetivo de bloquear, corrigir ou substituir um gene defeituoso por um gene normal (MORAES, AUGUSTO, CASTILHO, 2008). Entretanto, sua característica mais importante é a capacidade de carrear e apresentar milhares de antígenos disponíveis na sua superfície (epítopo) para o sistema imune de forma repetitiva, se tornando assim, eficientes plataformas tecnológicas para o desenvolvimento de vacinas, como malária, influenza, Dengue, entre outros (GRGACIC, ANDERSON, 2006; LEVINE et al., 2009; ZELTINS, 2013).

Os primeiros estudos com vacina foram realizados com varíola, no ano de 1796 por Edward Jenner (RIEDEL, 2005). Desde esta época, a imunização se tornou uma alternativa cada vez mais frequente na erradicação de algumas doenças infecciosas. O princípio fundamental da vacinação é administrar uma forma morta ou atenuada ou ainda, parte de



um microrganismo (subunidade) que não cause doença, com o objetivo de induzir uma resposta imunológica capaz de proteger contra a infecção pelo patógeno (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2012). Entretanto, a imunogenicidade das vacinas de subunidade é considerada muitas vezes baixa se comparada com as vacinas inativadas ou atenuadas, requerendo assim altas doses, reforços e auxílio de adjuvantes. Deste modo, as VLPs tornaram-se um moderno avanço, pois trouxeram muitas vantagens, como por exemplo, o aumento desta capacidade imunogênica (KUSHNIR, STREATFIELD, YUSIBOV, 2012).

Na maioria das doenças, principalmente as infecciosas como a Dengue, os anticorpos neutralizantes são os principais responsáveis pela proteção contra uma infecção durante uma vacinação. As VLPs, por exemplo, possuem essa característica, pois são bons indutores de anticorpos neutralizantes, uma vez que são capazes de realizar a ativação células B. Como antígenos exógenos, eles também são eficientes indutores de células apresentadoras de antígenos, principalmente células dendríticas (DCs), através do processamento e apresentação por moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) da classe II. A ativação e maturação destas células acontecem através da regulação de moléculas coestimulatórias, produção de citocinas e estimulação de células T CD4<sup>+</sup> auxiliares, acarretando na indução de respostas imunológicas humorais e celulares. Além disso, assim como os vírus, as VLPs também são processadas no citosol pelas DCs e são apresentadas para células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas através moléculas de MHC de classe I, ativando, portanto, respostas antivirais. Vacinas de VLP no geral não necessitam da administração dos adjuvantes, substâncias responsáveis por aumentar a resposta imunológica ao antígeno. No entanto, para melhorar a ativação das respostas citotóxicas mediadas por células T e células apresentadoras de antígenos, a presença do adjuvante pode ser necessária. Os mecanismos de ativação variam de acordo com cada tipo de VLP, tamanho, estrutura, via de administração e também de acordo com a presença ou ausência e tipo de adjuvante (KUSHNIR, STREATFIELD, YUSIBOV, 2012; LEVINE et al., 2009).

Os primeiros trabalhos com VLPs foram realizados na década de 80, através da expressão da proteína HBsAg, antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (HBV) na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo assim partículas de 22 nm de tamanho, similar as partículas virais secretadas por células humanas (MCALEER et al., 1984; VALENZUELA et al., 1982). A partir do HBsAg, foi construída a primeira vacina licenciada de VLP. Ela é administrada por via

intramuscular, é altamente imunogênica e induz altos títulos de anticorpos anti-HBs por um longo período de tempo (). Outro exemplo de vacina de VLP de sucesso disponível desde 2006 é a proteína L1 do capsídeo maior do Papilomavírus humano (HPV), capaz de induzir uma resposta imune contra HPV (subtipos 16 e 18), causador do câncer cervical, uma doença que atinge mulheres que mantém relações sexuais desprotegidas (KIRNBAUER et al., 1992; LEVINE et al., 2009).

Após o êxito no desenvolvimento destas vacinas, estas quimeras ficaram popularmente conhecidas e se tornaram alvo no desenvolvimento de candidatos vacinais contra outras doenças de grande importância de saúde pública como: a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), influenza, malária, Dengue, entre outros (LEVINE et al., 2009; PUMPENS, GREENS, 2001; ZELTINS, 2013). Outra VLP de HBV, descrita na literatura (MILICH et al., 1988), o antígeno do *core* da Hepatite B (HBcAg), altamente imunogênica *in vivo*, foi utilizada pelos nossos colaboradores como carreador da proteína circunsporozoíta (CSP) de malária e os resultados obtidos na vacinação foram satisfatórios (ALMEIDA et al., 2014). Outra partícula pseudoviral descrita atualmente e ainda pouco conhecida é a proteína Z do vírus Junín (JUNV), pertencente à família *Arenaviridae*. O JUNV causa uma doença conhecida como a Febre Hemorrágica da Argentina (BORIO et al., 2012).

## 2.2 ARENAVÍRUS, VÍRUS JUNÍN E A FEBRE HEMORRÁGICA DA ARGENTINA: ASPECTOS GERAIS

*Arenaviridae* é uma família composta por diversos vírus de RNA, envelopados, bissegmentados e de sentido negativo. No total, existem 25 espécies oficialmente classificadas (2013) pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), incluindo várias de importância para a saúde humana. Sua taxonomia pode ser dividida de acordo com a distribuição geográfica, análise filogenética e sorocomplexo em: Arenavírus do Velho Mundo e Arenavírus do Novo Mundo, também conhecidas como complexo LASV-LCMV e complexo de Tacaribe, respectivamente (WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013; ZAPATA, SALVATO, 2012). Além destas espécies, existem outras que foram descobertas recentemente, como o vírus Patawa, encontrado na região da Guiana Francesa (LAVERGNE et al., 2013). As arenaviroses são transmitidas naturalmente, por roedores infectados ou por morcegos (vírus Tacaribe), via exposição da mucosa aos aerossóis, urina, saliva,

sangue infectado e também contato direto da pele lesionada com o material infeccioso, ou artificialmente por acidente de laboratório (TCRV, FLEV e SABV) e transplante de órgãos (LCMV). Estima-se que pelo menos dez espécies infectam humanos (URATA, DE LA TORRE, 2011; WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013; ZAPATA, SALVATO, 2012).

Os Arenavírus do Velho Mundo infectam roedores da família *Muridae*, subfamília *Murinae* e incluem, por exemplo: o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) distribuído em todo mundo e os vírus de países africanos como: Lassa (LASV), Ippy (IPPV), Mobala (MOBV), Mopeia (MOPV), entre outros. Os do Novo Mundo infectam principalmente roedores da família *Muridae*, subfamília *Sigmodontinae*, especialmente nas Américas, são eles: Junín (JUNV), Allpahuayo (ALLV), Amapari (AMAV), Bear Canyon (BCNV), Flexal (FLXV), Guanarito (GTOV), Latino (LATV), Machupo (MACV), Oliveros (OLVV), Paraná (PARV), Pichindé (PICV), Pirital (PIRV), Sabiá (SABV), Tacaribe (TCRV), Tamiami (TAMV), Whitewater Arroyo (WWAVs), entre outros, conforme **quadro 1**. O vírus LASV é bastante conhecido por causar a Febre de Lassa, uma doença que atinge milhares de indivíduos nos países do oeste africano e possui um alto índice de mortalidade (GOÑI et al., 2010; URATA, DE LA TORRE, 2011; WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013; ZAPATA, SALVATO, 2013). Análises de sequenciamento demonstraram que os Arenavírus possuem homologia com os Filovírus e Bunyavírus e também com um vírus que infecta cobras e que causa a Doença do Corpúsculo de Inclusão (STENGLEIN et al., 2012).

	<b>Vírus</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Reservatório</b>	<b>Doença Humana</b>
<b>Arenavírus do Velho Mundo</b>	<b>Vírus Dandenong*</b>	Iugoslávia (?) Austrália (?)	Desconhecido	Doença febril com encefalopatia (transplantado)
	<b>Vírus Gbagroube*</b>	Costa do Marfim	<i>Mus (Nannomys) setulosus</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Ippy</b>	República Central da África	<i>Arvicanthus spp.</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Lassa</b>	África Ocidental	<i>Mastomys natalensis</i>	Doença febril, febre hemorrágica em casos graves
	<b>Vírus da Coriomeningite Linfocítica</b>	Global	<i>Mus musculus</i>	Doença febril, meningite asséptica em casos graves
	<b>Vírus Lujo</b>	Zâmbia	Desconhecido	Febre hemorrágica
	<b>Vírus Luna*</b>	Zâmbia	<i>Mastomys natalensis</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Kodoko*</b>	Guiné	<i>Mus (Nannomys) setulosus</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Menekre*</b>	Costa do Marfim	<i>Hylomyscus spp.</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Merino Walk*</b>	África do Sul	<i>Myotomis unisulcatus</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Mobala</b>	República Central da África	<i>Praomys jacksoni</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Mopeia</b>	Moçambique	<i>Mastomys natalensis</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Morogoro</b>	Tanzânia	<i>Mastomys spp.</i>	Nenhuma conhecida
<b>Arenavírus do Novo Mundo</b>	<b>Vírus Alpahuayo</b>	Peru	<i>Oecomys spp.</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Amapari</b>	Brasil	<i>Oryzomys gaeldi</i> <i>Neacomys guinae</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Bear Canyon</b>	EUA	<i>Peromyscus californicus</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Big Brushy Tank*</b>	EUA	<i>Neotoma albigula</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Catarina*</b>	EUA	<i>Neotoma micropus</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Chapare</b>	Bolívia	Desconhecido	Febre hemorrágica
	<b>Vírus Cupixi</b>	Brasil	<i>Oryzomys spp.</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Flexal</b>	Brasil	<i>Oryzomys spp.</i>	Doença febril (Adquirida em laboratório)
	<b>Vírus Guanarito</b>	Venezuela	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Febre hemorrágica
	<b>Vírus Junin</b>	Argentina	<i>Calomys musculinus</i>	Febre hemorrágica
	<b>Vírus Latino</b>	Bolívia	<i>Calomys callosus</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Machupo</b>	Bolívia	<i>Calomys callosus</i>	Febre hemorrágica
	<b>Vírus Oliveros</b>	Argentina	<i>Bolomys spp.</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Paraná</b>	Paraguai	<i>Oryzomys buccinatus</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Pichinde</b>	Colômbia	<i>Oryzomys albigularis</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Pinhal</b>	Brasil	<i>Calomys tener</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Pirital</b>	Venezuela	<i>Sigmodon alstoni</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Real de Catorce*</b>	México	<i>Neotoma leucodon</i>	Nenhuma conhecida
	<b>Vírus Sabiá</b>	Brasil	Desconhecido	Febre hemorrágica
	<b>Vírus Skinner Tank*</b>	EUA	<i>Neotoma mexicana</i>	Nenhuma conhecida
<b>Vírus Tacaribe</b>	Trindade	<i>Artibeus spp. (Morcego)</i>	Possível doença febril (adquirida em laboratório)	
<b>Vírus Tamiami</b>	EUA	<i>Sigmodon hispidus</i>	Nenhuma conhecida	
<b>Vírus Tonto Creek</b>	EUA	<i>Neotoma albigula</i>	Nenhuma conhecida	
<b>Vírus Whitewater Arroyo</b>	EUA	<i>Neotoma albigula</i>	Possível doença febril (adquirida em laboratório)	

\* espécies propostas ainda não classificadas pelo ICTV.

**Quadro 1** – Arenavírus do Novo e Velho Mundo. Esta tabela cita: as espécies dos vírus, a distribuição geográfica, as espécies transmissoras e as respectivas doenças causadas pelos Arenavírus do Novo e Velho Mundo. Fonte: Adaptado WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013.

O vírus JUNV é o responsável por causar uma doença denominada Febre Hemorrágica da Argentina (FHA), que atinge, sobretudo, agricultores argentinos (GÓMEZ et al., 2011). Acredita-se que aproximadamente cinco milhões de pessoas encontram-se em área de risco. Apesar de ser uma doença encontrada em grande parte na região noroeste e central da Argentina, já foram diagnosticados alguns casos no Brasil em 2010, na cidade de Nova Xavantina, estado do Mato Grosso (MACHADO et al., 2010). Existem várias espécies de roedores considerados como reservatórios naturais como: o *Calomys musculinus*, principal transmissor da doença e, outros do gênero *Calomys* incluindo *Calomys laucha*, além do *Akodon azarae* e *Orizomys flavescens*. O período de incubação viral varia de 6 a 14 dias, começando com sintomas semelhantes à gripe, como febre, mialgia, artralgia, dor de cabeça, dor retro orbital, conjuntivite, entre outros. Além disto, também podem aparecer dores epigástricas, fotofobia, tonturas, constipação e leve diarreia. Na segunda semana podem surgir alguns sinais vasculares, hemorrágicos e leves sinais neurológicos, tais como rubor na face, peito e pescoço, sangramento da gengiva, petéquias principalmente na região da mucosa oral e região axilar, hiporreflexia e confusão mental. Sinais mais graves, porém menos frequentes também podem estar presentes como: hematêmese, melena, hemoptise, sangramento nasal (epistaxe), uterino (metrorragia), hematomas, hematúria e haver ocorrência de infecção por patógenos oportunistas como bactérias e *Candida*. Na fase final da infecção o paciente pode permanecer irritado, letárgico e com muito tremor nas mãos e na língua, evoluindo para um quadro severo caracterizado por arreflexia, hipotonia muscular, ataxia, seguido de delírio, convulsões generalizadas e coma. O agravamento do quadro clínico, causado pela hemorragia e alterações no Sistema Nervoso Central pode levar o paciente a óbito, correspondendo a um índice de mortalidade de 15 a 30% (AMBROSIO et al., 2011; URATA, DE LA TORRE, 2011).

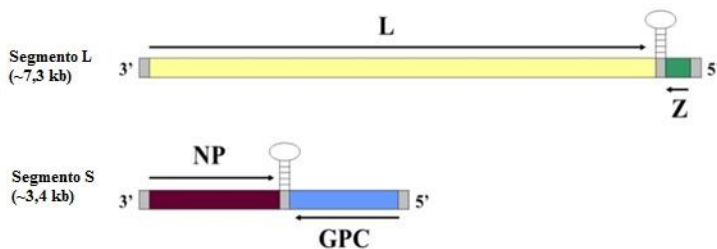
O diagnóstico da FHA pode ser realizado através de exames laboratoriais, como contagem de leucócitos e plaquetas e através de técnicas de Biologia Molecular, Imunologia e Virologia. A detecção de JUNV no soro dos pacientes pode ser realizada a partir do RNA (segmento S) através de RT-PCR, Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase. Ademais, pode ser empregado ensaio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando a nucleoproteína como antígeno alvo. Anticorpos neutralizantes anti-JUNV, subtipo IgG<sub>1</sub>, são encontrados somente a

partir do décimo segundo dia de infecção (LOZANO et al., 1995; URE et al., 2008). O tratamento pode ser obtido com administração intravenosa do plasma normal ou plasma imune, sendo que a utilização do plasma imune é capaz de reduzir os riscos de morte para apenas 1% (ENRIA, BRIGGLIER, SÁNCHEZ, 2008). As arenaviroses, principalmente a Febre de Lassa, também podem ser tratadas com o antiviral ribavarina, um análogo de um nucleosídeo, com atividade de amplo espectro contra vírus de RNA. Apesar de ser um tratamento auxiliar em alguns casos, este fármaco pode causar alguns efeitos adversos. Além disto, testes *in vitro* utilizando poliovírus demonstraram que a ribavarina é mutagênica para os vírus de RNA (CROTTY, CAMERON, ANDINO, 2002).

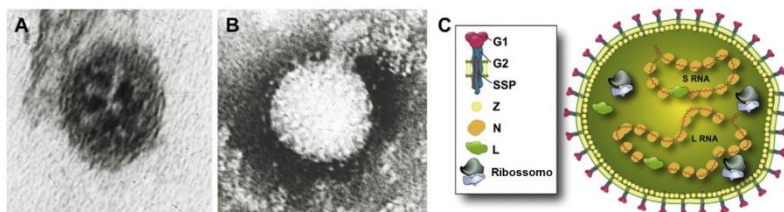
A estrutura viral dos arenavírus é pleomórfica, frequentemente esférica. Ela é composta pelas proteínas: nucleoproteína (NP), precursor do complexo de glicoproteínas de superfície (GPC), polimerase (L) e a proteína Z. O genoma é formado por duas cadeias, fragmento pequeno de aproximadamente 3,5 kb (*small* – “S”) e grande de ~7,3 kb (*large* – “L”), que codificam na forma ambisenso (dois sentidos), estas quatro proteínas. O segmento S codifica as proteínas NP e GPC e suas sequências são separadas por uma região intergênica não codificante (IGR) em estrutura de grampo. Inicialmente GPC é expresso como uma poliproteína precursora, onde o peptídeo sinal estável (SSP – *stable signal peptide*) é clivado dentro do retículo endoplasmático por uma peptidase sinal celular e o produto final é uma proteína de importância para a formação do complexo maduro. Em uma segunda etapa, SSP transita para dentro do Complexo de Golgi juntamente com o precursor imaturo denominado GP1/2, no qual sofre uma nova clivagem pela enzima SKI-1/S1P, produzindo deste modo, as subunidades GP1 e GP2. O trímero formado por SSP, GP1 e GP2 se dirige, portanto, para a membrana plasmática, mediando a montagem e o início da infecção viral. A proteína NP possui inúmeras funções, como: encapsular os dois segmentos de RNA viral e se associar com a proteína L (polimerase de RNA dependente de RNA – RdRp), formando o complexo de ribonucleoproteína (RNP), importante para replicação e transcrição viral e, interagir com a proteína Z durante a montagem viral. Além disto, NP desempenha importante papel na supressão da resposta imune inata, faz ligações peptídicas e possui atividade exonucleásica (BEDERKA et al., 2014; URATA, DE LA TORRE, 2011; WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013; ZAPATA, SALVATO, 2013).

O segmento L codifica a polimerase L e a proteína Z (FEHLING, LENNARTZ, STRECKER, 2012), este último possui formato de dedo

de zinco, ou seja possui átomos de zinco, importantes para a estabilidade do seu domínio (KRISHNA, MAJUMDAR, GRISHIN, 2003). A proteína Z possui diversas funções, atuando em diferentes estágios da infecção viral, ou seja, atua como proteína de matriz, interage com L e NP regulando a replicação e a transcrição viral, permeia a montagem, apresenta atividade pró-apoptótica, interage com proteínas celulares e possui atividade antagonista ao interferon (IFN) produzido pela célula hospedeira, além de ser imprescindível para o brotamento viral. As sequências de L e NP são separadas por IGR. Além disso, os dois segmentos de RNA são flanqueadas por regiões não traduzidas (UTR – *untranslated regions*). Ademais, os arenavírus possuem ainda, ribossomos do hospedeiro, cuja finalidade é desconhecida. As **figuras 2** e **3** ilustram a composição do genoma e da estrutura viral (FEHLING, LENNARTZ, STRECKER, 2012; URATA, DE LA TORRE, 2011; ZAPATA, SALVATO, 2013).



**Figura 2** – RNA dos Arenavírus. O desenho acima mostra o segmento L, indicando os genes L (amarelo) e Z (verde). Abaixo, o segmento S, indicando os genes NP (roxo) e GPC (azul). Entre os genes encontra-se IGR. As flechas indicam o sentido da transcrição. Fonte: Adaptado de WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013.

