

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DUAS NOVAS
ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA O VÍRUS DENGUE**

RECIFE

2011

ANDRÉA NAZARÉ MONTEIRO RANGEL DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DUAS NOVAS ESTRATÉGIAS VACINAIS
CONTRA O VÍRUS DENGUE**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, para a obtenção do grau de
doutor em Ciências.

Orientadores: Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro
Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior

Recife
2011

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S586d Silva, Andréa Nazaré Monteiro Rangel da.

Desenvolvimento e avaliação de duas novas estratégias vacinais contra o vírus dengue/ Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva. — Recife: A. N. M. R. da Silva, 2011.

164 f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientadores: Laura Helena Vega Gonzales Gil, Sílvia Maria Lucena Montenegro, Ernesto T. A. Marques Jr.

1. Dengue. 2. Vacinas contra Dengue. 3. Avaliação. I. Gil, Laura H. V. Gonzales. II. Montenegro, Sílvia Maria Lucena. III. Marques Jr., Ernesto T. A. IV. Título.

CDU 616.92

ANDRÉA NAZARÉ MONTEIRO RANGEL DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE DUAS NOVAS ESTRATÉGIAS VACINAIS
CONTRA O VÍRUS DENGUE**

Tese apresentada ao Curso de
Doutorado em Saúde Pública do
Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, para a obtenção do grau de
doutor em Ciências.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil (Orientadora)
Departamento de Virologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Maria Helena Neves Lôbo Silva Filha (Titular Interna)
Departamento de Entomologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Nilma Cintra Leal (Titular Interna)
Departamento de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Marli Tenório Cordeiro (Titular Externa)
Departamento de Virologia e Terapia Experimental do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Rita de Cássia Maia (Titular Externa)
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, por toda força, união e amor incondicional.

À Dra. Laura Gil, chefe do Departamento de Virologia e Terapia Experimental, minha orientadora querida (chefa-ori), pelo desafio que foi iniciar na virologia molecular uma aluna que nunca tinha feito uma PCR, por todas as oportunidades, paciência, carinho, atenção e amizade.

À Dra. Sílvia Montenegro, do Departamento de Imunologia, minha amável co-orientadora, pelas longas conversas, pelo eterno incentivo e amizade.

Ao Dr. Ernesto Marques, pesquisador do Departamento de Virologia e Terapia Experimental, meu co-orientador, por todas as oportunidades ao longo dos meus sete anos no LaViTE, pelo incentivo e conhecimento compartilhado.

Ao Dr. Eduardo Nascimento, do Centro para Pesquisas em Vacina, da Universidade de Pittsburgh, pela colaboração direta neste e em outros trabalhos, pela dedicação e atenção dispensadas.

À Dra. Marli Tenório, do Departamento de Virologia e Terapia Experimental, pela valiosa contribuição durante a realização deste e de tantos outros trabalhos, pela força, troca de experiência em virologia e amizade.

A todos que fazem parte do grupo de virologia molecular, da Dra. Laura Gil, em especial a minha querida amiga-cumadre Sabrina, aos amigos Geórgia e Jefferson, pela participação direta em algumas etapas deste trabalho, pelos conhecimentos divididos, dúvidas discutidas e lágrimas compartilhadas.

À grande família do Departamento de Virologia e Terapia Experimental, entre estudantes, técnicos e funcionários, em especial a Amanda, Ana Lisa, Clintiano, Dóris e Verônica, pela convivência, suporte e amizade que tornaram o trabalho menos árduo.

Ao programa de pós-graduação em Saúde Pública, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, **MUITO OBRIGADA!**

“UMA LONGA VIAGEM COMEÇA COM UM ÚNICO PASSO.”
Lao-Tsé

SILVA, Andréa Nazaré Monteiro Rangel. **Desenvolvimento e avaliação de duas novas estratégias vacinais contra o vírus dengue**. 2011. Tese (Doutorado em Saúde Pública)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