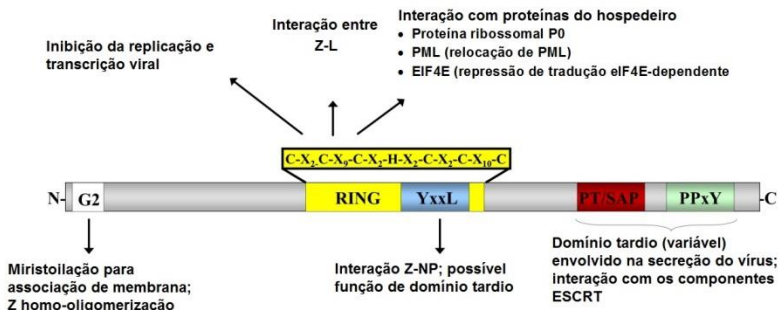


**Figura 3** – Microscopia eletrônica de transmissão e desenho esquemático de JUNV. **A.** Primeira foto de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de uma partícula madura do vírus JUNV (aumento 150.000X ) **B.** Constraste negativo do vírus JUNV brotando da membrana plasmática (MET- aumento de

200.000X); originais E.F Lascano C. Desenho esquemático do vírus JUNV. Fonte: Adaptado de GÓMEZ et al., 2011.

### 2.2.1 Proteína Z: estrutura, funções e o papel como VLP

A estrutura da proteína Z é composta por um sítio N-terminal de glicina miristoilada no aminoácido de posição 2 (G2), por um domínio conservado RING localizado ao centro, formado por duas regiões de ligações de átomos de zinco e por vários domínios tardios na região C-terminal, denominados como PT/SAP, PPxY e o domínio tardio putativo YxxL. Estudos com a proteína Z do vírus LASV sugerem que as porções N (resíduos 1-29) e C-terminal (71-99), flanqueadas pelo domínio RING, são altamente flexíveis e, portanto, permite Z exibir diferentes conformações. O sítio de miristoilação N-terminal e o domínio tardio YxxL são conservados em todos os Arenavírus, já os domínios tardios na região C-terminal diferem entre as espécies do Novo e Velho Mundo, tanto pelo número quanto pela posição relativa, conforme **figura 4** (FEHLING, LENNARTZ, STRECKER, 2012; WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013).

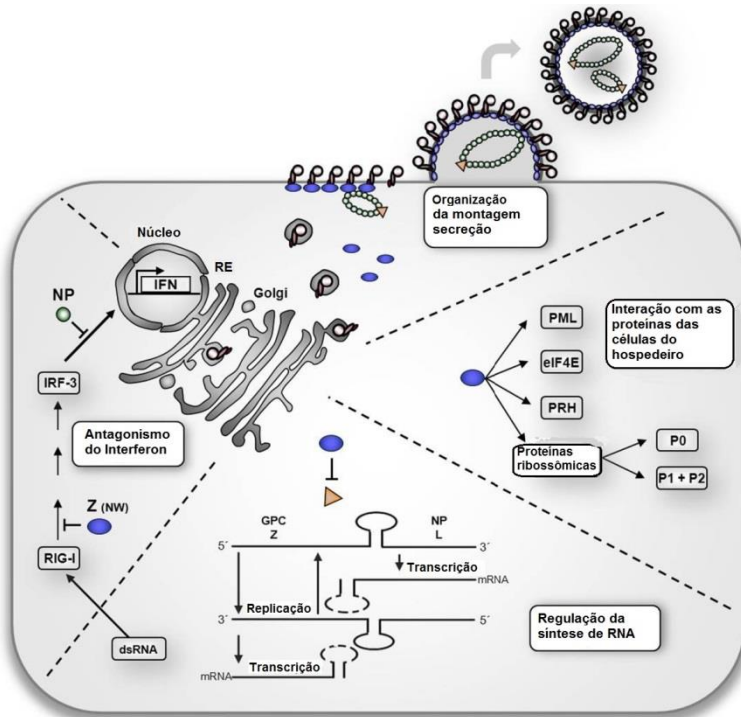


**Figura 4** – Estrutura linear da proteína Z de JUNV. Destaques para a porção N-terminal com grupo miristoil na glicina de posição 2, domínio RING (amarelo) e domínios tardios YxxL (azul), PT/SAP (vermelho) e PPxY (verde claro). As flechas indicam as diferentes funções de Z. Fonte: Adaptado de WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013.

Alguns estudos com TCRV mostraram que a proteína Z se liga a polimerase L, formando homo oligômeros, regulando a replicação e a transcrição vira (LOUREIRO et al., 2011). Além disto, Z interage com



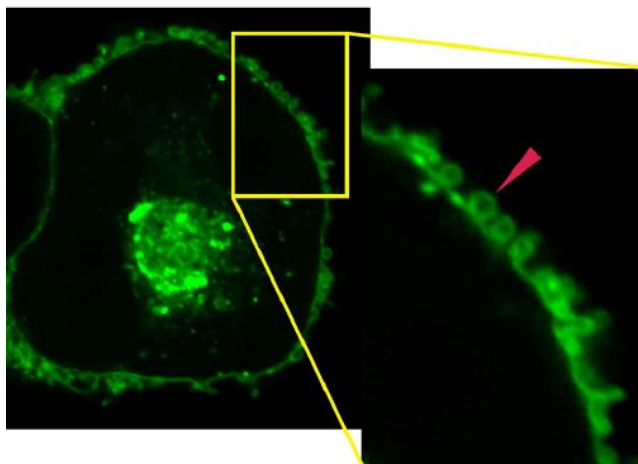
GPC, auxiliando a montagem e o brotamento viral, além de interagir com vários fatores celulares, como PRH (Proteína de Homeodomínio rico em prolina), a proteína PML (Proteína da Leucemia Promioclótica), deslocando PML do núcleo para o citoplasma, contribuindo para a evasão da apoptose pela célula hospedeira. Além do mais, a proteína Z sequestra, ou seja, inibe as proteínas P ribossomais e o Fator 4E de Iniciação da Tradução (eIF4E). O fator eIF4E está indiretamente associado com o Fator Regulatório 7 de Interferon (IRF-7), importante na regulação do Interferon tipo I, produzida por células dendríticas. Alguns estudos demonstraram que a função mediada pela proteína Z na regulação de IFN acontece somente em Arnavírus do Novo Mundo (DWYER et al., 2000; FEHLING, LENNARTZ, STRECKER, 2012; URATA & de la TORRE, 2011; WOLFF, EBIHARA, GROSETH, 2013). A proteína Z também é capaz de se ligar ao sensor celular de RNA viral denominado RIG-I (*Retinoic acid Inducible Gene I product*), que regula a produção de interferon beta (IFN- $\beta$ ). Deste modo, Z inibe indiretamente a resposta antiviral mediada por IFN- $\beta$  (FAN, BRIESE, LIPKIN, 2010). Outro antagonista de interferon é a proteína NP, que atua bloqueando e impedindo a ativação e a translocação nuclear de IFN-3. Desse modo, Z tem se tornado um importante alvo para o desenvolvimento de antivirais, como por exemplo, o uso de dissulfetos aromáticos atuando na ligação  $Zn^{++}$  do domínio RING. A modificação pós-traducional constituída pela presença do grupo miristoil é muito importante para que aconteçam as interações proteína-proteína através de Z. A **figura 5** ilustra as diferentes funções desta proteína dentro da célula (FEHLING, LENNARTZ, STRECKER, 2012; GARCÍA, CANDURRA, DAMONTE, 2000).



**Figura 5** – Funções da proteína Z dentro da célula. Desenho esquemático da célula hospedeira, com evidência para as diferentes finalidades da proteína Z (Arenavírus) na infecção viral. Fonte: Adaptado de FEHLING, LENNARTZ, STRECKER, 2012.

Para que ocorra o brotamento viral, muitos vírus envelopados possuem uma proteína de matriz (M). Para desempenhar esta função, tal proteína M frequentemente possui um domínio L, incluindo os motivos PT/SAP, PPXY, e YPX<sub>n</sub>L (YPXL). Estes motivos se ligam a fatores celulares específicos, como por exemplo o Tsg101, um componente do ESCRT-1 (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport-1*), iniciando assim o mecanismo de brotamento viral. É por um mecanismo semelhante que a proteína Z dos Arenavírus atua como M. A interação com diversas proteínas e fatores celulares é bastante complexa, mas esta capacidade de automontagem e de induzir o brotamento viral faz com que Z desempenhe a função de VLP. Existem alguns relatos na literatura utilizando Z do vírus Lassa como VLP, no entanto não existem muitos

estudos envolvendo a tecnologia do vírus Junín (BRANCO et al., 2010; FEHLING, LENNARTZ, STRECKER, 2012, URATA, DE LA TORRE, 2011). A primeira pesquisa foi realizada na Argentina por Borio e colaboradores, no ano de 2012. Estes pesquisadores conseguiram provar que a proteína Z do vírus Junín é capaz de formar *virus-like-particles* e carrear antígenos. Como prova deste conceito, foi utilizado o GFP (Proteína Verde Fluorescente) como antígeno. Para tanto, foram realizados ensaios de: clonagem, expressão das quimeras em cultura de células, Western Blot para confirmação, microscopia confocal (**figura 6**) e eletrônica de transmissão para visualização das estruturas (BORIO et al., 2012).



**Figura 6** – Célula expressando VLP Z-JUNV/ GFP. Células HEK 293T transfectadas com plasmídeo recombinante contendo genes com sequências codificadoras para VLP do vírus Junín (proteína Z) e GFP. Foto de microscopia confocal de fluorescência. Fonte: BORIO, 2012.

### 2.3 DENGUE

A Dengue é uma doença infecciosa viral humana que atinge mais de cem países de clima tropical e subtropical, abrangendo a África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental. A Organização Mundial da Saúde estima que mais de 2,5 bilhões de pessoas (aproximadamente 40% da população mundial) vivem em área de risco, incluindo área urbana e semiurbana e cerca de 70% da

população exposta encontra-se na região da Ásia e do Pacífico. Por ano, aproximadamente 50-100 milhões de infecções de Dengue ocorrem em todo o mundo. Destes, cerca de 500.000 pessoas com Dengue grave, maioria crianças, necessitam ser hospitalizados e 2,5% das pessoas afetadas com a doença morrem. Em 2008, nas Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental o número de casos ultrapassaram 1,2 milhões e, em 2010 foram mais de 2,3 milhões. Em 2013, somente nas Américas foram notificados 2,35 milhões de casos, dos quais 37.687 eram de Dengue grave (WHO, 2014). No Brasil, em 2014 (semana 41, dados do dia 19 de Dezembro) houve 574.612 notificações de suspeita de Dengue, sendo 8.423 confirmados por exames laboratoriais, destes 644 tiveram Dengue grave e no total foram 377 mortes (PAHO, 2014).

A transmissão do vírus da Dengue (DENV), causador da doença em humanos, é realizada através da picada de mosquitos fêmeas infectados do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis*), sendo o *A. aegypti* o vetor primário. O *A. aegypti* é encontrado em áreas tropicais e subtropicais, possui hábitos diurnos, *habitat* urbano, se reproduz em reservatórios artificiais contendo água parada e seus ovos são capazes de sobreviver por longo período de tempo, uma vez que são capazes de suportar a dessecação. Apesar de possuir baixa competência como vetor e reduzida capacidade para picar seres humanos, o *A. albopictus* é altamente adaptável, devido a sua alta tolerância a temperaturas abaixo do congelamento, capacidade de hibernação e de abrigo em micro *habitat*, podendo sobreviver nas regiões temperadas mais frias da Europa e atualmente é considerado o vetor secundário. No mosquito infectado, após um tempo de incubação viral, de aproximadamente 4-10 dias, o mesmo se torna apto a transmitir o vírus por todo o resto de sua vida. Nos pacientes, logo após os primeiros sintomas, em geral 4-5 dias, o vírus pode ser transmitido para outros mosquitos *Aedes* não infectados, encerrando assim o ciclo de transmissão (LAMBRECHTS, SCOTT, GUBLER, 2010; LAMBRECHTS, FAILLOUX, 2012; MALAVIGE et al., 2004; WHO, 2014).

Após o período de incubação, a doença se instala rapidamente e pode ser dividida em três fases: febril, crítica e de recuperação. A fase febril é caracterizada por uma febre alta, aguda e repentina. A duração varia de 2-7 dias e frequentemente é acompanhado de rubor facial, eritema cutâneo e generalizado, dores no corpo, mialgia, artralgia e dores de cabeça. Além disso, pode ocorrer anorexia, náuseas e vômitos. Existe um teste clínico conhecido como a prova do laço, que quando positivo pode aumentar a suspeita de Dengue. Nesta fase, não é possível

afirmar se a doença será grave ou não, tornando-se necessário o acompanhamento do paciente. Na fase crítica, a febre abaixa um pouco (37,5-38°C) e se mantém por 3-7 dias, onde pode ocorrer, então, um aumento da permeabilidade capilar e dos níveis do hematócrito, além de leucopenia progressiva seguida por um rápido decréscimo do número de plaquetas e extravasamento de plasma. A perda do plasma pode variar e neste momento o monitoramento é imprescindível, pois pode ocorrer choque. Se o paciente sobrevive por 24-48 horas na fase crítica, dá-se o início a recuperação: ocorre uma reabsorção do fluido do compartimento extravascular, uma melhora do bem-estar e do apetite, diminuição dos sintomas gastrointestinais, estabilização do hematócrito e aumento da contagem de células brancas. Na recuperação, é comum ocorrer bradicardia, prurido e alterações no eletrocardiograma, entre outros. A Dengue grave é definida por extravasamento de plasma que pode levar ao choque da Dengue (taquicardia, extremidades frias e úmidas, pulso fraco) e/ou acúmulo de líquido com ou sem sintomas respiratórios, hemorragia grave e falência dos órgãos (WHO, 2009).

Sob o ponto de vista clínico, a OMS estabeleceu desde 2009 uma nova classificação: Dengue sem sinais de alerta (grupo A), Dengue com sinais de alerta (grupo B) e Dengue grave ou severa (grupo C). O grupo A é aquele onde os pacientes não apresentam sinais de alerta e podem ser tratados em casa através da reposição de líquido e administração de paracetamol em caso de febre. Não é recomendado o uso de ácido acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno ou outros anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ou injeções intramusculares, pois podem agravar o sangramento e a gastrite. Pacientes que apresentam sinais de alerta e/ou condições que possam dificultar o tratamento (grupo B), como: idade (criança e idoso), gravidez, obesidade, diabetes mellitus, hipertensão, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, doenças hemolíticas crônicas tal como doença falciforme, doenças autoimunes ou problemas sociais (moram longe de uma unidade de saúde ou sem condições adequadas de transporte) necessitam ser hospitalizados. Na existência de desidratação e alteração no hematócrito, faz-se a administração intravenosa de soluções isotônicas, como salina a 0,9%, de Hartmann e solução de lactato de Ringer. O monitoramento pelos profissionais de saúde dos sinais vitais, da perfusão periférica, produção de urina, hematócrito, glicemia e funções dos órgãos como: perfil renal, hepático, de coagulação, é indispensável. Em casos de Dengue grave (grupo C), os acometidos devem ser internados em unidades emergenciais de saúde que realizem transfusão sanguínea. A reposição volêmica deve ser realizada de forma criteriosa e muitas vezes se faz necessária a

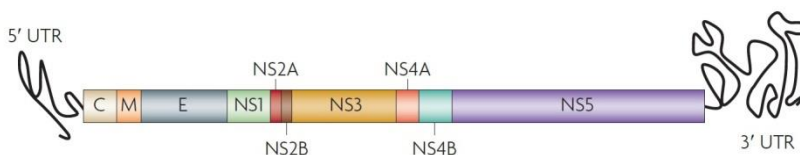
ressuscitação por fluidos (coloides e cristaloides), para restabelecer o débito cardíaco e a oxigenação (HADINEGORO, 2012;WHO, 2012b).

A confirmação da doença é feita por diagnóstico laboratorial, através de ensaios de Biologia Celular e Molecular ou técnicas imunológicas. Podem ser empregados testes de RT-PCR (convencional ou tempo real) para detecção do RNA viral extraído do sangue, soro ou plasma, seja por ensaio *singleplex* (detecção de apenas um sorotipo por vez) ou *multiplex* (detecção de todos os sorotipos em uma única vez). Ademais, também pode ser realizada a detecção do antígeno NS1 ou outras proteínas da membrana através de ensaio de ELISA e *dot blot*, ou por detecção direta ou de captura dos anticorpos anti-Dengue (IgM e IgG), utilizando kits comerciais. Este último é o mais utilizado. Dentre estes, existem diversas variações, além de outros ensaios, como por exemplo, isolamento do vírus da Dengue através da utilização de cultura de células e inoculação em camundongos (TANG, OOI, 2012; WHO, 2009).

A prevenção está baseada no controle do mosquito transmissor, através da combinação de três métodos: químico (uso de inseticidas), biológico e ambiental. Apesar dos esforços governamentais em tentar reduzir os focos do mosquito, o número de casos de Dengue continua aumentando a cada ano, tornando prioritário o desenvolvimento de novas medidas. Existem vários estudos envolvendo candidatos vacinais, em diferentes fases de desenvolvimento, entretanto, até o momento não existe nenhuma vacina contra a Dengue, licenciada e disponível no mercado. A OMS prioriza metas globais até 2020, para reduzir respectivamente em 50% e 25% a mortalidade e a morbidade por esta doença. Dentre tais metas, estão: melhorias no diagnóstico, controle sustentável do vetor e na gestão e monitoramento dos casos, aumento do número de profissionais de saúde, estabelecimento de indicadores e planos emergenciais, tornando o atendimento mais rápido e acessível e, a implementação, no futuro, de uma vacina segura, eficaz e com ótimo custo-benefício. E para dar suporte a estes objetivos, a OMS incentiva a pesquisa nestas diversas áreas (WHO, 2012a).

O vírus da Dengue é um vírus envelopado pertencente à família *Flaviviridae*, agrupado dentro do gênero flavivírus, juntamente com outros vírus patogênicos, como: vírus do Oeste do Nilo (WNV), da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite transmitido por carrapatos (TBEV) e da febre amarela (YFV) (PERERA, KUHN, 2008). O vírus DENV possui quatro tipos sorológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (WHO, 2014). Um estudo recente sugere que exista um novo sorotipo (quinto) encontrado na Malásia, que se distingue dos outros, no

entanto, os pesquisadores acreditam que ele não infecta os seres humanos, apenas primatas não humanos, como por exemplo, os macacos (NORMILE, 2013). O genoma (**figura 7**) é composto por uma fita simples de RNA viral, sentido positivo de aproximadamente 11kb e uma única fase de leitura aberta, codificando deste modo três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E), este último incluindo as glicoproteínas e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. A proteína C possui tamanho pequeno e é responsável por formar o componente estrutural do nucleocapsídeo. A prM é uma glicoproteína precursora, cuja formação da proteína membrana depende da sua clivagem. A proteína E possui inúmeras funções como: montagem viral, ligação aos receptores, fusão com a membrana celular e é o maior alvo de anticorpos, inclusive neutralizantes. NS1 está relacionada com a fixação de complemento durante a resposta imunológica, contribuindo para aumento da severidade da doença. NS2A pode estar envolvida no processamento de NS1 e, NS3 possui atividade de protease e de helicase, Enquanto isto, NS2B, NS4A e NS4B são componentes do complexo de replicação viral, já NS5 funciona como RNA polimerase. Além disto, o genoma também é composto por regiões não traduzidas (5'-UTR e 3'-UTR) (CHAMBERS et al., 1990; GUZMAN et al., 2010).



**Figura 7** – Genoma do vírus da Dengue. Fonte: GUZMAN et al., 2010.

### 2.3.1 Aspectos imunológicos

Durante a transmissão, mosquitos infectados com DENV picam a pele humana e, os vírus infectam células dendríticas imaturas (imDCs), ou seja células apresentadoras de antígeno (APCs) através da interação com um receptor denominado DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), seguido da internalização viral por endocitose mediada por clatrina. Esta interação é mediada pelos grupamentos de carboidratos presentes em algumas posições das proteínas E (Asn<sub>67</sub> e Asn<sub>153</sub>) e prM (Asn<sub>69</sub>). Deste modo, a acidificação dos endossomos induz uma mudança conformacional

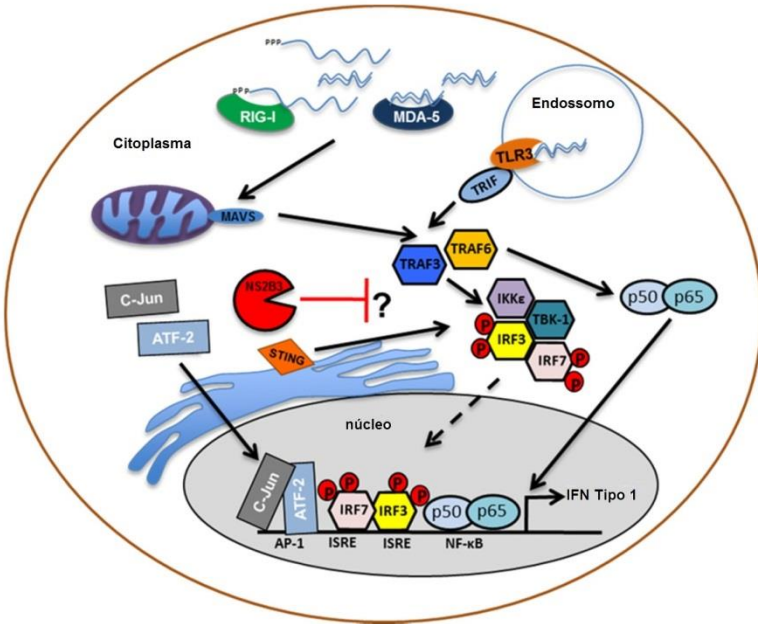
irreversível na proteína do envelope, resultando na fusão e consecutivamente na liberação do nucleocapsídeo para dentro do citoplasma da célula hospedeira. Posteriormente, uma única poliproteína, de aproximadamente 3391 aminoácidos, é traduzida e transportada para a membrana do retículo endoplasmático (RE) onde a mesma sofre modificações, através do complexo proteolítico NS2B3 e outras proteases, formando assim as três proteínas estruturais e as sete não estruturais. Algumas proteínas não estruturais ainda possuem a capacidade de modificar a membrana do RE, criando um microambiente necessário para a formação de novas partículas virais. A montagem é realizada por vesículas secretórias do Complexo de Golgi, seguida do brotamento viral na membrana plasmática. As imDcs infectadas amadurecem, tornando-se células dendríticas maduras (DCs) e migram até os linfonodos onde apresentam os antígenos para células T, iniciando assim as respostas imunes celular e humoral. Além de infectar DCs, DENV ainda se replica em outras células como monócitos, macrófagos e células B, entre outros, incluindo células do parênquima hepático e em macrófagos de gânglios linfáticos, fígado e baço, bem como nos monócitos do sangue periférico (GUZMAN et al., 2010; MORRISON et al., 2012; RITCHER et al., 2014).

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como receptores Toll-like (TLRs), especialmente TLR-3, TLR-7 e TLR-8 e sensores intracelulares (como RNA helicases) são as primeiras linhas de defesa da resposta imune, reconhecendo o RNA dupla fita (dsRNA), simples fita (ssRNA) ou RNA modificado. TLR-3 é o primeiro a reconhecer o RNA viral, logo após a ligação, a internalização mediante endocitose, seguida da mudança do pH endossomal, da fusão da membrana viral e endossômica e liberação do capsídeo no citoplasma celular. Estudos *in vitro* indicaram que esta etapa acarreta em uma forte indução de interleucina IL-8 e do antiviral interferon  $\alpha/\beta$  (IFN- $\alpha/\beta$ ). A interação com TLR-3 resulta na fosforilação do domínio TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon  $\beta$* ), que interage com fatores associados ao receptor TNF TRAF3, TRAF6 e TRAF3. O TRAF3 por sua vez se relaciona com a quinase 1 ligada TANK resultando na fosforilação de IRF-3. TRAF6 se associa com TAK1, ativando AP-1 e iniciando um processo de defosforilação, acarretando na ativação do fator nuclear NFkB. A translocação nuclear de IFR-3, AP-1 e NFkB induz a produção de IFN- $\alpha/\beta$ , ISGs (*Interferon Stimulating Genes*) e quimiocinas. Helicases citoplasmáticas que reconhecem dsRNA, como RIG-I e MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated gene 5*), contribuem indiretamente com a indução de IFN- $\beta$



atuando em sinergismo com TLR-3, limitando a infecção viral. A sinalização mediada por IFN- $\alpha/\beta$  através do receptor IFNAR ativa uma cascata denominada JAK-STAT, resultando na fosforilação e dimerização de vários sinais de transdução e ativação de moléculas ativadoras de transcrição (STAT), como STAT 1, 2, 3 e 5. Ao final da cascata são produzidas inúmeras proteínas antivirais e citocinas pró-inflamatórias. Outras cascatas, como da proteína quinase p38 e quinase 3-fosfatidilinositol também podem ser ativadas. Além disto, o mecanismo de RNA de interferência (RNAi) também pode ocasionar uma resposta anti-DENV (GREEN et al., 2014).

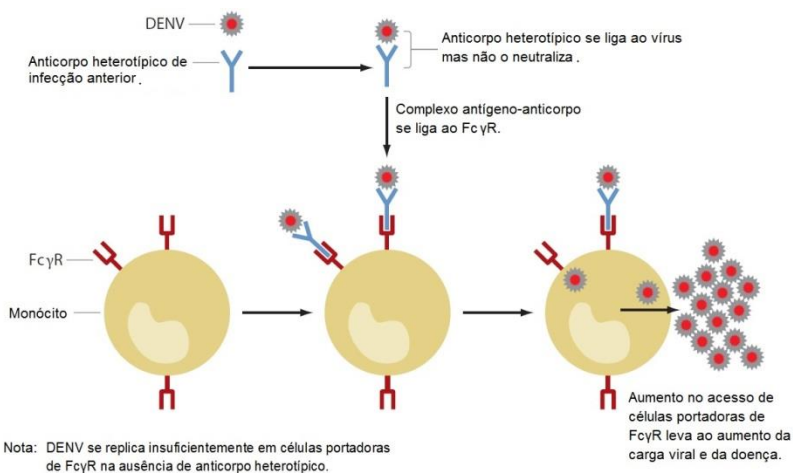
Entretanto, o vírus da Dengue é capaz de superar os mecanismos de defesa da imunidade inata utilizando-se de mecanismos de fuga, seja através da evasão da interação dos PAMPs (padrões moleculares associados a agentes patogênicos) com PRRs celulares, ou inibindo diferentes fases da resposta imune inata por meio da expressão de moléculas antagonistas, bloqueando vias intracelulares responsáveis pela sinalização e a produção de IFN I. Existem vários exemplos destes mecanismos de evasão, um deles é que DCs infectados não são capazes de induzir fosforilação em IRF-3, resultando assim na inibição da produção de IFN tipo I. Ademais, o complexo NS2B3, funciona como uma protease, digerindo componentes responsáveis pelas vias de produção de IFN I, através da interrupção da fosforilação de IRF-3 (**figura 8**). Além disto, DENV produz moléculas antagonistas como NS5 que degrada STAT2 e utiliza as proteínas NS2A, NS4A e NS5B para inibir a ativação de STAT 1. Outro exemplo é a capacidade dos vírus de RNA de senso positivo em subverter a formação do autofagossomo, impedindo a degradação lisossomal e a morte da célula infectada. Ademais, DENV interfere no metabolismo lipídico e evidências concluem que NS4B é capaz de inibir o RNAi (GREEN et al., 2014; MORRISON et al, 2012).



**Figura 8** – Resposta imune contra o vírus DENV mediada por IFN I. A ilustração indica o grande número de moléculas e a complexidade da resposta imune inata na produção de mecanismos antivirais, com ênfase para o interferon I. Em destaque, o papel do complexo proteico NS2B3 de DENV como inibidor da via de IFN I. Fonte: Adaptado de MORRISON et al, 2012

A infecção primária da Dengue, ou seja, aquela onde o indivíduo se infectou com o vírus apenas uma vez, é caracterizada por uma resposta lenta e com baixo título de anticorpos. O primeiro isotipo de imunoglobulinas a aparecer logo no terceiro ao quinto dia de infecção é o IgM. Os níveis de IgM aumentam após 2 semanas do início da febre e diminuem para níveis indetectáveis durante os próximos 2 a 3 meses. Ao contrário de IgM, IgG é detectada em baixa concentração na primeira semana, aumenta gradativamente na fase aguda e drasticamente na segunda semana. Durante a resposta imune contra o vírus DENV, mediada pelo hospedeiro, são produzidos anticorpos neutralizantes. Tais anticorpos são capazes de inibir a fixação, internalização e replicação viral na célula hospedeira. Para que ocorra a neutralização são necessários inúmeros fatores, como por exemplo, a afinidade do anticorpo, bem como a natureza e localização do epítipo, e também sua acessibilidade sobre a partícula do vírus. As proteínas prM, E e NS1 são

os principais alvos de anticorpos, no entanto cabe ressaltar a glicoproteína do envelope como indutor desta resposta imune protetora, mediada pelos anticorpos neutralizantes. Uma infecção por um único sorotipo resulta em uma imunidade de longa duração para aquele, no entanto não é capaz de proteger por um curto período de tempo contra sorotipos heterotípicos. Isto acontece devido a presença de anticorpos não específicos, ou seja, não-neutralizantes que, em uma segunda infecção (por outro sorotipo), acarreta no fenômeno conhecido como ADE (*antibody-dependent-enhancement*). Tal fenômeno piora o quadro geral da infecção e é o grande vilão causador da Dengue hemorrágica, conforme explica a ilustração da **figura 9** (GUZMAN et al., 2010; GUZMAN, VASQUEZ, 2010; HEINZ, STIASNY 2012; MURPHY, WHITEHEAD, 2011; ROTHMAN, 2011).



**Figura 9** – Fenômeno ADE na Dengue. Em uma segunda infecção (outro sorotipo de DENV) anticorpos não neutralizantes se ligam ao antígeno (vírus) formando complexos, que se ligam aos monócitos através dos receptores Fc $\gamma$ R. A presença do complexo antígeno-anticorpo facilita a infecção, através da entrada do vírus na célula, seguida de uma intensa replicação e um aumento da viremia. Fonte: Adaptado de MURPHY, WHITEHEAD, 2011.

### 2.3.2 Vacinas experimentais contra Dengue: principais candidatos

Na literatura existem inúmeros candidatos vacinais sendo estudados e alguns são de grande relevância, pois se encontram em fase

clínica. Uma delas é a DENVax , uma vacina recombinante tetravalente formada a partir do vírus atenuado sorotipo 2 denominado de DENVax-2. Para esta construção, genes de prM e E de DENVax-2 foram substituídos pelos mesmos genes, entretanto dos sorotipos 1, 3 e 4. Para avaliação da segurança e imunogenicidade, a mesma foi testada anteriormente em camundongos e em primatas não humanos e duas formulações contendo diferentes concentrações foram testadas em fase I em humanos, para avaliação da tolerabilidade, segurança e imunogenicidade. O estudo de fase I foi realizado na Colômbia com participantes de 18-45 anos, nos quais foram divididos em 4 grupos: 40 participantes (42%) receberam baixa-dose, 8 participantes (8%) placebo nos grupos de baixa dose, 39 (41%) alta-dose da vacina e 9 (9%) receberam placebo. Todas as formulações induziram resposta imune por anticorpos neutralizantes de forma detectável para os quatro sorotipos, inclusive para o sorotipo 2. Após 30 dias da segunda dose, 62% dos 76 indivíduos tiveram soroconversão pela vacina para todos os sorotipos e 96% soroconverteram 3 ou mais vírus da Dengue. Os pesquisadores acreditam que a via de administração utilizada pode induzir uma resposta multivalente contra Dengue de forma adequada e, pode ser favorecida pelo baixo número de efeitos adversos, entretanto é necessária a continuação dos estudos clínicos (fase II) (OSORIO, et al 2014).

Uma pesquisa de grande importância é a desenvolvida pela empresa Sanofi-Pasteur. O candidato denominado CYD-TDV, baseado na estrutura química do vírus da febre amarela (YF17D), construído a partir da substituição de parte do material genético pelos genes que expressam as proteínas prM e E de DENV, é uma vacina tetravalente, atenuada e recombinante (GUY et al., 2011). A fase clínica IIb foi realizada na Tailândia com aproximadamente 4000 crianças de 4-11 anos de idade, obtendo uma eficiência de aproximadamente 30,2%. Apesar de a mesma induzir anticorpos em humanos contra todos os sorotipos, estes não foram neutralizantes para DENV-2 (SABCHAREON et al., 2012). Na Ásia, em 2014, um estudo de fase III de segurança e eficácia, envolvendo indivíduos de 2-14 anos mostrou que CYD-TDV é segura para crianças que possuem idade superior a 2 anos (CAPENDING et al., 2014). Recentemente, outro estudo de fase clínica III foi concluído na América Latina, em cinco países com elevada incidência de casos de Dengue: Brasil, Colômbia, México, Honduras e Porto Rico. No total, foram envolvidas mais de 20.000 crianças de 9-16 anos. A eficiência da vacina, levando em conta a administração de pelo menos uma dose, foi de aproximadamente 64,7%.

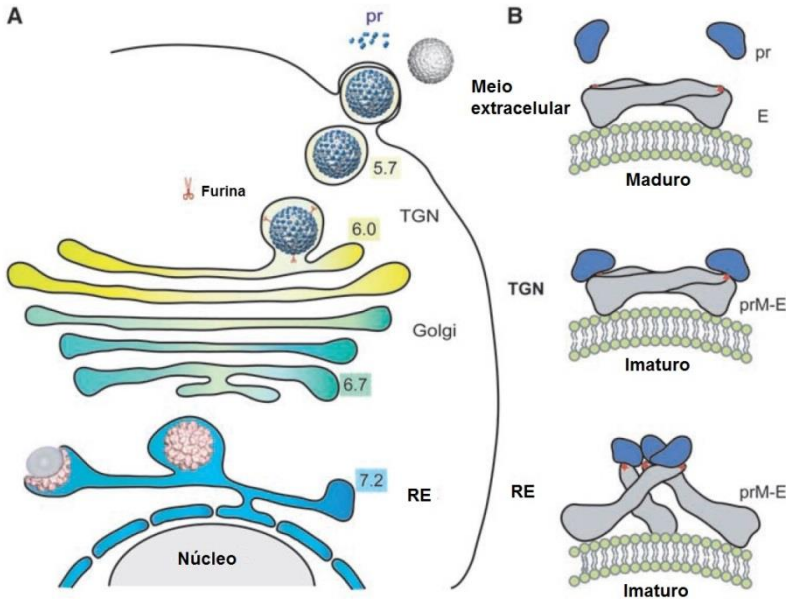
Em relação aos sorotipos, a eficiência foi 50,3%, 42,3%, 74% e 77,7% contra DENV-1, 2, 3 e 4, respectivamente (VILLAR et al., 2014).

Estes exemplos acima mostram algumas das diversas vacinas contra Dengue que são testadas em todo o mundo. As vacinas se dividem em (i): de microrganismo completo (morto ou atenuado) e (ii): de subunidade (componentes isolados ou componentes recombinantes). Para Dengue existem estudos com candidatos vacinais compostos por microrganismos completos e atenuados e, de subunidade (proteínas, DNA e vírus recombinante). Entretanto, deve-se ressaltar que o vírus da Dengue possui uma diversidade antigênica muito grande, por isto a seleção de sequências proteicas, estritamente conservadas em todos os sorotipos, deve ser levada em conta no momento do desenvolvimento dos candidatos vacinais contra a Dengue (RAMAKRISHNAN et al., 2014).

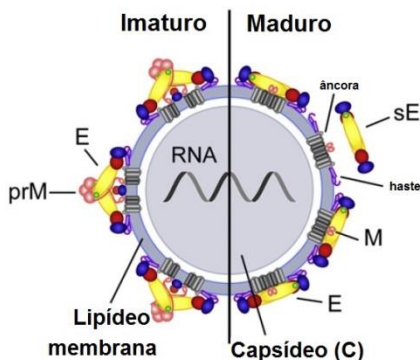
### 2.3.3 Proteína do envelope e estratégia de vacinação

Em flavivírus no geral, particularmente no retículo endoplasmático das células infectadas, novos vírions imaturos são montados. Nestes, a proteína E e prM (proteína de pré-membrana) dimerizam, formando espículas triméricas do heterodímero prM-E. A prM funciona como chaperona, auxiliando no dobramento da proteína E e é composta por uma região globular pr N-terminal (resíduos 1-91) e o ectodomínio M (resíduos 92-130), que se conecta com a âncora da membrana. Em seguida, tais vírions imaturos e não infecciosos são transportados através de mecanismos secretórios, encontrando um ambiente levemente ácido da região trans-Golgi (TGN) e das vesículas secretórias. O baixo pH faz com que ocorra um rearranjo das espículas dos vírions imaturos para uma superfície lisa, cujos dímeros prM-E são orientados tangencialmente, expondo prM a ação da furina. A furina, uma protease celular, localizada primariamente na região TGN, cliva prM e, conseqüentemente, realiza um rearranjo da proteína E, produzindo a partícula madura M e o peptídeo pr. Em pH baixo, pr continua associado a E, entretanto a secreção para o meio extracelular (pH neutro) permite a liberação dos peptídeos pr da âncora da transmembrana e da estrutura associada a membrana denominada de haste (*stem*). Deste modo, a maturação é concluída, originando vírions infecciosos maduros contendo M e homodímeros de E (**figura 10**). Além do estado imaturo e maturo (**figura 11**), a proteína E também assume uma forma ativada de fusão. Esta última condição é necessária

para a entrada na célula hospedeira. Estruturas cristalinas em pH neutro mostraram que cada cadeia polipeptídica de E contém três domínios: domínio estrutural central (DI), domínio de dimerização, que contempla o *loop* de fusão (DII) e o domínio carboxi-terminal tipo imunoglobulina (DIII) (ALEN, SCHOLS, 2012; HEINZ, STIASNY, 2012; YU et al., 2008; ZHENG et al., 2014).

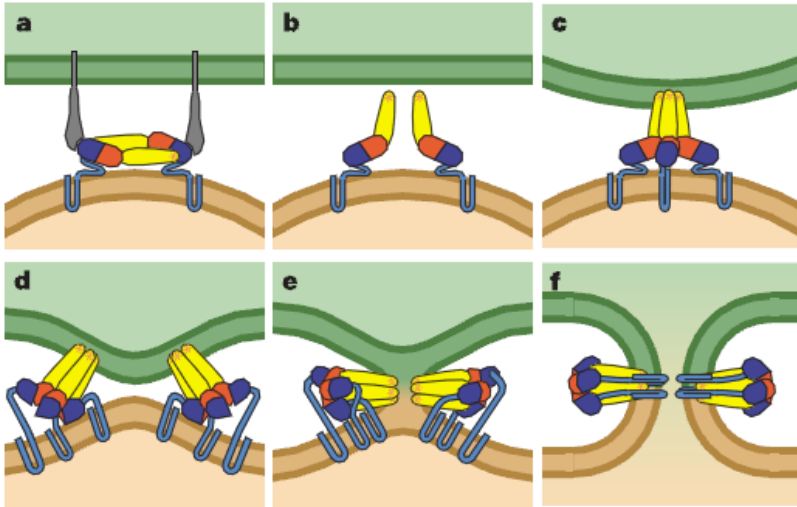


**Figura 10** - Mecanismo de maturação do vírus DENV. **A** e **B**. Mecanismo de maturação da partícula de DENV no retículo endoplasmático, no complexo de Golgi e no meio extracelular da célula hospedeira. Destaque para o rearranjo conformacional da proteína E de acordo com a mudança do pH. Fonte: Adaptado de YU et al 2008.



**Figura 11** - Estrutura da partícula viral imatura e madura dos flavivírus. sE: forma solúvel de E que carece da âncora de membrana e de um elemento chamado haste. Fonte: Adaptado de HEINZ, STIASNY, 2012.