RESUMO

A dengue é um problema de Saúde Pública em termos de morbidade e mortalidade, sendo reconhecida em mais de 100 países. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina encontra sua dificuldade na imunopatogênese da doença, fazendo-se necessária a construção de uma vacina tetravalente que seja capaz de imunizar contra os quatro sorotipos do vírus, em diferentes faixas etárias, sem eliciar o efeito deletério da febre hemorrágica do dengue. Para isto, novas tecnologias têm sido utilizadas no lugar dos sistemas de atenuação e inativação viral. Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver duas novas estratégias vacinais contra o vírus dengue, utilizando as seguintes abordagens: a primeira consistiu no desenvolvimento de uma vacina de DNA que expressava epítomos definidos de células B e T, do DENV-3, associados ao sinal de tráfego celular da proteína de membrana do lisossomo-LAMP. A segunda consistiu na expressão *in tandem* dos domínios III da proteína do envelope dos quatro sorotipos, fusionados ao replicon do vírus da febre amarela 17D. Foram utilizadas técnicas padrão de clonagem e de recombinação homóloga em levedura para a construção das diferentes abordagens. A expressão da vacina de DNA e a replicação autônoma dos replicons foram confirmadas pelo ensaio de imunofluorescência indireta de células transfectadas. Os resultados para a vacina de DNA mostraram com sucesso a expressão do LAMP-1 humano fusionado aos epítomos, no entanto, a construção não foi capaz de gerar resposta imune por anticorpos neutralizantes. A vacina baseada em replicons mostrou que é possível utilizar com sucesso os replicons como vetores vacinais e que estes permitem a expressão de genes heterólogos alvos. Nossos estudos representam uma etapa inicial para o desenvolvimento de novas formulações vacinais que podem constituir um importante avanço para o desenvolvimento de vacinas de última geração para o dengue.

Palavras-chaves: Dengue. Vacinas contra Dengue. Avaliação.

SILVA, Andréa Nazaré Monteiro Rangel. **Development and characterization of two different approaches for dengue virus vaccine.** 2011. Thesis (Doctorate em Public Health)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

ABSTRACT

Dengue virus infection represents a major, growing public health problem and more than 100 countries have endemic transmission. The development of a dengue vaccine has proved to be elusive due to the requirement of the vaccine to elicit protection against all four serotypes simultaneously, in different ages, and might not predispose individuals to the severe form of dengue infection, the dengue hemorrhagic fever. For this propose, new technologies has been used to replace the old viral attenuation and inactivation systems. In this way, the aim of this work was to develop two new vaccine strategies against dengue virus, using the following approaches: the former to develop a DNA vaccine based on the expression on B and T cell defined epitopes associated to the lysosome membrane protein-LAMP. The latter to construct subgenomic replicons, derived from a full-length cDNA of 17D strain of yellow fever virus, encoding the domain III of dengue virus envelope protein. All of them were generated by standard cloning and yeast recombinant techniques. The DNA vaccine expression and the autonomous replication of the replicons were confirmed by indirect immunofluorescence assay of transfected cells. Our results shown the success of expression of human LAMP-1 associated to the defined epitopes, although, the vaccine has not induced sufficient neutralizing antibodies levels. The results about the replicon-based vaccines, shown these vectors can be successfully used to express heterologous target genes. Our study represents a first step for the development of new vaccines approaches that could contribute for the development of dengue virus new generation vaccines.

Keywords: Dengue. Dengue Vaccines. Valuation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da glicoproteína-E do vírus dengue. A proteína é apresentada em azul, verde e amarelo para mostrar seus domínios específicos.	26
Figura 2	Vacinas para dengue em desenvolvimento.	32
Figura 3	Fluxograma metodológico.	48
Figura 4	Mapa do plasmídeo sintético pGA15_DENV3_epit_opt.	60
Figura 5	Mapa do plasmídeo p43-HIVhumanLAMP/gag.	61
Figura 6	Diagrama esquemático da estratégia de construção dos replicons tetravalente e monovalentes.	76
Figura 7	Produção total de IgG em camundongos Balb/c elicitada por epítomos do envelope do DENV-3.	87
Figuras 8	Resposta imune celular elicitada em camundongos Balb/c imunizados com epítomos do envelope do DENV-3.	88
Figura 9	Confirmação das clonagens por digestão enzimática.	92
Figura 10	Mapa dos plasmídeos construídos: p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit.	94
Figura 11	Expressão dos construídos vacinais em células COS-1 transfectadas, avaliadas através de imunofluorescência utilizando anticorpos que reconhecem a proteína LAMP-1.	95
Figura 12	Expressão dos construídos vacinais em células BHK-21 transfectadas, avaliadas através de imunofluorescência utilizando anticorpos que reconhecem a proteína LAMP-1.	96
Figura 13	Teste de neutralização por redução de placas utilizando soros de camundongos Balb/c imunizados com os construídos (p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit) e com os controles (p43.2 e PBS).	98
Figura 14	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.	100