De forma semelhante à maturação viral, o mecanismo de fusão do vírus da Dengue com a membrana celular do hospedeiro também ocorre através do rearranjo da proteína E, sob alteração do pH (**figura 12**). Entretanto, o caminho de entrada escolhido por DENV é altamente dependente do tipo de célula e do tipo viral. Na via clássica de endocitose, E se associa com o receptor da célula provavelmente pelo domínio DIII. Esta associação é mediada por vesículas de clatrina que se fundem com o endossomo celular. Deste modo, a redução do pH no endossomo causa um rearranjo da proteína E que encontra-se como homodímero, permitindo uma flexão entre DI e DII, expondo o *loop* de fusão com inserção do peptídeo de fusão na membrana do hospedeiro e posterior rearranjo lateral dos monômeros. Consequentemente, ocorre a mudança conformacional do estado dímero de E para trímero. A estrutura trimérica se dobra formando *hairpin*, ocorrendo a hemifusão e posterior formação do poro de fusão. Deste modo, a fusão é concluída com a liberação do RNA viral na membrana citoplasmática, seguida das demais etapas, como: replicação, tradução, maturação e brotamento. (ALEN, SCHOLS, 2012; MODIS et al., 2004).



**Figura 12** – Mecanismo de fusão de DENV com a célula hospedeira. Em verde: membrana da célula hospedeira a ser infectada; em marrom: membrana do vírus com destaque para a proteína E, em vermelho: domínio I; em amarelo: domínio II com peptídeo de fusão; em azul claro: domínio III de E; em azul escuro: âncora transmembrana. **A.** DIII se liga no receptor da célula hospedeira via clatrina mediando a endocitose; **B.** O baixo pH no endossomo provoca um rearranjo na proteína do envelope com a exposição de DII e o peptídeo de fusão, seguida do rearranjo lateral dos monômeros; **C.** O peptídeo de fusão se insere na membrana da célula hospedeira promovendo a formação do trímero; **D.** Trímero com peptídeo de fusão na extremidade, E-DI na base e E-DIII se desloca e gira para formar o *hairpin*; **E.** Nova alteração estrutural com a interação da âncora transmembrana e o E-DII levando à hemifusão; **F.** Formação do poro de fusão. Fonte: MODIS et al., 2004.

Foi com base no mecanismo de fusão que, em 2013, foi realizada a identificação de dois peptídeos conservados, presentes no envelope de todos os sorotipos de DENV, pelo professor Dr. Daniel Santos Mansur da UFSC (MIP/CCB). Inicialmente, sequências representativas da proteína do envelope dos quatro sorotipos (1-4) foram selecionadas. Em seguida, pelo programa ClustalW2 (**figura 13**), as mesmas foram alinhadas e, sequências de 10 aminoácidos ou mais que estavam 100% conservadas nos quatro sorotipos foram identificadas. Posteriormente, a estrutura tridimensional destas sequências conservadas da proteína E foram analisadas no programa Pymol (**figura 14**) (DIAS, 2013).



```

1  MRCVIGISRDFVEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMAKDKPTLDIELLKEVTNPAVLRKLC 60
3  MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELQKTEAQLATLRKLC 60
2  MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEAQPATLRKYC 60
4  MRCVGVGNRDFVEGVSGGAWVDLVLEHGSCVTTMAQQKPTLDFELIKTTAKEVALLRITYC 60
   ***:*.:.*****:*.:.***:*****.*****:*****:** * * .: * * * *

1  IEAKISNTTTDSRCPTQGEATLVBEQDANFVCRRTFVDRGWNGCGLFGKGSITCAKFK 120
3  IEGKITNVTTDSRCPTQGEAILPEEQDQNYVCKHTFVDRGWNGCGLFGKGSIVTCAKFK 120
2  IEAKLTNTTTDSRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSVDRGWNGCGLFGKGSIVTCAMFT 120
4  IEASISNITTATRCPTQGEPLYLKEEQDQYICRRDVFDRGWNGCGLFGKGSIVTCAKFS 120
   **.:**:* * :*****. * **** .:***: *****:*****.*** *

1  CVTKLEGKIVQYENLKYSVIVTVHTGDQHQVGNESTEHGTTATITPQAPTTEIQLTDYGA 180
3  CLELIEGKVVQHENLKYTVIITVHTGDQHQVGNET--QGVTAETTPQASTVEAILPEYGT 178
2  CKKNMKGKVVQPENLEYTVIITPHSGEEHAVGNDTGKHGKEIKITPQSSITEALBTGYGT 180
4  CSGKITGNLVQIENLEYTVVVTVHNGDTHAVGNDIPNHGVATITPRSPSVEVKLPDYGE 180
   * :**:* * * :*****:*** * * * * : * * : * * * * : * * * * * * * * * *

1  LTLDCSPRTGLDFNEMVLLTMKEKSWLVHKQWFLDPLPWTSGASTSQETWNRQDLVTF 240
3  LGLECSPRTGLDFNEMILLTMKNKAMVHRQWFPDLPWPWTSGATTPTPTWNNKELLVTF 238
2  VTMECSPRTGLDFNEMVLLQMENKAWLVHRQWFLDPLPWPWPADTQGSNWIQKETLVTF 240
4  LTLDCBPRSGIDFNEMILMKMKKTWLVHKQWFLDPLPWAAGADTSEVHWNYKERMVTF 240
   :.:.***:***:*****:*** * * * * : * * : * * * * : * * * * * * * * * *

1  KTAHAKKQIVVVLGSGQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFAGHLKCRCLKMDKLTLLKGMYSYV 300
3  KNAHAKKQIVVVLGSGQEGAMHTALTGATEIQTSGGTSIFAGHLKCRCLKMDKLELLKGMYSYA 298
2  KNPHAKKQIVVVLGSGQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLFTGHLKCRLRMCKLQKGMYSYS 300
4  KVPHAKKQIVTVLGSQEGAMHSALTGATEVDSGDGNHMFAGHLKCKVRMEKLRILKGMYSY 300
   * .***:* * .*****:*****: . . . :*****:*** * * * *

1  MCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQIKYEGTDAPCKIPFSTQDEKGVQTQNGRLITANPIVTD 360
3  MCSNAPFVLKKEVSETQHGTVLIVKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGAHNGRLITANPVVTK 358
2  MCTGKFKVVKEIAETQHGTVIRVQYEGDGSPPCKIPPEIMDLKRRHLGRLITVNPVIVTE 360
4  MCSGKFSIDKEMAETQHGTVTVVKVYEGAGAPCKVPIEIRVNVKEKVVGRISSTPFAEY 360
   **.: * : * * :***** .:***: * * .***:*. . * : * * : * * .: * *

1  KEKPVNIEAEPFFGESYIVIGAGEKALKLSWFKKSSIGKMFATARGARRMAILGDTAW 420
3  KEFPVNIEAEPFFGESNIIGIGDKALKINWYKKGSSIGKMFATARGARRMAILGDTAW 418
2  KDSPVNIEAEPFFGDSYIIGVEPQQLKNWFKKSSIGQMIETTMRGAKRMAILGDTAW 420
4  TNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGDSSALTLHWFRKGSISGKMLESTYRGAKRMAILGETAW 420
   .: . *** *****: * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

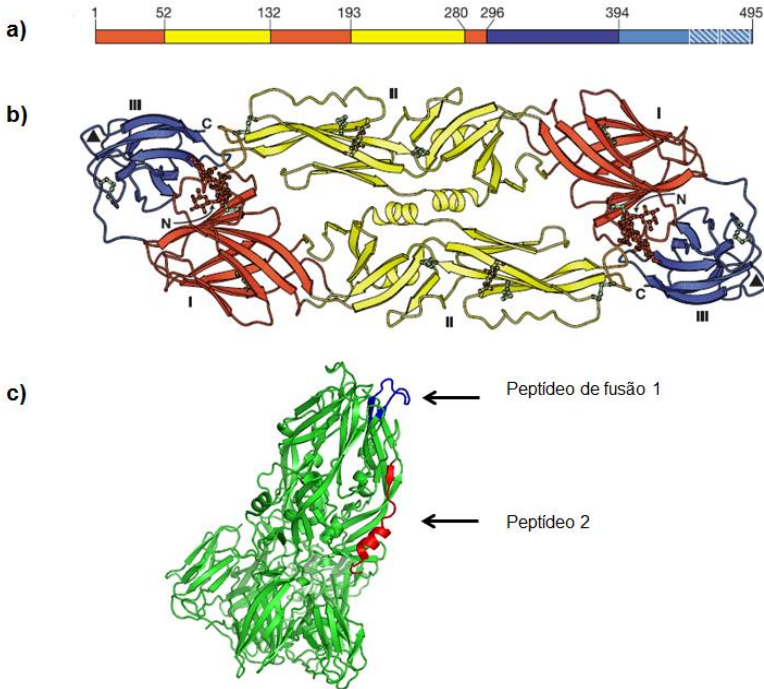
1  DFGSIGGVFTSVGKLVHQIFGTAYGVLFSGVSWTMKIGIGVLLTWGLNSRSTLSMTCI 480
3  DFGSVGGVLSNLGKMHQIFGSAYTALFSGVSWIMKIGIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCI 478
2  DFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAPSGVSWTMKILIGVIIITWIGMNSRSTLSVSLV 480
4  DFGSVGGLLTSLGKAVHQVFGSVYTTMFGVSWMVRLLIGFLVLWIGTNSRNTSMAMTCI 480
   ***:***:*.:.***:***:***: * . * .***** : * * * * : * * * * * * * * * *

1  AVGLVTLYLGVMVQA 495
3  VIGITLYLGAVVQA 493
2  LVGVVTLYLGMVQA 495
4  AVGGITLPLGFTVHA 495
   :* :***:* * :*

```

**Figura 13** - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína E dos 4 sorotipos do vírus da Dengue. As sequências obtidas do GenBank foram alinhadas pelo programa ClustalW2. Os asteriscos indicam 10 ou mais aminoácidos conservados. Fonte: DIAS, 2013.

O peptídeo de fusão 1, localizado entre os aminoácidos 97 a 112 (VDRGWGNGCGLFGKGG), foi considerado conservado nos quatro sorotipos, variando apenas o último aminoácido. Além disso, o peptídeo 2, localizado entre os aminoácidos 150 a 171 (VVVLGSQEGAMHTALTGATEI) também foi considerado conservado, com duas variações apenas no DENV-4 (DIAS, 2013).



**Figura 14** - Estrutura de aminoácidos e do dímero e trímero da proteína E do vírus DENV maduro. **A.** Estrutura de aminoácidos da glicoproteína E. Vermelho: domínio I; amarelo: domínio II; azul: domínio III. **B.** Dímero da proteína E do vírus DENV maduro, em solução com pH maior que o necessário para a trimerização. As cores dos domínios são as mesmas representadas na figura “a” (MODIS et al., 2004). **C.** Figura feita pelo programa Pymol, com ênfase para o trímero da proteína E em pH ácido. Evidência dos peptídeos de fusão 1 e peptídeo 2. Fonte: DIAS, 2013.

Estes dois peptídeos conservados foram encontrados no domínio II da glicoproteína E, ou seja, região menos exposta e que sofre

modificações conformacionais. Os peptídeos de fusão 1 (DENV-P1) e o peptídeo 2 (DENV-P2) são mostrados para a célula apenas em pH baixo, o que sugere que os mesmos sejam cruciais no papel de fusão e também na infecção viral (DIAS, 2013; FLEITH, 2014). Por conta disto, acredita-se que tais peptídeos, DENV-P1 e DENV-P2 sirvam como bons antígenos indutores de anticorpos anti-DENV neutralizantes. E para o desenvolvimento deste candidato vacinal, racional e potencialmente multivalente contra Dengue, foram escolhidos as VLPs do vírus Junín como carreadores antigênicos. Sabe-se que as VLPs possuem inúmeras vantagens, como as já citadas anteriormente, algumas delas são: a capacidade de aumentar a resposta imunológica e também induzir anticorpos neutralizantes.

### **3 HIPÓTESE**

Existem duas sequências de aminoácidos dentro da proteína E do vírus da Dengue que são altamente conservadas nos 4 sorotipos virais descritos até o momento. Estruturalmente essas sequências parecem ter grande relevância para o ciclo viral e, anticorpos neutralizantes contra elas dificultariam ou impediriam a infecção das células alvo pelos vírus, e serviriam desta forma como vacinas tetravalentes protetoras contra a doença. Dentre as metodologias mais eficientes para induzir esses anticorpos neutralizantes estão as VLPs e, dentre as VLPs acredita-se que aquelas geradas a partir da proteína Z do vírus JUNV são bons candidatos para se gerar uma estrutura tridimensional imunogênica necessária para induzir uma resposta imune eficiente.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

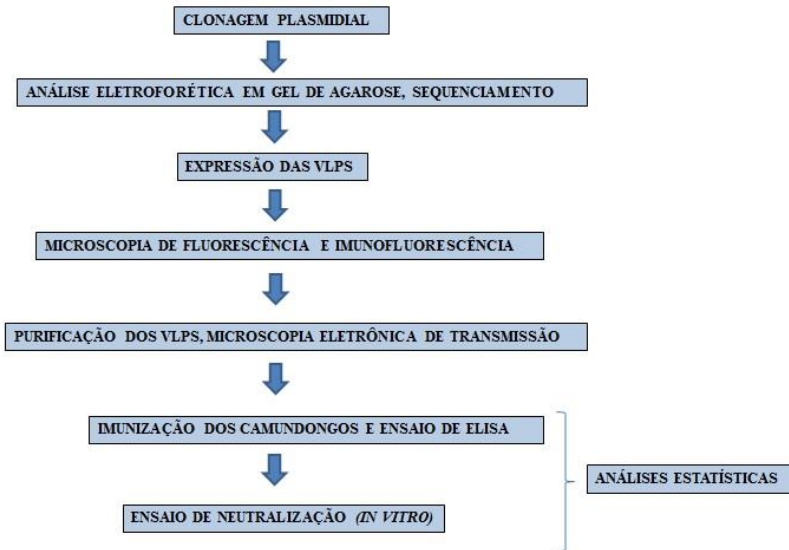
Construir um possível candidato vacinal multivalente contra Dengue constituído por VLPs de JUNV e peptídeos conservados da proteína E de DENV e avaliar em camundongos a imunogenicidade humoral e a atividade neutralizante *in vitro* dos anticorpos induzidos pela sua imunização.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir plasmídeos recombinantes contendo as sequências codificadoras para a proteína Z do vírus Junín e os peptídeos conservados do vírus da Dengue (peptídeo de fusão 1 e peptídeo 2);
- Expressar as proteínas recombinantes em sistema eucarioto e confirmar a expressão das mesmas;
- Purificar as proteínas e verificar a formação das VLPs;
- Avaliar em modelo murino a imunogenicidade humoral dos candidatos vacinais, quando administrados em protocolos de dose-reforço, a fim de verificar a eficiência das formulações vacinais;
- Avaliar *in vitro* a atividade neutralizante dos anticorpos induzidos pela imunização dos camundongos, com o propósito de verificar sua possível capacidade protetora.

## 5 METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis-SC. A **figura 15** ilustra um fluxograma das atividades práticas executadas durante a realização deste projeto.



**Figura 15** – Fluxograma geral das atividades práticas.

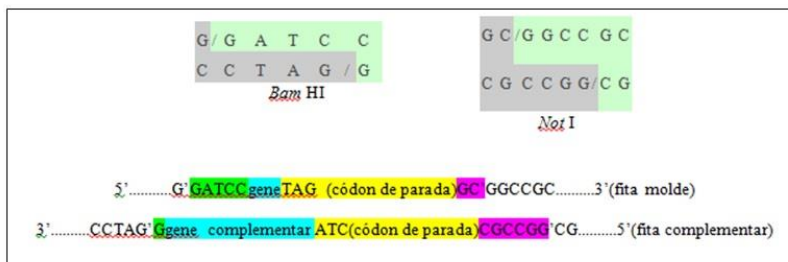
### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS CONSERVADOS DA PROTEÍNA DO ENVELOPE (E) DO VÍRUS DA DENGUE

Os peptídeos conservados, presentes nos quatro sorotipos da proteína E do vírus da Dengue, foram identificados previamente pelo professor Dr. Daniel Santos Mansur da UFSC através dos programas de bioinformática: ClustalW2 e Pymol. A sequência e a estrutura dos peptídeos foram reportadas em trabalhos anteriores por Dias (2013) e Fleith (2014), conforme descrito na revisão bibliográfica.

## 5.2 CONSTRUÇÕES DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

### 5.2.1 Fragmentos gênicos codificantes dos peptídeos conservados DENV-P1 e DENV-P2

Dois fragmentos gênicos que codificam apenas uma repetição de cada peptídeo DENV-P1 e DENV-P2 foram sintetizados pela empresa IDT® (Integrated DNA Technologies). Para tanto, foram fabricados dois oligonucleotídeos exatamente complementares contendo sucessivamente: os sítios parciais para enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I nas extremidades, as sequências inteiras representativas de cada um dos peptídeos e um códon de terminação, conforme **figura 16**, **quadro 2** e **quadro 3**. Os oligonucleotídeos foram diluídos na mesma molaridade, submetidos aos protocolos de anelamento (95°C por três minutos e resfriamento a temperatura ambiente) e posteriormente às etapas de clonagem: ligação com o vetor, transformação e seleção dos clones, conforme descrito em **5.2.2**, **5.2.3** e **5.2.4**.



**Figura 16** - Desenho esquemático da construção dos fragmentos gênicos codificantes dos peptídeos DENV-P1 e DENV-P2. **Verde:** sequência parcial do sítio da enzima de restrição *Bam*HI; **violeta:** sequência parcial do sítio da enzima de restrição *Not*I; **amarelo:** códon de parada; **azul claro:** representação dos genes DENV-P1 e DENV-P2. Para realização do desenho dos oligonucleotídeos, foi utilizada a sequência molde dos peptídeos, cedida pelo Dr. Daniel Santos Mansur e, o programa *online* Reverse Complement (<[http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)>).

Desenho dos Oligonucleotídeos sintéticos	Peptídeo DENV-P1
Fita molde	5' <b>GATCC</b> GGTGTTGACCGTGGTTGGG GTAACGGTTGCGGTCTGTTCCGTA GGTGGT <b>TAGGC</b> 3' - (61 pb)
Fita complementar	5' <b>GGCCGC</b> CTAACCACCTTTACCGAAC AGACCGCAACCGTTACCCCAACCACG GTCAACACCG3' - (61 pb)

**Quadro 2** – Oligonucleotídeos para peptídeo DENV-P1. Desenho dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados como fragmento gênico para peptídeo DENV-P1. As cores indicativas estão de acordo com o desenho esquemático da figura 16.

Desenho dos Oligonucleotídeos sintéticos	Peptídeo DENV-P2
Fita molde	5' <b>GATCC</b> GTTGTTGTTCTGGGTTCTCA GGAAGGTGCGATGCACACCGCGCTG ACCGGTGCGACCGAAAT <b>TAGGC</b> 3' - (73pb)
Fita complementar	5' <b>GGCCGC</b> CTAGATTTCGGTTCGCACC GGTCAGCGCGGTGTGCATCGCACCT TCCTGAGAACCCAGAACAACA <b>CG</b> 3' - (73pb)

**Quadro 3** –Oligonucleotídeos para peptídeo DENV-P2. Desenho dos oligonucleotídeos sintéticos utilizados como fragmento gênico codificante do peptídeo DENV-P2. As cores indicativas estão de acordo com o desenho esquemático da figura 16.

### 5.2.2 Transformação dos plasmídeos e extração do DNA plasmidial

O plasmídeo pZ-eGFP, contendo o gene que codifica a proteína Z (JUNV-VLP) e GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi gentilmente cedido pelo Dr. Mario Enrique Lozano da Universidad Nacional de Quilmes (Buenos Aires – Argentina). Este plasmídeo foi transformado em bactéria *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  pelo método de choque térmico conforme descrito por Mandel, Higa (1970), com modificações.

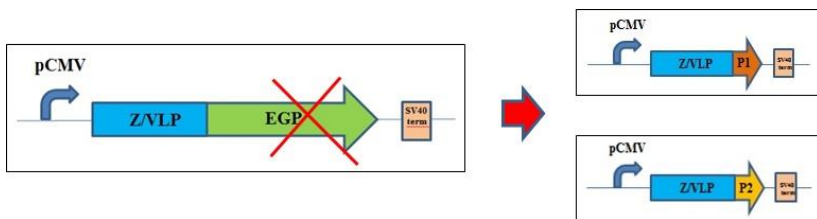


Alíquotas de bactérias *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  cálcio-competentes, armazenadas a -80°C foram descongeladas e cerca de 1-10  $\mu$ L do plasmídeo foi adicionado a cada tubo, a mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, seguida de choque térmico a 42°C por 45 segundos e banho de gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados 450  $\mu$ L de meio S.O.C (meio SOB com 20mM glicose) e as bactérias foram incubadas a 37°C por 1 hora com agitação. Após esta etapa, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar (Luria-Bertani: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10g de cloreto de sódio e 15 g de ágar em 1000 ml de água destilada) com antibiótico canamicina (concentração final de 25  $\mu$ g/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas. Para extração do DNA plasmidial, colônias isoladas foram extraídas da placa com auxílio de ponteira estéril e incubadas nas mesmas condições anteriores, em meio L.B líquido. Os plasmídeos foram extraídos através de kit *Pureyield Plasmid Miniprep System Promega*<sup>®</sup>, conforme recomendações do fabricante.

### 5.2.3 Clonagem dos fragmentos de DNA DENV-P1 e DENV-P2 no plasmídeo pZ

Os plasmídeos extraídos das colônias transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas de restrição *Bam*HI (Promega<sup>®</sup>) e *Not*I (New England Biolabs<sup>®</sup>) de acordo com as especificações do fabricante, para retirada do gene para a proteína GFP (**figura 17**). Os produtos das reações enzimáticas foram analisados em gel de agarose 0,7% em tampão TBE (Tris-boro-EDTA) 0,5X, sob voltagem de 100 V e corados com brometo de etídeo 0,05 $\mu$ g/ml, durante 25 minutos e, visualizados em transiluminador com luz UV (MacroVue UV20 - Hoefer<sup>®</sup>) acoplado a um fotodocumentador. Para realizar as clonagens, foi realizada a extração do fragmento em gel de agarose 1,0-1,5% do produto digerido pZ (sem GFP) através do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega*<sup>®</sup>, conforme instruções do fabricante.

O plasmídeo pZ purificado do gel e os produtos da reação de anelamento foram analisados em gel de agarose 1,0% e em seguida foram ligados (plasmídeo + inserto), utilizando enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs<sup>®</sup>), conforme procedimento descrito pelo fabricante.



**Figura 17** – Desenho ilustrativo da estratégia de clonagem a partir do plasmídeo pZ-eGFP.

### 5.2.4 Confirmação do inserto e sequenciamento

Os plasmídeos recombinantes (pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2) foram submetidos à transformação por choque térmico e purificados, conforme descrito nos itens 5.2.2. Para confirmação dos clones, os plasmídeos foram submetidos a digestões enzimáticas utilizando enzimas *Bam*HI (Promega<sup>®</sup>), *Not*I e *Sal*I (New England Biolabs<sup>®</sup>) e posteriormente foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Os clones obtidos foram sequenciados pelo equipamento 3500/Genetic Analyzer Applied Biosystems<sup>®</sup> utilizando *primers* (iniciadores) senso e antisenso para os promotores CMV (citomegalovírus) e SV40 (vírus Simian 40). Para análise dos dados, as seqüências foram alinhadas utilizando o programa BLAST<sup>®</sup> (BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool).

### 5.2.5 Maxiprep para obtenção do DNA plasmidial em grande quantidade

Esta etapa denominada maxiprep teve como objetivo obter uma grande quantidade de DNA plasmidial (pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2 e pZ-eGFP) puro e livre de pirogênio, para ser utilizado posteriormente nas etapas de transfecção em células de eucarioto e imunização em animais. Primeiramente foi realizado uma pré-cultura bacteriana em ambiente estéril. Portanto, em um tubo fechado estéril de 15 ml foram acrescentados 5-6 ml de meio líquido L.B contendo antibiótico canamicina (concentração final de 25 µg/ml) e cerca de 20 µl da cultura estoque da bactéria *E. coli* DH5α contendo o DNA plasmidial (500 µl de cultura bacteriana + 400 µl de glicerol estéril 50%) previamente armazenado em freezer -80°C. A pré-cultura foi incubada em estufa a 37°C sob agitação durante 7 a 8 horas. Para realização da cultura foram utilizados dois frascos fechados de vidro estéreis de 500 ml, contendo

230-250ml de meio L.B com o mesmo antibiótico canamicina e cerca de 1ml da pré-cultura. A cultura bacteriana foi incubada *overnight* a 37°C, sob agitação.

No segundo dia, a cultura bacteriana foi transferida para tubos estéreis de polipropileno de 250 ml (referência: 356011 – Beckman Coulter®) e submetida a centrifugação a 5000 rpm/ 4°C por 20 minutos em centrífuga AVANTI JA14 Beckman Coulter®. O *pellet* obtido (de cada frasco de 250 ml) foi ressuspendido em 9 ml de tampão GTE (glicose 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM), seguido da adição de 1 ml de solução de lisozima (10 mg/ml em Tris 10 mM, preparada no momento do uso). Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, foi acrescentado 20 ml da solução de lise (NaOH 0,2N, SDS 1%, preparada no momento do uso) e a mistura foi incubada durante 5-10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram acrescentados 10 ml da solução acetato de potássio 3 M gelada (previamente armazenada em geladeira a 4-8 °C). A mistura foi agitada gentilmente, incubada em gelo por 10 minutos, transferida para tubos de 50 ml e centrifugada a 5000 rpm/ 4°C por 1 hora. O lisado foi filtrado com gaze estéril para retirada do precipitado e ao sobrenadante foi adicionado 0,6 volumes (0,6V) de isopropanol com incubação de 1 hora a temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 5000 rpm, por 30 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 4 ml de água de injeção (livre de endotoxina) e armazenado a 4°C.

No terceiro dia, dois tubos de 50 ml (contendo os *pellets* ressuspendidos em água) foram juntados em um único tubo. Em seguida, foram acrescentados 8,6 g de cloreto de cézio e 100 µl de brometo de etídeo (10 mg/ml). Esta etapa foi realizada com cuidado e em local apropriado para evitar contaminação com brometo de etídeo e todo resíduo gerado por este tipo de reagente foi descartado de forma adequada. A mistura foi transferida com uma seringa para tubo de ultracentrífuga (QuickSeal-Centrifuge Beckman Coulter®, referência: 34213) e completada com solução de cloreto de cézio (4,3 g/4 ml de água de injeção). Os tubos foram equilibrados em balança analítica (uma diferença menor que 0,005g) e dispostos de forma balanceada em rotor de ângulo fixo (tipo 70.1 Ti Beckman Coulter®) em Ultracentrífuga Optima XE-100 Beckman Coulter®, sob uma rotação de 56000 rpm, 20-25°C, durante 18 a 20 horas.

No dia seguinte, os tubos foram retirados da ultracentrífuga e as duas bandas de DNA plasmidial, conforme **figura 18**, foram coletadas com auxílio de uma seringa de 5 ml e duas agulhas hipodérmicas (uma para retirada do ar na parte superior e outra abaixo para coleta) e, em

seguida armazenadas em tubos de 15 ml. Posteriormente, foi adicionado o mesmo volume (V/V) de álcool isoamílico, o tubo foi agitado por inversão e centrifugado por 2500 rpm por 1 minuto. Desta forma, a fase superior de cor rósea contendo o brometo de etídeo foi descartada. Esta etapa foi repetida três vezes. O conteúdo líquido contendo o DNA foi transferido para uma membrana de diálise (*Dialysis Tubing Cellulose Membrane* 25mmx16mm, referência D9777-100FT, 12.000 KDa Sigma-Aldrich®) e mantido sob agitação a 4°C *overnight* contra tampão Tris 0,01M/EDTA 0,01M. O tampão foi substituído duas vezes.

No quinto dia, o conteúdo da membrana de diálise foi transferido para um tubo de 50 ml, com adição de 0,1V de acetato de potássio 3M pH 6,0, seguido de agitação em vórtex. Posteriormente, foi acrescentado 2 volumes de etanol. Os tubos foram armazenados a -20°C, *overnight*. No último dia, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm a 4°C por 1 hora. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado (armazenado previamente a -20°C). O *pellet* foi centrifugado a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos para retirada das possíveis impurezas. Novamente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi deixado secar a temperatura ambiente (até o DNA ficar transparente). Para ressuspender o DNA foi utilizada solução salina estéril (livre de endotoxina).

Os DNAs obtidos foram quantificados em Picodrop® e a pureza foi determinada através das razões de absorbância A260/280 (>1,8) para avaliar a pureza DNA/proteína conforme descrito por Warburg, Christian (1942), e A260/230 (>1,8), para avaliar a pureza em relação aos contaminantes.



**Figura 18** - Tubo da ultracentrífuga após a purificação do DNA plasmidial com cloroeto de céσιο. A agulha hipodérmica na parte superior é importante para retirada do ar, possibilitando assim a coleta das bandas na parte inferior. Fonte:

adaptado do livro Molecular Cloning, Sambrook, Russel (2001), terceira edição, página 1.69.

### 5.3 CULTIVO CELULAR E EXPRESSÃO DAS VLPS (Z/GFP, Z/DENV-P1 E Z/DENV-P2)

Células embrionárias de rim humano HEK 293A foram cultivadas sob condições assépticas, em garrafas de cultivo celular com filtro 0,22  $\mu\text{m}$  utilizando meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's MEM - Cultilab<sup>®</sup>), com soro fetal bovino 10% (Gibco<sup>®</sup>), a 37°C e 5% de dióxido de carbono e repicadas a cada dois/três dias com tripsina-EDTA 0,05%, 1X, Gibco<sup>®</sup>, conforme instruções do fabricante. Para expressão das proteínas, células HEK 293A foram submetidas a protocolo de transfecção com Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen<sup>®</sup>) seguindo recomendações do fabricante, utilizando os plasmídeos descritos nos tópicos acima. A razão utilizada de DNA: lipofectamina foi 1:4 (exemplo 2,5  $\mu\text{g}$  de DNA/ 10  $\mu\text{l}$  de lipofectamina para cada poço da placa de seis poços). Como controle positivo da expressão foi utilizado o plasmídeo pZ-eGFP, uma vez que células transfectadas com este plasmídeo são capazes de expressar a proteína Z/GFP, de fluorescência verde. Além deste reagente de transfecção, também foi utilizado polietilenimina (PEI), conforme protocolo cedido gentilmente pela Dra. Cristina Silvia Borio da Universidad Nacional de Quilmes.

Para transfecção com PEI, para cada poço foi utilizado um tubo estéril (0,6 ml) contendo 1 $\mu\text{g}$  e 2 $\mu\text{g}$  de DNA (aproximadamente 1 $\mu\text{L}$  ou 2 $\mu\text{L}$  de DNA e quantidade suficiente para 11,3  $\mu\text{l}$  de NaCl 0,15M) e quantidade suficiente para (q.s.p) 100  $\mu\text{L}$  de meio DMEM sem soro fetal bovino. Em um segundo tubo (0,6 ml) foi acrescentado 4,7  $\mu\text{l}$  de PEI e q.s.p 100  $\mu\text{L}$  de meio DMEM sem soro fetal bovino. O conteúdo dos dois tubos foi misturado e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi colocada cuidadosamente sobre as células. Após 48 horas e 72 horas da transfecção, as células foram observadas em microscópio óptico invertido Olympus<sup>®</sup> IX51 e microscópio invertido de fluorescência Olympus<sup>®</sup> IX71, este último para avaliar o controle positivo da transfecção.

### 5.4 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VLPS

Em placa de cultivo celular de seis poços, células HEK 293A (30% de confluência) foram transfectadas utilizando reagente PEI, controle negativo (células transfectadas sem DNA), plasmídeo controle

positivo pZ-eGFP e amostras pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2, conforme descrito no item 5.3. Após 48 horas, foi realizado o ensaio de imunofluorescência indireta. Todas as etapas deste ensaio foram realizadas em temperatura ambiente. Inicialmente, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salino PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*). Em seguida, as células foram fixadas com PBS/4% formaldeído durante 20 minutos e lavadas uma vez com PBS 1X. Posteriormente, as células foram permeabilizadas com PBS/0,1% Triton X-100 por 10 minutos, seguida de uma lavagem com PBS 1X. Como anticorpo primário da reação, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-proteína Z (vírus Junín) produzido em coelho, gentilmente cedido Dr. Mario Enrique Lozano da Universidad Nacional de Quilmes. As células foram incubadas durante uma hora com anticorpo primário diluído 1:2000 em PBS 1X, 1% de soro albumino bovino (BSA – *Bovine Serum Albumine*, Sigma-Aldrich®) e 0,1% de Triton X-100. Após este período, as células foram submetidas à três lavagens com PBS de 10 minutos cada. Posteriormente, foi acrescentado o anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra IgG (H+ L) Alexa Fluor 555 (Molecular Probes Life Technologies®) diluído 1:500 em PBS 1X, 1% de BSA e 0,1% Triton X-100 com incubação de uma hora, a temperatura ambiente. Novamente as células foram submetidas à três lavagens com PBS 1X de 10 minutos cada. Ao término, as placas foram levadas para microscópio invertido de fluorescência (Olympus® IX71) e, visualizadas no campo claro e nos filtros para GFP (visualização das células com positividade para expressão de Z/GFP em verde) e TRITC (visualização das células com positividade para expressão de Z/DENV-P1 e Z/DENV-P2 em vermelho).

## 5.5 PURIFICAÇÃO DAS VLPS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Por se tratar de uma proteína que induz o brotamento viral, as Z/VLPs saem da célula e se deslocam até para o sobrenadante da cultura celular, onde podem ser purificadas através de clarificação, seguida de ultracentrifugação.

Portanto, para purificação de cada um das VLPs (controle positivo Z/GFP, amostras Z/DENV-P1 e Z/DENV-P2 e controle negativo sem transfecção), foi realizado transfecção em três garrafas grandes de 150 cm<sup>2</sup> cultivo celular utilizando Lipofectamine 2000 CD (Invitrogen®), conforme item 5.3. Após 72 horas, o sobrenadante da cultura celular foi coletado e clarificado por centrifugação em baixa velocidade 2800 X g, à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esta

etapa, as VLPs presentes no sobrenadante foram centrifugados em colchão de sacarose 30% (p/v) a 96.000 g durante 2 horas a 4°C, utilizando Ultracentrífuga Optima XE-100 Beckman Coulter®, rotor Sw 41.Ti, tubo Polyallomer, referência 331372 Beckman Coulter®. Finalmente, os *pellets* obtidos foram ressuspensos em PBS e armazenados temporariamente a 4°C (durante 7 a 10 dias).

## 5.6 VISUALIZAÇÃO DAS VLPS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME). Uma gota de cada VLP purificado (Z/GFP, Z/DENV-P1, Z/DENV-P2) e do controle negativo (sobrenadante de células HEK 293A não transfectadas) foi colocada sobre grids de níquel revestido com parlódio vaporizada com carbono, disposto em papel de filtro. Após a secagem do líquido, uma gota de acetato de uranilo 2% pré-filtrado foi acrescentada sobre os grids e o material foi incubado por 1 minuto no escuro. Após esta etapa, os grids foram secados cuidadosamente com papel de filtro e armazenados em porta grids. No dia seguinte, as amostras foram visualizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), JEM-1011 TEM.

## 5.7 IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo PP00846). Camundongos machos C57BL/6 provenientes do Biotério Setorial do MIP com idade de 8 semanas (4 animais por grupo) foram imunizados seguindo protocolo dose-reforço (**quadro 4**). Na dose, os camundongos foram imunizados através de via intramuscular (músculos posteriores da coxa do animal: bíceps femoral e/ou abductor) com agulha de insulina ultra-fina BD® Ultra-fine 100 U contendo no total 50 µg (25 µg administrados para cada coxa: direita e esquerda do animal) do DNA plasmidial em adjuvante monofosforil lipídico A (MPLA), concentração 1:1 (1 DNA diluído em salina: 1 MPLA), totalizando 100 µl por animal. No total foram utilizados 4 grupos, controle negativo contendo apenas salina e adjuvante, pZ-eGFP (50 µg) em MPLA, amostras pZ-DENV-P1 em MPLA e pZ-DENV-P2 em MPLA. A partir de duas semanas da primeira imunização, o sangue do animal foi coletado pela cauda, o soro foi separado e armazenado a -20°C. Na sexta

semana após a primeira dose, foi administrado o reforço, contendo separadamente 20 µg de peptídeo sintético P1 (VDRGWGNGCGLFGKGG - GenScript®) e P2 (CLGSQEGAMHTALTGATEI - GeneScript®) em adjuvante Incompleto de Freund (IFA), via subcutânea, conforme descrito na tabela abaixo. Após duas semanas após o reforço, o sangue dos animais foi coletado via retro orbital seguida de eutanásia dos camundongos em câmara de CO<sub>2</sub>. Os soros foram separados, armazenados a -20°C e utilizando nos ensaios imunológicos.

O adjuvante monofosforil lipídeo A (MPLA) é formado pelo lipopolisacarídeo (LPS) de *Salmonella minnesota* e possui a capacidade de induzir a síntese e liberação de citocinas, promovendo a geração de respostas imunológicas específicas. Esta indução pode ser realizada na ausência da associação com o antígeno, estimulando células que se encontram afastadas do local de indução. MPLA atua como agonista dos receptores Toll-like TLR-4, mediada pela sinalização por TRIF. Adjuvantes de Freund são emulsões de água em óleo, compostas pelo mono-oleato de manitol e podem ser divididas em adjuvante incompleto de Freund (IFA), ou seja, sem adição de micobactérias mortas pelo calor, ou completo (CFA), com a adição de micobactérias mortas pelo calor. O mecanismo de ação dos adjuvantes minerais é: estabelecer um repositório no local da injeção, permitindo uma liberação gradual e contínua da vacina, funcionar como veículo do antígeno emulsionado transportando-o para o sistema linfático, além de interagir com células mononucleares, tal como células fagocíticas e apresentadoras de antígeno (MATA-HARO et al., 2007; O'HAGAN, 2000).

A escolha da via de inoculação das vacinas e dos adjuvantes foi baseada na literatura, em trabalhos realizados pelo pesquisador japonês Kenji Okuda, onde ele utiliza como uma das doses vacina de DNA.



Grupos	Dose (semana 0) – via intramuscular	Reforço (semana 6) – via subcutânea
1	Salina + MPLA = 100 µl/animal	Salina + IFA = total 100 µl/animal
2	pZ-eGFP (50 µg) + MPLA = 100 µl/ animal	pZ-eGFP (25 µg) sem adjuvante = 100 µl/animal
3	pZ-DENV-P1 (50 µg) + MPLA = 100 µl/animal	P1 (20 µg) + IFA = 100 µl/animal
4	pZ-DENV-P2 (50 µg) + MPLA = 100 µl/animal	P2 (20 µg) + IFA = 100 µl/animal

**Quadro 4** – Esquema de imunização dos camundongos. Protocolo dose-reforço com vacina de DNA (dose) e peptídeos sintéticos (reforço).

## 5.8 ENSAIOS DE ELISA (*ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*) E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realização do ensaio imunológico, duas placas de ELISA de 96 poços (MAXISORP, NUNC Thermo Scientific<sup>®</sup>) foram previamente tratadas com tampão sódio-fosfato 0,1 M, pH 5,8 com 0,25% de glutaraldeído e incubadas durante 4 horas a temperatura ambiente (BUDET, THÈZE, ZOUALI, 1991). Após este período, o líquido foi removido e secado em papel toalha e as placas foram lavadas três vezes com o mesmo tampão sódio-fosfato 0,1 M (pH 5,8). Após a retirada completa do tampão, foram adicionados em placas separadas 100 µl/poço dos peptídeos (P1 e P2) na concentração de 0,5 µg/poço em tampão BBS (*Borate-Buffered Saline* – 0,1 M ácido bórico, 25 mM tetraborato de sódio, 0,15 M cloreto de sódio pH 8,4) e, em seguida, as placas foram incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, o líquido das placas foi retirado e as mesmas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem PBS 1X-0,1% Tween 20 (*Phosphate Buffered Saline* – 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Após a lavagem, foram acrescentados 200 µl/poço da solução de bloqueio PBS 1X-0,1% Tween20-1% BSA e as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C. Novamente, o líquido das placas foi retirado e as mesmas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem. Após a retirada completa do tampão de lavagem, foi acrescentado em cada poço e em duplicata os

soros de camundongos (*pool* dos soros de cada grupo), citados na tabela 3, previamente diluídos (1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200) em PBS 1X-0,1% Tween20-1% BSA durante uma hora e meia a duas horas a 37°C. Foi acrescentado também o branco em duplicata: dois poços contendo apenas água, invés de soro.

Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS 1X-0,1% Tween 20 e em seguida foi adicionado 100µl/poço do anticorpo secundário anti-camundongo IgG produzida em cabra conjugada a peroxidase (Sigma<sup>®</sup>, referência A5278-1ml) diluído conforme instrução do fabricante 1:10000 em PBS-0,1% Tween20-1% BSA e incubação a 37°C durante 1 hora. Após esta etapa, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e tratadas com 100µl/poço de OPD (o-fenilenediamina 1,0mg/ml Immunopierce referência 34005 (Thermo Scientific<sup>®</sup>) diluído em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 com peróxido de hidrogênio 30% (concentração de 1µl/ml de OPD), conforme instrução do fabricante e incubadas durante 20 minutos no escuro. Por último, foi acrescentado ácido sulfúrico 2,5M para parar a reação, conforme recomendação do fabricante do OPD. A leitura da absorbância foi feita no espectrofotômetro TECAN<sup>®</sup> modelo infinite M200 a 490nm, localizada no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB I) da UFSC. Na leitura final, o branco foi descontado. Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad<sup>®</sup> Prism 5 e teste One-Way ANOVA, com valor de  $p \leq 0,05$ .

## 5.9 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA VIRAL (PRNT – *PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST*) UTILIZANDO VÍRUS DA DENGUE

O ensaio de PRNT foi realizado conforme o Guia da OMS (WHO, 2007), com modificações. Células de carcinoma hepatocelular HuH7 foram cultivadas em garrafas com filtro 0,22µm, sob condições assépticas (capela de fluxo laminar) em meio DMEM (Cultilab<sup>®</sup>) com soro fetal bovino 10% (Gibco<sup>®</sup>), a 37°C e 5% de dióxido de carbono e foram repicadas a cada dois/três dias com tripsina-EDTA 0,05% Gibco<sup>®</sup> (1X), conforme instruções do fabricante. Após o tratamento com tripsina, células HuH7 foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi verificada com auxílio do corante azul de tripano 0,4%. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços ( $8 \times 10^5$  células/poço) e incubadas em estufa de 37°C e 5% de dióxido de carbono. No dia seguinte, foi realizado o ensaio de PRNT: os soros dos camundongos coletado após o reforço (grupos 1, 3 e 4) foram inativados

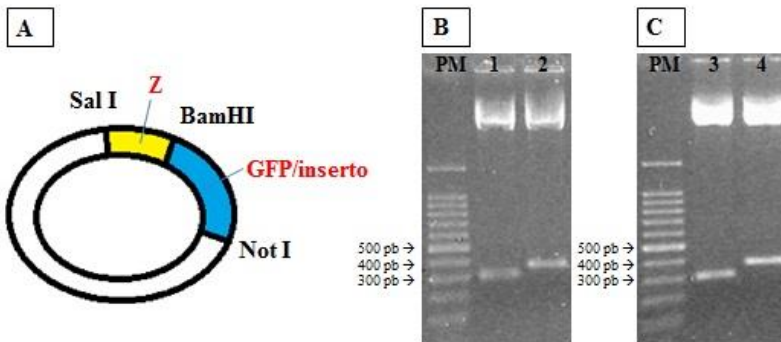
a 56°C por 30 minutos para eliminar o sistema complemento e diluídos em concentrações de 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320 em meio DMEM contendo PSA 1X (Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B (Gibco®)). Como controle positivo foi utilizado o anticorpo monoclonal 4G2, gentilmente cedido pelo ICC – Fiocruz (Instituto Carlos Chagas da Fundação Oswaldo Cruz de Curitiba-PR), no qual foi diluído nas mesmas concentrações que os soros dos camundongos. O vírus da Dengue sorotipo 2 (DENV-2) cepa DENV2ICC266 foi diluído com DMEM/PSA 1X em uma concentração final de aproximadamente 50-70 pfu (unidades formadoras de placas virais)/poço. A mesma quantidade de soro ou anticorpo 4G2 e vírus, previamente diluídos, foram misturados e incubados a 37°C por uma hora. Após este período, a mistura foi colocada sobre as células HuH7 e incubada a 37°C/ 5% de CO<sub>2</sub> durante uma hora e meia. Posteriormente, a mistura inoculada foi retirada, com auxílio de pipeta Pasteur de vidro estéril e bomba a vácuo e, em seguida foi acrescentado carboximetilcelulose 1,6%/DMEM/10% soro fetal bovino/PSA 1X e as células foram mantidas a 37°C/ 5% de CO<sub>2</sub>. No quinto dia foi realizada a revelação: as células foram fixadas com paraformaldeído 3% por uma hora, lavadas três vezes com PBS 1X e coradas com cristal violeta durante 30 minutos. Todas estas etapas foram realizadas em temperatura ambiente. Por último, as placas de cultivo foram lavadas em água corrente, secadas naturalmente e o número de unidades formadoras de placas virais (pfu) em cada poço foi contado e registrado. Todos os poços foram fotografados com auxílio de uma máquina fotográfica digital comum (resolução de 5 megapixels).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CLONAGEM PLASMIDIAL

#### 6.1.1 Confirmação da clonagem através de análise eletroforética

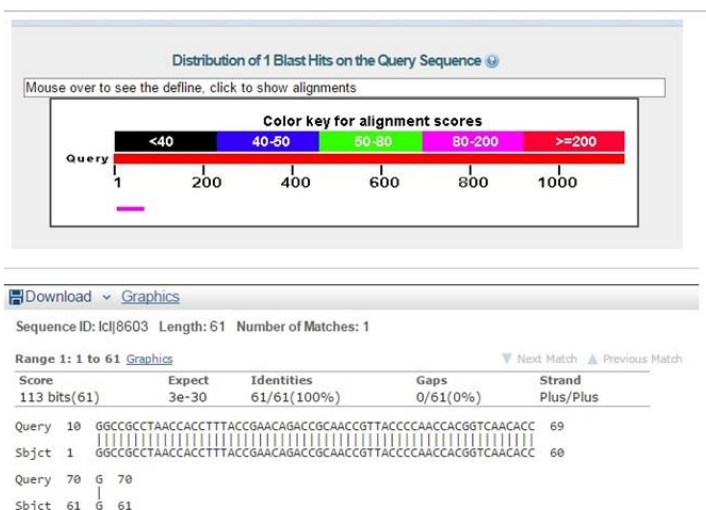
Devido o fato dos insertos baseados em oligonucleotídeos sintéticos possuírem tamanho reduzido, a visualização após restrição em análise eletroforética em gel de agarose é dificultada. Para confirmar a presença do inserto foram buscados no mapa do plasmídeo sítios de restrição que contemplassem apenas a região do gene da proteína Z (*SalI*/*BamHI*), bem como os genes da proteína Z somados ao inserto (*SalI/NotI*). Desta forma, os plasmídeos obtidos foram digeridos com estas enzimas de restrição mencionadas anteriormente e em seguida, analisadas em gel de agarose a 1%. Deste modo, foi possível visualizar a diferença de tamanho entre os fragmentos conforme **figura 19**.



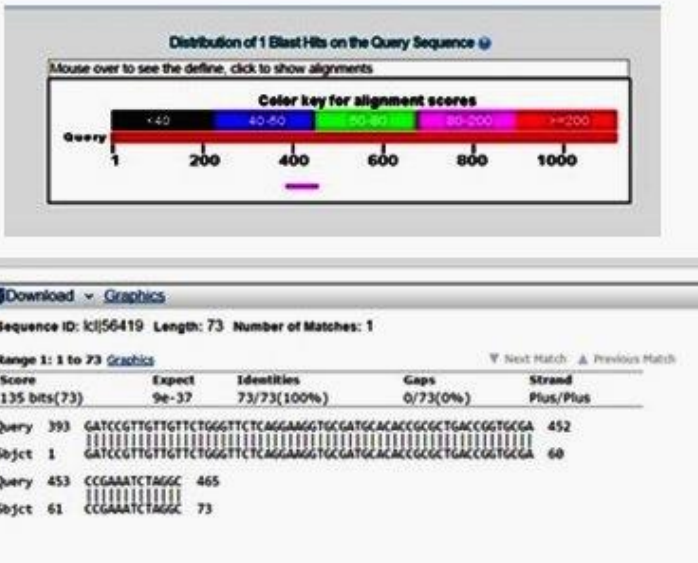
**Figura 19** – Estratégia de clonagem e gel de agarose. **A:** a figura ilustrativa mostra uma parte do mapa do DNA plasmidial pZ-eGFP e a estratégia de clonagem utilizada. As figuras **B** e **C** mostram as fotos dos géis de agarose a 1% dos plasmídeos clonados digeridos com *BamHI*, *NotI*, e *SalI*, onde **canaleta 1** e **2**, correspondem a pZ-DENV-P1, **canaletas 3** e **4** a pZ-DENV-P2 e **PM** ao padrão de peso molecular 100 pb da Promega®. **1** e **3:** plasmídeos digeridos com *BamHI* e *SalI*, fragmento de ~291pb, (relacionado ao gene da proteína Z de 282pb e alguns nucleotídeos dos sítios de *SalI* e *BamHI*); **2** e **4:** plasmídeos digeridos com *SalI* e *NotI*, fragmentos de ~342pb e ~364pb respectivamente.

## 6.1.2 Confirmação da clonagem através de sequenciamento

Os resultados da **figura 19** mostram o êxito da clonagem, no entanto, para confirmar se todas as sequências dos DNAs e o marco da fase de leitura aberta estavam corretos (ORF - *Open Reading Frames*), características estas que poderiam comprometer a sequência final das proteínas, foi necessário realizar o sequenciamento dos plasmídeos pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2. Nas **figuras 20 e 21** é possível observar o alinhamento das sequências no programa BLASTn e o marco da fase aberta de leitura (**figura 22 e 23**).



**Figura 20** - Alinhamento da sequência do plasmídeo clonado pZ-DENV-P1 com o oligonucleotídeo sintético DENV-P1. O resultado obtido foi 100% de identidade. Programa utilizado: BLAST n.



**Figura 21** - Alinhamento da sequência do plasmídeo clonado pZ-DENV-P2 com o oligonucleotídeo sintético DENV-P2. O resultado obtido foi 100% de identidade. Programa utilizado: BLAST n.

```
pDRAW32 - amostra pZ-DENV-P1 Fw - 1146 bp. - (Open Reading Frames)
File Edit View Settings Utilities Window Help
amostra pZ-DENV-P1 Fw, 1146 bp. (CIRCULAR)

pDRAW32 revision 1.1.124
UNLICENSED
Minimum Orf length = 300
Genetic code = Standard genetic code
Alternative initiation codons = None
*****
Orf# = 1
Frame = 4
Start = 355
End = 16
Length = 339 bp
MW = 12223 dalton
A280 = 20280 /M/cm reduced, 20910 /M/cm oxidised
MGNCNGASKSNQPDSSRATQPAAEFRVAHSSLYGRYNCKCCWFADTNLI 50
TCNDHYLCLRCHQGMLRNSDLNCNICWKPLPTTTVPVEPTAPPPGSGVDR 100
GWNGCGLFGKGG*
*****
```

**Figura 22** – Sequência da proteína Z/DENV-P1. Marco da fase aberta de leitura. Destaque em amarelo para o peptídeo de fusão 1. Programa: pDRAW32 (versão 1.1.124).

```

pDRAW32 - UNLICENSED - amostra pZ-DENV-P2 Rv - 1141 bp. - [Open Reading Frames]
File Edit View Settings Utilities Window Help
amostra pZ-DENV-P2 Rv, 1141 bp. (CIRCULAR)

pDRAW32 revision 1.1.124
UNLICENSED
Minimum Orf length = 350
Genetic code = Standard genetic code
Alternative initiation codons = None
*****
Orf#      =      1
Frame    =      5
Start    =    365
End      =     14
Length   =    351 bp
MW       = 12670 dalton
A280    = 14720 /M/cm reduced, 15287 /M/cm oxidised
MGNCNGASKSNQPDSSSRATQPAAEFRVAHSSLYGRYNCKCCWFADTNLI 50
TCNDHYLCLRCHQGMRLRNSDLCNICWKPLPTTITVPEPTAPPPGSVVVL 100
GSQEGAMHTALTGATEI*
*****

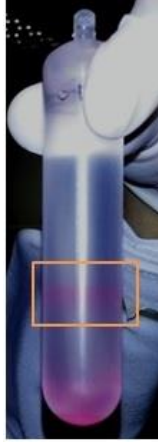
```

**Figura 23** – Sequência da proteína Z/DENV-P2. Marco da fase aberta de leitura. Destaque em amarelo para o peptídeo 2. Programa: pDRAW32 (versão 1.1.124).

Todos os plasmídeos analisados apresentaram sequência correta para cada uma das proteínas correspondentes.

## 6.2 MAXIPREP PARA OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM GRANDE QUANTIDADE

Após o êxito da clonagem, os plasmídeos pZ-eGFP, pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2 foram purificados através de maxiprep em ultracentrífuga conforme descrito por Garger e colaboradores (1983) com modificações (item 5.2.5), utilizando reagente cloreto de céσιο, conforme **figura 24**.



**Figura 24** - Foto de um dos tubos da ultracentrífuga após a purificação do DNA plasmidial. O retângulo laranja indica as duas bandas, com grande proximidade, do DNA plasmidial.

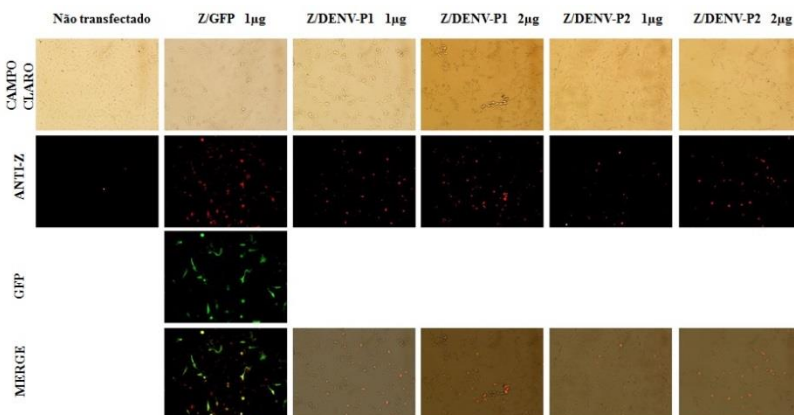
Após a etapa de purificação, os DNAs obtidos foram quantificados em PicoDrop<sup>®</sup>. A concentração média destes (pZ-eGFP, pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2) foi de aproximadamente  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  com valores de pureza dentro do critério estabelecido. Ou seja, DNAs com concentração extremamente elevada e com alto grau de pureza, características ideais para a realização de uma excelente transfecção e imunização. Apesar de não ter sido quantificada a endotoxina, as concentrações obtidas por esta purificação são muito baixas, de  $10^0 - 10^1$  unidades de endotoxina por micrograma de DNA (EU/  $\mu\text{g}$ ), assegurando assim uma boa imunização. (CULTEK, 2014)

### 6.3 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VLPs ATRAVÉS DE ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para confirmação da expressão das VLPs, células HEK 293A transfectadas com os plasmídeos citados anteriormente, foram submetidas a ensaio de imunofluorescência indireta, conforme item 5.3 e 5.4. Para realização deste, foi necessário primeiramente padronizar a quantidade de anticorpo primário e secundário, a fim de evitar *background* (fluorescência no controle negativo ou em amostras não



positivas). As fotos obtidas pelo microscópio de fluorescência podem ser visualizadas na **figura 25**.



**Figura 25** – Microscopia de fluorescência. A coloração vermelha indica positividade na expressão da proteína Z do vírus Junín nas células transfectadas com os plasmídeos pZ-eGFP, pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2, durante o ensaio de imunofluorescência. A cor verde indica expressão da proteína GFP nas células transfectadas com controle pZ-eGFP. Os anticorpos utilizados no ensaio foram: anticorpo policlonal anti-Z produzido em coelho 1:2000 e anticorpo anti-coelho IgG produzido em cabra Alexa Fluor 555 (Molecular Probes®) 1:500. Aumento de 20X (lente objetiva).

Na **figura 25** é possível visualizar as células expressando Z/GFP, Z/DENV-P1 e Z/DENV-P2. A coloração vermelha indica positividade na expressão de Z/VLP.

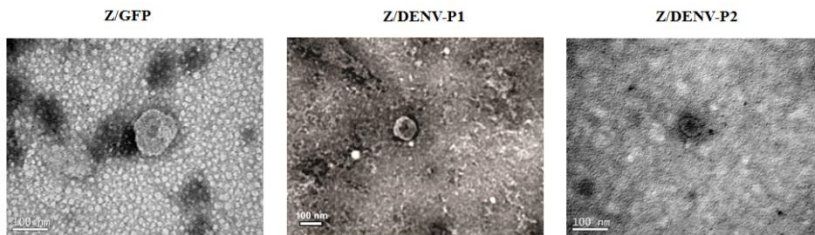
Durante a transfecção com Z/VLP foi possível perceber a presença de muitas células arredondadas que se descolaram da placa de cultura e se dirigiram ao sobrenadante. Acredita-se que esta característica esteja relacionada ao possível fato da proteína Z ser ligeiramente tóxica para células, uma vez que ela interfere com vários mecanismos importantes, como a tradução proteica. Outro fato importante é que os peptídeos 1 e 2 do vírus da Dengue também parecem ser tóxicos para a célula, pois existe um descolamento maior das células transfectadas por estas VLPs em relação a Z/GFP. No entanto, seriam necessários mais estudos, como realização de ensaio de MTT para poder comparar a citotoxicidade destas proteínas. Entretanto, podemos observar que estas características não interferiram na

transfecção e no ensaio de imunofluorescência. Neste caso, seria necessário quantificar por citometria de fluxo as eficiências da transfecção para avaliar a possível interferência desta possível toxicidade na taxa de transfecção.

Neste ensaio foi utilizado reagente PEI, por ser mais barato, porém com menor taxa de transfecção do que Lipofectamine 2000 CD - Invitrogen®, além disso, também foi utilizada uma quantidade menor de DNA (1µg e 2 µg) para evitar perda das células aderidas.

#### 6.4 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VLPS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Na **figura 26** é possível visualizar as fotos da microscopia eletrônica de transmissão das VLPs purificadas.



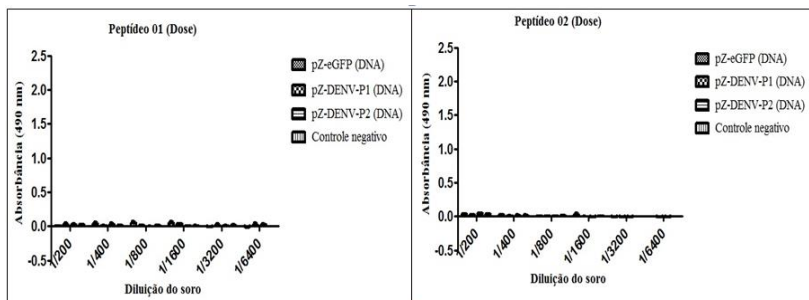
**Figura 26-** Fotos das VLPs obtidas por MET. Respectivamente, as fotos da esquerda, centro e direita mostram: Z/GFP, Z/DENV-P1 e Z/DENV-P2. O tamanho correspondente de Z/GFP é de aproximadamente 100 nm, enquanto Z/DENV-P1 e Z/DENV-P2 são um pouco menores que 100 nm. Na foto da esquerda, alguns precipitados de sacarose, que restaram durante a purificação de Z/GFP, também podem ser visualizados.