Figura 15	Mapa do plasmídeo construído para o replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.	100
Figura 16	Expressão <i>in vivo</i> da proteína GFP do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.	102
Figura 17	Expressão <i>in vivo</i> da proteína GFP do plasmídeo <i>Green Lantern</i> .	103
Figura 18	Expressão das proteínas não-estruturais do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.	104
Figura 19	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) para confirmação da construção do replicon pBSC_repΔprM-E_YFV_17D.	106
Figura 20	Mapa virtual para o replicon pBSC_repΔprM-E_YFV_17D.	106
Figura 21	Replicação do replicon pBSC_repΔprM-E_YFV_17D analisada através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos que reconhecem as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da febre amarela, presentes nesta construção.	107
Figura 22	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D.	109
Figura 23	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) de cada fragmento da recombinação, para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D.	109
Figura 24	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) de cada fragmento da recombinação, para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D.	111
Figura 25	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) de cada fragmento da recombinação, para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D.	112
Figura 26	Replicação do replicon tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D, 72h pós-transfecção em células BHK-21, analisada através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos que reconhecem as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da febre amarela, presentes nesta construção.	113
Figura 27	Construções monovalentes pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-D4), 72h pós-transfecção em células BHK-21, analisada através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos que reconhecem as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da febre amarela, presentes nesta construção.	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Epítomos de célula B mapeados na glicoproteína do envelope do DENV-3.	50
Quadro 2	Epítomos de célula T mapeados na glicoproteína do envelope do DENV-3.	51
Quadro 3	Epítomos de célula T mapeados na proteína não-estrutural NS1 do DENV-3.	52
Quadro 4	Epítomos de célula T mapeados na proteína não-estrutural NS3 do DENV-3.	53
Quadro 5	Epítomos de célula B da glicoproteína E do envelope do DENV-3 definidos após análise da sobreposição.	54
Quadro 6	Epítomos de célula T da glicoproteína E do envelope do DENV-3 definidos após análise da sobreposição.	54
Quadro 7	Epítomos de célula T da proteína não-estrutural NS1 do DENV-3 definidos após análise da sobreposição.	55
Quadro 8	Epítomos de célula T da proteína não-estrutural NS3 do DENV-3 definidos após análise da sobreposição.	56
Quadro 9	Quadro aberto de leitura (<i>open reading frame-ORF</i>) do vírus DENV-3.	57
Quadro 10	Seqüência da proteína do envelope.	58
Quadro 11	Seqüência da proteína não-estrutural NS1.	58
Quadro 12	Seqüência da proteína não-estrutural NS3.	59
Quadro 13	Lista de <i>primers</i> específicos utilizados para a construção do replicon tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D.	77
Quadro 14	Lista de <i>primers</i> específicos utilizados para a construção dos replicons monovalentes pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D.	78

Quadro 15	Lista de <i>primers</i> específicos utilizados para a construção dos replicons monovalentes pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D.	79
Quadro 16	Seqüências finais dos epítomos para síntese.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
A	Aminoácido alanina
AdV5	Adenovírus tipo 5
Ag	Antígeno
AmpR	Resistência à ampicilina
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney Cell</i> (célula de rim de <i>ramster</i>)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (soro albumina bovina)
C	Aminoácido cisteína
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro para Controle de Doenças e Prevenção)
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CIP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (fosfatase alcalina)
C-LAMP	Região C-terminal da proteína LAMP
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CM	Construção Monovalente
CN	Controle Negativo
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COS-1	<i>African Green Monkey Kidney Cell-SV40 transformed</i>
CT	Construção Tetravalente
D	Aminoácido ácido aspártico
DC	Dengue Clássica
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
DI	Domínio I