#### 6.5 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DAS VACINAS CONSTRUÍDAS

A fim de verificar a capacidade imunogênica das vacinas construídas, foram imunizados camundongos segundo um protocolo do tipo dose-reforço heterólogo, com DNA plasmidial (pZ-eGFP, pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2) em MPLA, seguida de reforço com peptídeos sintéticos DENV-P1 e DENV-P2 em adjuvante Incompleto de Freund (IFA). Duas semanas após cada imunização, o sangue foi coletado e a partir do soro foram realizados testes de ELISA.

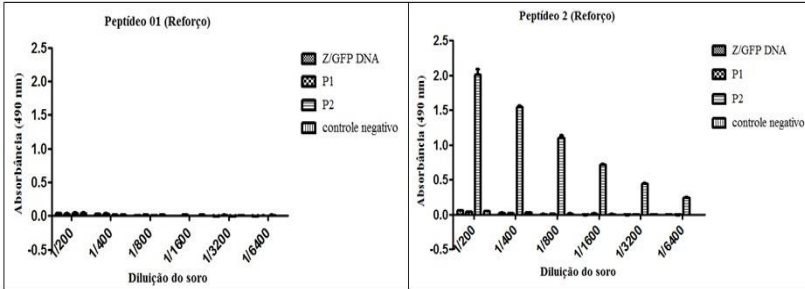
Neste presente trabalho, os dados do ELISA obtidos a partir dos soros dos camundongos vacinados com dose (DNA), seguida de reforço

(peptídeos sintéticos), encontram-se representados em forma de gráfico nas **figura 27** e **figura 28**, respectivamente.



**Figura 27** – Gráficos obtidos a partir do ensaio de ELISA dos soros dos camundongos imunizados somente com vacina de DNA (dose).

Os resultados do ensaio ELISA obtidos a partir do soro dos camundongos imunizados somente com vacina de DNA (dose) (**figura 27**) não apresentaram diferenças significativas, ou seja o  $p > 0,05$ , uma vez que as absorbâncias obtidas estiveram próximas dos valores do branco, ou seja, a zero. Este dado já era esperado, uma vez que apenas uma dose da vacina de DNA pode não ser capaz de induzir uma resposta imune significativa. Existem inúmeras estratégias para melhorar a resposta imunológica induzida por uma vacina de DNA. Uma delas pode ser a utilização de um reforço seguindo o protocolo dose-reforço heterólogo. (LI et al., 1993) O primeiro trabalho de grande importância, utilizando este regime combinado, foi realizado por Hu e colaboradores (1992) com SIV (*Simian immunodeficiency virus*), onde macacos da espécie *Macaca fascicularis* foram imunizados com vírus vacínia recombinante expressando SIV<sub>mme</sub> gp160 (dose), seguida de reforço com gp160, produzido em sistema baculovírus. Como resultado final, a imunização combinada demonstrou ser eficiente (HU et al., 1992).



**Figura 28** – Gráficos obtidos a partir do ensaio de ELISA dos soros dos camundongos imunizados com dose-reforço (DNA + peptídeo). O teste de ELISA demonstrou uma indução de uma resposta anti-DENV humoral específica após o reforço com altos títulos para P2 ( $p \leq 0.05$ ). Para P1, o resultado não foi significativo.

Em relação aos gráficos da **figura 28**, os resultados obtidos de P1 não confirmam que o mesmo é capaz ou não de induzir uma resposta imune humoral. Por se tratar de um peptídeo de tamanho pequeno, o ensaio de ELISA pode ter sido prejudicado e DENV-P1 não ter se fixado na placa, o que explica os valores de absorbância próximos à zero. Ao contrário de P1, o peptídeo DENV-P2 teve uma ótima fixação na placa, uma vez que este está complexado com uma proteína carreadora denominada KLH (“*Keyhole limpet hemocyanin*”), o que pode ter auxiliado DENV-P2 a se fixar na placa de forma eficiente.

O KLH foi identificado em um molusco da espécie *Megathura crenulata*, e possui inúmeras funções como carrear haptenos (moléculas de tamanho pequeno), peptídeos, hormônios, oligonucleotídeos, polissacarídeos e lipídeos (HARRIS, MARKL et al., 1999).

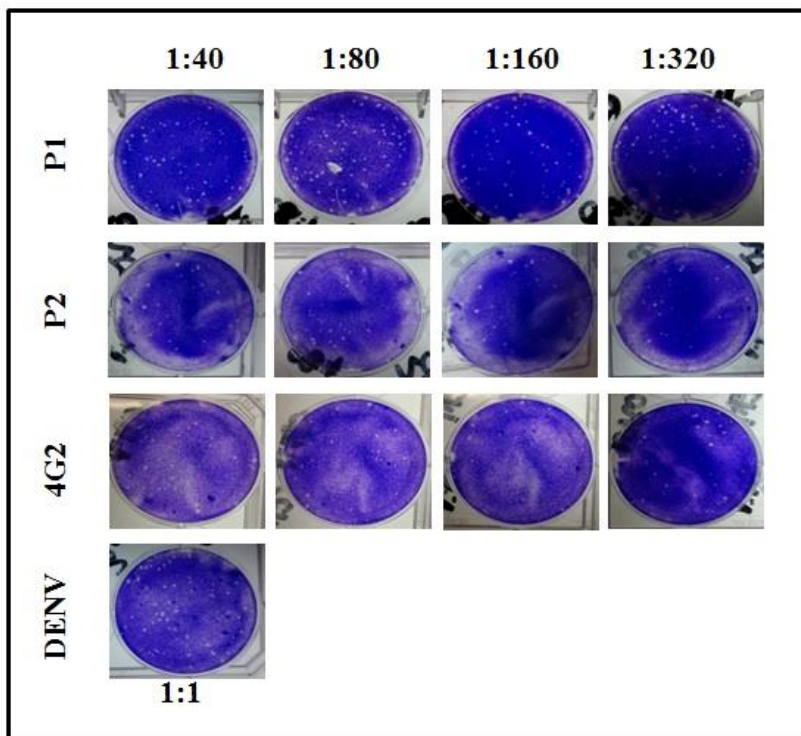
O gráfico da direita (**figura 28**) mostra uma regressão linear dos valores de absorbância a partir da imunização com o peptídeo 2 (DNA + peptídeo). Isto indica que não houve saturação do sistema em relação ao número de anticorpos gerados, possibilitando assim que outras imunizações com doses maiores ou com maior número de doses possam ser realizadas.

## 6.6 ENSAIOS DE PROTEÇÃO *IN VITRO*

O objetivo dos ensaios de proteção *in vitro* foi verificar a capacidade que a vacina construída no presente trabalho tem, em induzir

anticorpos neutralizantes durante a imunização, ou seja, aqueles que conferem proteção contra a infecção pelo vírus da Dengue.

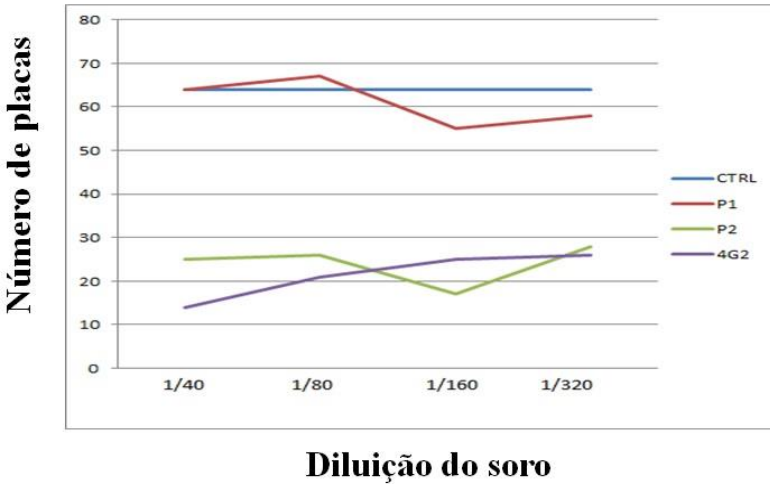
Os ensaios de PRNT foram realizados conforme item 5.9. As unidades formadoras de placas foram contadas, conforme mostra as Figuras 29 e 30.



**Figura 29** – Fotos do ensaio de PRNT. Os resultados do ensaio de PRNT mostraram que não houve inibição da infecção quando anticorpos anti-P1 foram testados, no entanto em relação ao antígeno P2 houve uma redução de cerca de 50% da infecção. **4G2**: anticorpo utilizado como controle positivo.

O anticorpo monoclonal 4G2 é dirigido contra determinantes antigênicos do sorotipo DENV-2, obtidos a partir do hibridoma produzido a partir da fusão dos linfócitos com células de mieloma. Tal anticorpo é capaz de reconhecer epítomos da proteína do envelope de todos os Flavivírus (GENTRY et al., 1982). Na literatura, 4G2 é

utilizado principalmente como controle positivo nos ensaios de PRNT envolvendo Flavivírus.



**Figura 30** – Gráfico do ensaio de PRNT. O gráfico mostra a relação entre o número de placas (pfu) *versus* diluição do soro.

É possível observar que o número de pfu (unidades formadoras de placas virais) manteve-se relativamente estável entre as amostras nas diluições de 1/40 a 1/320. Isto indica que é necessária uma titulação com maior número de diluições para chegar ao título real dos soros. Neste caso, podemos afirmar que o título é  $>320$ , no entanto seria interessante repetir o ensaio. O número de pfu no ensaio com anti-P1 manteve-se próximo do controle viral (apenas vírus DENV-2 sem soro de camundongos), no entanto o número de pfu obtidos no ensaio com anti-P2 manteve-se próximo do controle positivo (4G2), correspondendo a uma redução da infecção viral de aproximadamente 50%.

Devido ao custo elevado, a complexidade e ao longo período de tempo para execução da técnica, além da reduzida quantidade disponível do soro dos camundongos, não foi possível executar três repetições deste ensaio de PRNT. Neste caso foi utilizado apenas uma única repetição deste teste para cada uma das diluições realizadas. No entanto, para alcançar estes resultados a técnica foi previamente padronizada no laboratório.

## 7 DISCUSSÃO

A nossa hipótese de trabalho nos levou a construir duas vacinas recombinantes possivelmente tetravalentes contra a infecção pelo DENV e, testar a capacidade imunogênica (em camundongos) e protetora (*in vitro*) dos anticorpos obtidos durante a imunização.

Inicialmente, o desenho das nossas construções levou em consideração trabalhos anteriores do nosso grupo (DIAS, 2013), nos quais foram utilizados no lugar da proteína Z, a VLP HBcAg. Os antígenos utilizados nas construções foram três repetições em tandem dos mesmos peptídeos DENV-P1, DENV-P2, invés de apenas uma repetição, além da terceira construção contendo em conjunto DENV-P1 + DENV-P2. Os resultados obtidos nos ensaios imunológicos indicaram altos títulos de anticorpos nos soros dos camundongos imunizados com VLP HBcAg-DENV-P2 e VLP HBcAg-DENV-P1+P2 (em adjuvante Montanide ISA720). Ademais, foram observadas algumas alterações estruturais na VLP utilizada, possivelmente pelo número de repetições dos peptídeos. Além disso, não foram realizados ensaios de PRNT (DIAS, 2013).

Em relação às nossas construções atuais, primeiramente pensou-se em realizar reação de PCR convencional utilizando iniciadores para o plasmídeo pET-28a, utilizado por Dias (2013), contendo genes para três repetições em tandem de DENV-P1 e de DENV-P2, seguida da retirada do gene GFP de pZ-eGFP e subclonagem do fragmento amplicado em pZ (sem GFP). No entanto, devido à intensa repetição de nucleotídeos, codificando aminoácidos como valina e glicina, não foi possível realizar com sucesso o ensaio de PCR e de subclonagem. Deste modo, optou-se por sintetizar em empresa terceirizada os oligonucleotídeos contendo apenas uma repetição para DENV-P1 e DENV-P2, já contemplando os sítios parciais para as enzimas de restrição, necessárias para a clonagem direta em pZ (sem GFP). Os resultados obtidos pela análise eletroforética dos clones foram positivos (pZ-DENV-P1 e pZ-DENV-P2) e o sequenciamento permitiu a confirmação das sequências do DNA e também da proteína, que encontraram-se corretas, de acordo com o esperado.

O ensaio de imunofluorescência permitiu concluir que a proteína Z foi expressa com sucesso nas células transfectadas com o controle positivo (Z/GFP) e com as amostras (Z/DENV-P1 e Z/DENV-P2). A respeito dos nossos resultados de microscopia eletrônica de transmissão das VLPs, vale mencionar que, embora os ensaios não tiveram reconhecimento do alvo mediante anticorpos, como o realizado por

Borio e colaboradores (2012), o contraste obtido pelo acetato de uranilo a 2% permitiu visualizar estruturas semelhantes à *virus-like particles*. Portanto, os resultados do sequenciamento, em conjunto com a imunofluorescência e a microscopia eletrônica de transmissão puderam confirmar a correta expressão das VLPs Z/DENV-P1 e Z/DENV-P2.

O ensaio de imunização dos camundongos realizada pela vacina composta pelo plasmídeo recombinante (DNA) contendo genes para Z (JUNV) e o peptídeo 2 (dose) em adjuvante MPLA, seguida do reforço (após 6 semanas) com o peptídeo 2 sintético em adjuvante IFA (reforço), foi realizada com êxito. Os valores altos de absorvância obtidos pelo ensaio de ELISA indicaram que esta vacina foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos específicos anti-DENV-P2 em modelo murino. Além disso, é possível notar uma regressão linear dos valores de absorvância, o que indica que não houve saturação do sistema, possibilitando deste modo que outras imunizações com doses mais concentradas ou com maior número de doses possam ser realizadas.

Em um estudo complementar realizado pelo nosso laboratório (dados não mostrados) utilizando apenas um camundongo devido perdas e escassez de animais no biotério, indicou que a imunização de animais da linhagem C57/BL6 (8 semanas) com o VLP purificado Z/DENV-P2 sem adjuvante não foi capaz de induzir resposta imune significativa. O mesmo aconteceu com apenas uma dose do peptídeo sintético DENV-P2 com IFA. Este valor baixo durante a imunização com VLP pode estar relacionado com a ausência de adjuvante na formulação, além do baixo rendimento da purificação e a grande quantidade de impurezas remanescentes nos VLPs. No entanto, a imunização obtida pela dose (VLP Z/DENV-P2 sem adjuvante) seguida de reforço após 4 semanas (peptídeo DENV-P2 com adjuvante IFA) foi capaz de induzir resposta imune, no entanto os valores de absorvância obtidos no ensaio de ELISA estiveram muito abaixo daqueles da imunização dose-reforço composta pela vacina de DNA e peptídeo sintético (dose pZ-DENV-P2 em MPLA e reforço DENV-P2 em IFA). Estes dados sugerem que somente o peptídeo DENV-P2 sozinho não é capaz de induzir resposta imune significativa, o que indica que a plataforma tecnológica do vírus Junín, composta pela proteína Z-VLP é um satisfatório sistema carreador antigênico. Borio e colaboradores (2012) e Mirazo (2014) comprovaram esta função VLP da proteína Z, utilizando respectivamente: GFP e o gene ORF2 da Hepatite E. Entretanto, devido a um problema na técnica de ELISA, conforme citado nos resultados, o mesmo ensaio realizado com DENV-P1 não permitiu concluir sobre a imunogenicidade humoral induzida pela mesma. Não se pode afirmar se



a imunização com o antígeno DENV-P1 obteve sucesso ou não, entretanto, sabe-se que o mesmo não foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes.

Em 2014, um estudo envolvendo o peptídeo DENV-P2 foi realizado por nossos colaboradores (FLEITH, 2014). Sequências mutadas da região conservada E<sub>250-270</sub>, correspondente ao peptídeo 2 do vírus da Dengue (DENV-P2), foram subclonadas em cromossomo artificial bacteriano (BAC). O clone infeccioso denominado vBACMutJ obtido através da substituição simultânea dos resíduos 250-253 e 255 por alaninas, teve impacto significativo na redução da replicação e espalhamento do vírus em células humanas e de inseto. Estes resultados indicaram a presença de um papel importante do peptídeo 2 na infecção viral, no entanto, estudos adicionais seriam necessários para determinar o papel deste nas diferentes etapas do ciclo viral. Estes dados obtidos por Fleith corroboram com resultados obtidos neste presente trabalho, sugerindo que o peptídeo conservado DENV-P2 pode ser considerado como um antígeno promissor no desenvolvimento de candidatos vacinais contra Dengue.

A maioria das pesquisas envolvendo peptídeos como estratégia vacinal contra Dengue, utilizam regiões conservadas do domínio III da proteína do envelope. Por exemplo, Alhoot e colaboradores (2013) identificaram através do algoritmo BioMoDroid, quatro peptídeos antivirais putativos presentes na região lateral do *loop* do domínio III do vírus DENV-2. Dois destes peptídeos mostraram uma inibição significativa do vírus quando incubados simultaneamente e submetidos aos ensaios de PRNT, RT-qPCR e Western Blot. No teste de PRNT, os peptídeos DET2 e DET4 mostraram uma redução de 40,6%  $\pm$  24,8 e 84,6%  $\pm$  5,6, respectivamente, no número de placas virais de DENV-2. Além disto, as fotos de microscopia eletrônica de transmissão indicaram uma irregularidade na superfície das partículas virais quando tratadas com estes mesmos peptídeos (ALHOOT et al., 2013). Matsui e colaboradores (2009) mapearam, utilizando o domínio III do envelope (ED3) de DENV-3, alguns epítomos reconhecidos por anticorpos monoclonais reativos contra os quatro sorotipos de DENV, com atividade neutralizante contra DENV-3. Os resíduos L306, K308, G381, I387 e W389 demonstraram ser fundamentais na ligação antígeno-anticorpo. Outro trabalho desenvolvido por este grupo, envolvendo este mesmo painel de anticorpos foi realizado anteriormente com DENV-2, sendo que a localização dos sítios antigênicos do complexo DENV reativo em ED3 é similar em DENV-2 e DENV-3 (GROMOWSKI, BARRETT, BARRETT, 2008; MATSUI et al., 2009).

Rocha e colaboradores (2014) também realizaram um estudo envolvendo três peptídeos conservados da proteína E, denominados de: pep01

(MAKDKPTLDIELGGGGMAKMKPTLDIELGGGGMAKNKPTLDFELGGGGMAQGKPTLDFEL) presente no domínio I, pep02 (WLVHKQWFLDLPLPWGGGGWVHRQWFFDLPLPWGGGGWL VHRQWFLDLPLPWGGGGWL VHKQWFLDLPLW) e pep 03 (LVTFKTAHAKKQEVGGGGLVTFKNAAHAKKQEVGGGGLVTFK NPHAKKQDVGGGGLVTFKVPFAKRQDV) contemplados na região do domínio II. Para tal, foram realizadas imunizações com 50 µg de cada um destes peptídeos em grupos separados de camundongos (9 em cada grupo). Ao final, houve uma boa imunogenicidade humoral, no entanto, os anticorpos induzidos na imunização não foram capazes de neutralizar o vírus da Dengue, no ensaio *in vitro* de PRNT (ROCHA et al 2014). Além da sequência de aminoácidos, a grande diferença deste trabalho com o nosso aqui presente é o protocolo de vacinação utilizado. O protocolo de imunização dose-reforço heterólogo, ou seja, aquele onde se administra diferentes vacinas (por exemplo, DNA e proteína) contendo os mesmos antígenos (como DENV-P2), possui inúmeras vantagens perante o protocolo dose-reforço homólogo. Uma importante característica é o aumento da imunogenicidade humoral que pode ser facilitada ou aumentada com o efeito das vacinas. (LI et al., 1993; LU, 2009).