DII	Domínio II
DIII	Domínio III
ddH ₂ O	Água destilada
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> (dimetil-sulfóxido)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide Triphosphate</i> (desoxirribonucleotídeos fosfatados)
E	Aminoácido ácido glutâmico
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
epit	Epítopo
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Spot</i>
F	Aminoácido fenilalanina
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (soro bovino fetal)
Fc	<i>Fragment Crystallizable Region</i> (região Fc do anticorpo)
FHD	Febre Hemorrágica do Dengue
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de Fluoresceína)
G	Aminoácido glicina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	Guanosina Trifosfato
H	Aminoácido histidina
HCMV	<i>Human Cytomegalovirus</i> (citomegalovírus humano)
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> (vírus da hepatite C)
HEK-293	<i>Human Embryonic Kidney Cell</i> (célula embrionária de rim de humano)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
I	Aminoácido isoleucina
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
JAM	Cepa da Jamaica do vírus dengue sorotipo 2
JEV	<i>Japanese Encephalitis Virus</i> (vírus da encefalite japonesa)
K	Aminoácido lisina
KDa	Kilodalton
L	Aminoácido leucina
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LAMP	<i>Lysosome Associated Membrane Protein</i> (proteína de membrana associada ao lisossomo)
LAVITE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
LB	<i>Luria-Bertani Broth</i> (meio de cultura)
LiOAc	Acetato de Lítio
M	Aminoácido metionina
M	Molar
mM	Milimolar
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
MTase	Metiltransferase
MVEV	<i>Murray Valley Encephalitis Virus</i> (Vírus da encefalite do Vale Murray)
μg	Micrograma (10 ⁻⁶ gramas)
μl	Microlitro (10 ⁻⁶ litros)
mg	Miligrama (10 ⁻³ gramas)
MHC I	<i>Major Histocompatibility Complex Class I</i> (complexo de histocompatibilidade principal classe I)
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i> (complexo de histocompatibilidade principal classe II)
ml	Mililitro (10 ⁻³ litros)
MVEV	<i>Murray Valley Encephalitis Virus</i> (vírus da encefalite do vale Murray)
N	Aminoácido asparagina
NCR	Noncoding Region (região não-codificante)

NGC	Cepa <i>New Guinea C</i> (Nova Guiné C) do vírus dengue sorotipo 2
NIH	<i>National Institute of Health</i> (Instituto Nacional de Saúde)
N-LAMP	Região N-terminal da proteína LAMP
NS	<i>Nonstructural protein</i> (proteína não estrutural)
NTPase	Nucleosídeo 5'-Trifosfatase
nm	Nanômetro (10^{-9} metros)
OD	<i>Optical Density</i> (densidade ótica)
O/N	<i>Overnight</i>
opt	Otimizado
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro Aberto de Leitura)
P	Aminoácido prolina
pb	Pares de bases
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato salina)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PO	Peroxidase
PEG	Polietileno Glicol
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralizing Test</i> (teste de neutralização por redução de placas)
Proteína C	Proteína estrutural do Capsídeo
Proteína E	Proteína estrutural do Envelope
Proteína M	Proteína estrutural de Membrana
Proteína prM	Proteína estrutural pré-Membrana
PdVF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i>
Q	Aminoácido glutamina
R	Aminoácido arginina
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> (RNA polimerase dependente de RNA)
rep	Replicon
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucléico)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RTPase	RNA trifosfatase

S	Aminoácido serina
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> (vírus da síndrome respiratória aguda grave)
SBF	Soro Bovino Fetal
SC	Subcutânea
SCD	Síndrome do Choque do Dengue
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SFC	<i>Spot Forming Cells</i>
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
T	Aminoácido treonina
TA	Temperatura Ambiente
TBEV	<i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i> (vírus da encefalite do carrapato)
TC	Tampão Carbonato
TE	Tris-EDTA
Th1	<i>T helper cell type 1</i> (linfócitos T auxiliares tipo 1)
TMB	<i>Tetramethylbenzidine</i> (tetrametilbenzidina)
Trp	Triptofano
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos da América)
UTR	<i>Untranslated Region</i> (região não-traduzível)
V	Aminoácido valina
VERO	<i>African Green Monkey Kidney Cell</i> (célula de rim de macaco verde africano)
VLP	<i>Virus Like Particles</i> (Partículas Semelhantes à Vírus)
W	Aminoácido triptofano
WRAIR	<i>Walter Reed Army Institute of Research</i> (Instituto de Pesquisas das Forças Armadas Walter Reed)
Y	Aminoácido tirosina
YFV	<i>Yellow Fever Virus</i> (Vírus da Febre Amarela)
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (meio de cultura)
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i> (meio de cultura)
λ	Lambda (representa comprimento de onda)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Aspectos epidemiológicos do dengue	20
1.2 Modo de transmissão	22
1.3 Agente etiológico	24
1.4 Aspectos clínicos	28
1.5 Patogenia	30
1.6 Vacinas para dengue em desenvolvimento	31
1.7 Novas tecnologias para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue	35
1.7.1 Mapeamento de epítomos.....	35
1.7.2 Domínio III da glicoproteína do envelope.....	38
1.7.3 Moléculas sinalizadoras: <i>Lysosome-Associated Membrane Protein-LAMP</i>	40
1.7.4 Vetores vacinais: replicons.....	41
2 JUSTIFICATIVA	45
3 PERGUNTA CONDUTORA	46
4 OBJETIVOS	47
4.1 Objetivo geral	47
4.2 Objetivos específicos	47
5 MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1 Etapas envolvidas no desenvolvimento das estratégias vacinais contra o vírus dengue	48
5.2 Desenvolvimento de uma vacina de DNA contra o vírus da dengue sorotipo 3 utilizando epítomos de células B e T mapeados	49
5.2.1 Cultivo de células e de vírus.....	49

5.2.2 Mapeamento de epítomos e montagem da estratégia vacinal.....	49
5.2.3 Otimização das seqüências dos epítomos selecionados.....	59
5.2.4 Construção dos vetores p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit	60
5.2.5 Confirmação da fusão dos genes clonados nas construções p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit.....	62
5.2.5.1 Digestão enzimática.....	62
5.2.5.2 Seqüenciamento.....	62
5.2.6 Transfecção em células BHK-21 e COS-1.....	63
5.2.7 Ensaio de imunofluorescência indireta.....	64
5.2.8 Teste de imunogenicidade dos epítomos de célula B do DENV-3 em camundongos.....	64
5.2.9 Imunização dos camundongos com os construídos vacinais p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit.....	65
5.2.10 ELISA- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> para avaliação da resposta imune humoral dos epítomos de célula B em camundongos Balb/c.....	66
5.2.11 ELISPOT- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i> para avaliação da resposta da resposta imune celular dos epítomos de célula B em camundongos Balb/c.....	66
5.2.12 Análise da resposta humoral através do Teste de Neutralização por Redução de Placas.....	67
5.2 Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra o dengue, utilizando como vetor o replicon do vírus da febre amarela expressando o domínio III do envelope.....	69
5.3.1 Cultivo de células.....	69
5.3.2 Construção do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.....	69
5.3.3 Construção do replicon pBSC_repΔprM-E_YFV17D.....	70
5.3.4 Construção dos replicons tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D e monovalentes pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4).....	71