Como exemplificação da utilização do regime combinado, pode ser citado também o trabalho realizado pelo Instituto Oswaldo Cruz, onde foram administradas duas vacinas contra Dengue, descritas anteriormente na literatura, em camundongos Balb/c Neste estudo, foram empregados diferentes protocolos de imunização, utilizando como dose o DNA plasmidial pE1D2 que contém o ectodomínio de DENV-2 (domínios I, II e III) da proteína E, fusionada com a sequência sinal denominada ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA) e, como reforço foi utilizada a vacina YF17D-D2 (P44/S) baseada na estrutura quimérica do vírus da Febre Amarela (YF), contendo a substituição dos genes prM e E do vírus atenuado YF17D por estes mesmos genes de DENV-2. O protocolo dose-reforço inverso também foi executado (quimera como dose e DNA como reforço). Resultados revelaram que a imunização com a vacina de DNA em combinação com o vírus quimérico da febre amarela teve um potente efeito sinérgico na produção de anticorpos neutralizantes em camundongos no ensaio *in vitro* de PRNT contra DENV-2, além de induzir uma resposta imune

celular com produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T-CD8<sup>+</sup>. (AZEVEDO et al., 2013)

Em relação ao nosso ensaio de PRNT, anticorpos induzidos pela imunização dos camundongos com a dose pZ-DENV-P2 em MPLA, seguida do reforço DENV-P2 em IFA foram capazes de reduzir *in vitro* em 50% o número de placas virais do vírus DENV-2. Este resultado é bastante promissor, pois se trata de um candidato com potencial multivalente, entretanto, como citado na revisão bibliográfica, o papel dos anticorpos na neutralização do antígeno depende de múltiplos fatores, inclusive na correta ligação antígeno-anticorpo. Um estudo realizado recentemente permitiu caracterizar 145 anticorpos monoclonais contra o vírus da Dengue, em humanos infectados. Durante esta etapa, foi possível identificar um anticorpo contra o epítipo do dímero do envelope denominado EDE, altamente neutralizante e potente, capaz de neutralizar em 50% do vírus da Dengue em concentrações picomolares. Os pesquisadores levaram em consideração o fato que os trímeros do envelope são instáveis e altamente dinâmicas, permitindo que as subunidades se alternem entre os estados de dímero e trímero. Deste modo, eles acreditam que estes anticorpos neutralizantes podem se ligar a EDE por seleção conformacional, estabilizando os dímeros quando eles se formam, deslocando prM, que se liga ao mesmo local que o anticorpo monoclonal para o EDE (DEJNIRATTISAI et al., 2014).

Em relação ao nosso estudo, não se pode afirmar se a imunização com estes candidatos vacinais pode ou não acarretar no fenômeno de ADE em uma segunda infecção por outro sorotipo. Portanto, outros ensaios complementares são necessários, como o ensaio de neutralização *in vitro* utilizando pH semelhante ao do vírus da Dengue no momento da fusão com a membrana da célula hospedeira, além da utilização de outros sorotipos de DENV (não apenas DENV-2, mas também DENV-1, 3 e 4). Ademais, seria fundamental a realização de ensaios complementares como teste *in vitro* de ADE utilizando células contendo receptores Fc $\gamma$ R e teste de desafio em camundongos. Seria interessante avaliar também o tempo de intervalo entre as imunizações (dose e reforço), uma vez que um intervalo grande como o de 6 semanas permitiria que o indivíduo que já foi previamente infectado estivesse novamente exposto a uma segunda infecção por outro sorotipo do vírus da Dengue, no entanto aqueles anticorpos gerados durante a primeira imunização (dose) poderiam ser insuficientes para neutralizar eficientemente o vírus e, deste modo, induziriam o ADE. Para diminuir o risco de ADE, seria necessário utilizar uma única dose de uma vacina

contra Dengue, no entanto ela deveria ser completa e altamente imunogênica e ter a capacidade de induzir anticorpos neutralizantes eficientemente.

Neste presente trabalho, a preferência na utilização da vacina de DNA em relação à VLP purificada foi devido à facilidade na obtenção, purificação e o menor custo para a produção de DNA plasmidial, uma vez que as VLPs obtidas estavam em baixa concentração. Além disso, a administração da vacina de DNA no animal proporciona um dobramento adequado das proteínas expressas, obtendo-se epítomos na posição correta, além de induzir uma resposta imune tanto celular quanto humoral (LI et al., 1993; SAADE, PETROVSKY, 2012). Neste caso, o uso do protocolo dose-reforço (DNA + peptídeo) utilizado nas imunizações citadas aqui, pode ser considerado efetivo.

Futuramente, outros carreadores vacinais utilizando diferentes adjuvantes podem ser testados em conjunto e, comparados com esta formulação atual. Um propício candidato é o adenovírus recombinante tipo 5, produzido em células de mamífero HEK 293A (GRAHAM et al., 1977). Existem inúmeros estudos na literatura que demonstram que estes vírus são altamente imunogênicos, capazes de induzir ambas as respostas imune inata e adaptativa (TATSIS, ERTL, 2004).

## 8 CONCLUSÃO

1- Os objetivos de construção de duas vacinas recombinantes baseadas em peptídeos altamente conservados do envelope do DENV foram atingidos e as duas construções foram obtidas com sucesso.

Em relação à imunização dos camundongos:

2- A respeito do antígeno peptídeo 1 (DENV-P1) utilizado no protocolo de vacinação (DNA + peptídeo) , não foi possível concluir se a imunização obteve ou não sucesso. Ademais, o mesmo não foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes, servindo unicamente como controle negativo do ensaio de PRNT.

3- Os camundongos imunizados com antígeno peptídeo 2 (DENV-P2), administrado conforme protocolo dose-reforço (DNA + peptídeo), produziram altos títulos de anticorpos após o reforço, incluindo com atividade neutralizante intensa contra o vírus , comparável ao controle positivo utilizado no ensaio (4G2), já descrito na literatura.

A formulação inédita constituída pelo antígeno DENV-P2 (dose DNA pZ-DENV-P2 e reforço peptídeo DENV-P2) pode ser considerada um promissor candidato vacinal multivalente contra a Dengue.

Estudos posteriores *in vivo* são necessários para compreender qual o papel destes dois peptídeos na proteção contra a infecção pelo vírus DENV, mediada pela resposta imune do hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2012, p. 361 e 362.

ALEN M. F.; SCHOLS D. Dengue entry as target for antiviral therapy. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p.1-13, 2012.

ALHOOT, M. A. et al. Inhibition of Dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. **International Journal of Medical Sciences**, v.10, n.6, p.719-729, 2013.

ALIROL, E. et al. Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. **The Lancet Infectious Diseases**, v.11, n.2, p.131-141, 2011.

ALMEIDA, A. P. M. M. et al. Long-lasting humoral and cellular immune responses elicited by immunization with recombinant chimeras of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein. **Vaccine**, v.32, n.19, p.2181-2187, 2014.

AMBROSIO, A. et al. Argentine hemorrhagic fever vaccines. **Human Vaccines**, v.7, n.6, p.694-700, 2011.

AZEVEDO, A. S. et al. The Synergistic Effect of Combined Immunization with a DNA Vaccine and Chimeric Yellow Fever/Dengue Virus Leads to Strong Protection against Dengue. **PLoS one**, v.8, n.3, 2013.

BARCLAY, E. Is climate change affecting Dengue in the Americas? **Lancet**, v.371, n.9617, p.973-974, 2008.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue fever: a call for local, national, and international action. **The Lancet**, v.372, n.9634, p.205, 2008.

BEDERKA, L. H. et al. Arenavirus stable signal peptide is the keystone subunit for glycoprotein complex organization. **mBio**, v. 5, n. 6, p.1-14.

BORIO, C. S. et al. Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. **BMC Biotechnology**, v.12, 2012.

BOUDET, F.; THÈZE, J.; ZOUALI, M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. **Journal of Immunological Methods**, v.142, n.1, p.73-82, 1991.

BRANCO, L. M. et al. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. **Virology Journal**, v.7, 2010.

CAPEDING, M. R. et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent Dengue vaccine in healthy children in Asia: A phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v.384, n.9951, p.1358-1365, 2014.

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

CROTTY, S.; CAMERON, C.; ANDINO, R. Ribavirin's antiviral mechanism of action: Lethal mutagenesis? **Journal of Molecular Medicine**, v.80, n.2, p.86-95, 2002.

CULTEK. **Relevance of Endotoxin Contamination in Plasmid DNA**. Disponível em: < [http://www.cultek.com/inf/otros/perfil-proveedores/Perfil%20Macherey%20Nagel/Official\\_Note\\_-\\_Relevance\\_of\\_endotoxin\\_contamination\\_in\\_plasmid\\_DNA.PDF](http://www.cultek.com/inf/otros/perfil-proveedores/Perfil%20Macherey%20Nagel/Official_Note_-_Relevance_of_endotoxin_contamination_in_plasmid_DNA.PDF)> Acesso em: 4 dez 2014.

DEJNIRATTISAI, W. et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with Dengue virus. **Nature Immunology**, 2014.

DIAS, Mariana Oliveira. **Desenvolvimento de uma formulação vacinal experimental contendo peptídeos multi-sorotipo do vírus da Dengue incluídos em partículas pseudovirais quiméricas (VLPs) do vírus da Hepatite B, e teste em murinos**. 2013.110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ENRIA, D. A.; BRIGGILER, A. M.; SÁNCHEZ, Z. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. **Antiviral Research**, v.78, n.1, p.132-139, 2008.

FAN, L.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I. Z proteins of new world arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. **Journal of Virology**, v.84, n.4, p.1785-1791, 2010.

FEHLING, S. K.; LENNARTZ, F.; STRECKER, T. Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z. **Viruses**, v.4, n.11, p.2973-3011, 2012.

FLEITH, Renata Cristina. **Implicações do peptídeo conservado E250-270 da proteína “E” na infectividade do vírus da Dengue**. 2014. 121p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) –, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GARCÍA, C. C.; CANDURRA, N. A.; DAMONTE, E. B. Antiviral and virucidal activities against arenaviruses of zinc-finger active compounds. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v.11, n.3, p.231-237, 2000.

GENTRY, M. K. et al. Identification of distinct antigenic determinants on Dengue-2 virus using monoclonal antibodies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.31, n.3 I, p.548-555, 1982.

GÓMEZ, R. M. et al. Junín virus. A XXI century update. **Microbes and Infection**, v.13, n.4, p.303-311, 2011.

GÓMEZ-DANTÉS, H.; WILLOQUET, J. R. Dengue in the Americas: Challenges for prevention and control. **Cadernos de Saude Publica**, v.25, n.SUPPL. 1, p.S19-S31, 2009.

GOÑI, S. E. et al. Expression and purification of Z protein from Junín virus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, 2010.

GREEN, A. M. et al. Innate immunity to Dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **Journal of Molecular Biology**, v.426, n.6, p.1148-1160, 2014.



GRGACIC, E. V. L.; ANDERSON, D. A. Virus-like particles: Passport to immune recognition. **Methods**, v.40, n.1, p.60-65, 2006.

GROMOWSKI, G. D.; BARRETT, N. D.; BARRETT, A. D. T. Characterization of Dengue virus complex-specific neutralizing epitopes on envelope protein domain III of Dengue 2 virus. **Journal of Virology**, v.82, n.17, p.8828-8837, 2008.

GUY, B. et al. From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent Dengue vaccine. **Vaccine**, v.29, n.42, p.7229-7241, 2011.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews. Microbiology**, v.8, n.12 Suppl, p.S7-16, 2010.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection. **Viruses**, v.2, n.12, p.2649-2662, 2010.

HADINEGORO, S. R. S. The revised WHO Dengue case classification: Does the system need to be modified? **Paediatrics and International Child Health**, v.32, n.SUPP1, p.33-38, 2012.

HARRIS, J. R.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): A biomedical review. **Micron**, v.30, n.6, p.597-623, 1999.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v.55, n.4, p.289-295, 2012.

HU, S. L. et al. Protection of Macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. **Science**, v.255, n.5043, p.456-459, 1992.

ITAJAÍ, Município de. Dengue. **Dengue: Casos em Itajai já são 50**. Disponível em: <<http://www.itajai.sc.gov.br/noticia/10989/Dengue-casos-em-itajai-ja-sao-50>> Acesso em 3 fev 2015.

JENNINGS, G. T.; BACHMANN, M. F. The coming of age of virus-like particle vaccines. **Biological Chemistry**, v.389, n.5, p.521-536, 2008.

KACZMARCZYK, S. J. et al. Protein delivery using engineered virus-like particles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.41, p.16998-17003, 2011.

KIRNBAUER, R. et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.24, p.12180-12184, 1992.

KRISHNA S. S.; MAJUMDAR, I.; GRISHIN, N. V. Structural classification of zinc fingers. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.2, p.532-550, 2003.

KUSHNIR, N.; STREATFIELD, S. J.; YUSIBOV, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. **Vaccine**, v.31, n.1, p.58-83, 2012.

LAM, Bourree. **Vaccines are profitable, so what?** Disponível em: <<http://www.theatlantic.com/business/archive/2015/02/vaccines-are-profitable-so-what/385214/>> Acesso em 15 fev 2015.

LAMBRECHTS, L.; FAILLOUX, A. B. Vector biology prospects in Dengue research. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.8, p.1080-1082, 2012.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the expanding global distribution of aedes albopictus for Dengue virus transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.5, 2010.

LAVERGENE A. et al., 2013. Patawa Virus, a New Arenavirus Hosted by Forest Rodents in French Guiana. **Eco Health**, 2014.

LEVINE, M. M. et al. **New Generation Vaccines**. 4.ed. New York: Informa Healthcare, 2009, p.14, 298-302.

LI, S. et al. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.11, p.5214-5218, 1993.

- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**. 59: 23-61 p. 2003.
- LOUREIRO, M. E. et al. Molecular determinants of arenavirus Z protein homo-oligomerization and L polymerase binding. **Journal of Virology**, v.85, n.23, p.12304-12314, 2011.
- LOZANO, M. E. et al. Rapid diagnosis of argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, p.1327-1332, 1995.
- LU, S. Heterologous prime-boost vaccination. **Current Opinion in Immunology**, v.21, n.3, p.346-351, 2009.
- MACHADO, A. M. et al. Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.3, p.229-233, 2010.
- MALAVIGE, G. N. et al. Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v.80, n.948, p.588-601, 2004.
- MATA-HARO, V. et al. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. **Science**, v.316, n.5831, p.1628-1632, 2007.
- MATSUI, K. et al. Characterization of Dengue complex-reactive epitopes on Dengue 3 virus envelope protein domain III. **Virology**, v.384, n.1, p.16-20, 2009.
- MCALCER, W. J. et al. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. **Nature**, v.307, n.5947, p.178-180, 1984.
- MEDICAGO. **Why VLPs? For effective, long-lasting vaccines.** Disponível em: <<http://www.medicago.com/English/Technologies/Why-VLPs/>> Acesso em: 01 dez 2014.

MILICH, D. R. et al. Comparative immunogenicity of hepatitis B virus core and E antigens. **Journal of Immunology**, v.141, n.10, p.3617-3624, 1988.

MIRAZO, Santiago. **Caracterización molecular y variabilidad genética del Virus de la Hepatitis E**. 2014. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidad de La Republica, Montevidéo, Uruguai.

MODIS, Y. et al. Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v.427, n.6972, p.313-319, 2004.

MORAES, A. M; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia no Cultivo de Células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 428, p.439-442.

MORRISON, J. AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Innate immunity evasion by Dengue virus. **Viruses**, v.4, n.3, p.397-413, 2012.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to Dengue virus and prospects for a vaccine. **Annual Review of Immunology**. 29: 587-619 p. 2011.

NORMILE, D. Surprising new Dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, 2013.

O'HAGAN, D. T. **Vaccine Adjuvants: Preparation methods and research protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2000, p.1, 49, 53- 54, 273-274 .

OSORIO, J. E. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent Dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia: A randomised, placebo-controlled, phase 1 study. **The Lancet Infectious Diseases**, v.14, n.9, p.830-838, 2014.

PAHO, Pan American Health Organization. **Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by country**: Epidemiological Week/ EW 48, updated Dec 19, 2014. Disponível em:<[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=28678&Itemid=270](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=28678&Itemid=270) >Acesso em: 30 dez 2014.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of Dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n.4, p.369-377, 2008.

PUMPENS, P.; GRENS, E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. **Intervirology**, v.44, n.2-3, p.98-114, 2001.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Treatment of Dengue fever. **Infection and Drug Resistance**, v.5, n.1, p.103-112, 2012.

RAMAKRISHNAN, L.; PILLAI, M. R.; RADHAKRISHNAN, N. R. Dengue vaccine development strategies and challenges. **Viral Immunology**, v. 28, n. 2, 2014.

RICHTER, M. K. S. et al. Immature Dengue virus is infectious in human immature dendritic cells via interaction with the receptor molecule DC-SIGN. **PLoS one**, v.9, n.6, 2014.

RIEDEL, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **Bumc Proceeding**, v.18, p.21-25, 2005.

ROCHA, R. P. et al. Evaluation of tetravalent and conserved synthetic peptides vaccines derived from Dengue virus Envelope domain I and II. **Virus Research**, v.188, p.122-127, 2014.

ROTHMAN, A. L. Immunity to Dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v.11, n.8, p.532-543, 2011.

ROY, P.; NOAD, R. Virus-like particles as a vaccine delivery system: Myths and facts. **Human Vaccines**, v.4, n.1, p.5-12, 2008.

SAADE, F.; PETROVSKY, N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v.11, n.2, p.189-209, 2012.

SABCHAREON, A. et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent Dengue vaccine in Thai schoolchildren: A randomised, controlled phase 2b trial. **The Lancet**, v.380, n.9853, p.1559-1567, 2012.

SAMBROOK S., RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, p.1.69.

STENGLEIN, M. D. et al. Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: candidate etiological agents for snake inclusion body disease. **mBio**, v.3, n.4, p.e00180-00112, 2012.

TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of Dengue: An update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.10, n.8, p.895-907, 2012.

TAPIA-CONYER, R.; BETANCOURT-CRAVIOTO, M.; MÉNDEZ-GALVÁN, J. Dengue: An escalating public health problem in Latin America. **Paediatrics and International Child Health**, v.32, n.SUPP1, p.14-17, 2012.

TATSIS, N.; ERTL, H. C. J. Adenoviruses as Vaccine Vectors. **Mol Ther**, v.10, n.4, p.616-629, 2004.

URATA, S.; DE LA TORRE, J. C. Arenavirus budding. **Advances in Virology**, v.2011, 2011.

URE, A. E. et al. Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junín virus N protein. **Journal of Medical Virology**, v.80, n.12, p.2127-2133, 2008.

VALENZUELA, P. et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. **Nature**, v.298, n.5872, p.347-350, 1982.

VILLAR, L et al. Efficacy of a tetravalent Dengue vaccine in children in Latin America. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 2, p.113-123, 2015.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolation and crystallization of enolase. **Biochem Z**, v. 310, p.384-421, 1942.

WHO, World Health Organization. **Guidelines for plaque reduction Neutralization testing of human antibodies to Dengue viroses**, 2007

WHO, World Health Organization. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**, 2009.

WHO, World Health Organization. **Global strategy for Dengue prevention and control**. 2012a.

WHO, World Health Organization. **Handbook for Clinical Management of Dengue**, 2012b.

WHO, World Health WHO. **Dengue control**. Disponível em: <<http://www.who.int/denguecontrol/en/>> Acesso em: 01 dez 2014.

WOLFF, S.; EBIHARA, H.; GROSETH, A. Arenavirus budding: A common pathway with mechanistic differences. **Viruses**, v.5, n.2, p.528-549, 2013.

YU, I. M. et al. Structure of the immature Dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v.319, n.5871, p.1834-1837, 2008.

ZAPATA, J. C.; SALVATO, M. S. Arenavirus variations due to host-specific adaptation. **Viruses**, v.5, n.1, p.241-278, 2012.

ZELTINS, A. Construction and characterization of virus-like particles: A review. **Molecular Biotechnology**, v.53, n.1, p.92-107, 2013.

ZHENG, A. et al. A toggle switch controls the low pH-triggered rearrangement and maturation of the Dengue virus envelope proteins. **Nature Communications**, v.5, 2014.