5.3.4.1 Construção do replicon tetravalente <i>pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D</i>	72
5.3.4.2 Construção dos replicons monovalentes <i>pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D</i> (<i>CMD1-CMD4</i>).....	73
5.3.5 Recombinação homóloga em levedura.....	80
5.3.6 Extração de DNA plasmideal de levedura.....	81
5.3.7 Confirmação das clonagens por PCR e seqüenciamento.....	81
5.3.8 Síntese de RNA e caracterização do replicon <i>in vitro</i>	82
5.3.8.1 PCR do genoma completo do replicon.....	82
5.3.8.2 Transcrição <i>in vitro</i>	82
5.3.8.3 Transfecção do RNA em células <i>BHK-21</i> por eletroporação.....	82
5.3.8.4 Imunofluorescência indireta.....	83
5.3.9 Trans-complementação e produção de VLPs.....	84
5.3.10 Aspectos éticos.....	85
6 RESULTADOS	86
6.1 Desenvolvimento de uma vacina de DNA contra o vírus dengue sorotipo 3 utilizando epítomos de células B e T mapeados	86
6.1.1 Análise da imunogenicidade em camundongos imunizados com epítomos humanos de célula B mapeados na glicoproteína do envelope do DENV-3.....	86
6.1.2 Montagem da estratégia vacinal utilizando epítomos de célula B e T mapeados.....	89
6.1.3 Otimização dos códons para expressão em células eucariotas.....	89
6.1.4 Construção dos vetores <i>p43_DENV3_epit_LAMP</i> e <i>p43_DENV3_epit</i> : confirmação da fusão dos genes clonados.....	91
6.1.4.1 Digestão enzimática.....	91
6.1.4.2 Seqüenciamento.....	93
6.1.5 Análise da expressão de LAMP do construído <i>p43_DENV3_epit_LAMP</i> em células <i>BHK-21</i> e <i>COS-1</i>	93

6.1.6 Avaliação da resposta imune humoral em camundongos Balb/C imunizados com os construídos p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit.....	97
6.2 Desenvolvimento de uma vacina de tetravalente contra o dengue, utilizando como vetor o replicon do vírus da febre amarela expressando o domínio III do envelope.....	99
6.2.1 Construção do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.....	99
6.2.2 Análise da expressão da proteína GFP do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP pela transfecção de células BHK-21.....	101
6.2.3 Construção do replicon do vírus da febre amarela pBSC_rep Δ prM-E_YFV17D.....	105
6.2.4 Análise da eficiência de replicação do replicon pBSC_rep Δ prM-E_YFV17D pela transfecção de células BHK-21.....	107
6.2.5 Construção dos replicons pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4).....	108
6.2.6 Análise da replicação dos replicons pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4) pela transfecção de células BHK-21..	112
6.2.7 Seqüenciamento.....	115
6.2.8 Trans-complementação e produção de <i>Virus Like Particles</i> (VLPs).....	115
7 DISCUSSÃO.....	116
8 CONCLUSÕES.....	124
9 PERSPECTIVAS.....	125
REFERÊNCIAS.....	126
ANEXO A- Otimização genética dos epítomos selecionados utilizando o software Leto 1.0.	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos do dengue

Os primeiros relatos de uma doença semelhante à dengue ocorreram entre 1779 e 1788, em epidemias simultâneas em Batavia (atual Jakarta), Cairo, Filadélfia e Sevilha, sugerindo a possibilidade de uma pandemia pelo vírus dengue. Posteriormente, epidemias pelo dengue foram descritas em Zanzibar (1823 e 1870), Calcutá (1824, 1853, 1871 e 1905), Oeste Indiano (1827) e Honk Kong (1901), indicando a primeira evidência de disseminação geográfica do vírus a partir de 1788, coincidindo com o aumento da navegação e do comércio global (WEAVER; VASILAKIS, 2009). Outras grandes epidemias ocorreram, em intervalos irregulares, em locais onde o mosquito vetor pode ser achado, como nos Estados Unidos (1922), Austrália (1925-1926, 1942), Grécia (1927-1928) e Japão (1942-1945) (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Após a segunda Guerra Mundial devido às imensas mudanças ecológicas, demográficas e epidemiológicas, o dengue passou a alastrar-se mundialmente, em áreas tropicais e subtropicais, sendo considerada uma das mais importantes doenças reemergentes (YAMADA *et al.*, 2002). Foram estabelecidas nesta época, comissões científicas para estudar a doença, seu agente etiológico e o desenvolvimento de testes de diagnóstico (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

Nas Américas, as epidemias de dengue foram relatadas desde o século XIX, momento da intensificação do transporte comercial entre os portos da região do Caribe e do Sul dos Estados Unidos, com outras partes do mundo. Os sorotipos 1 e 2 do vírus já circulavam nas Américas há vários anos, quando houve a introdução do sorotipo 3, relatada em 1994, na Nicarágua. Hoje, o sorotipo 3 circula em todos os países da América Central. Em 1988, foi também isolado em Porto Rico, o sorotipo 4 e atualmente, vários países da América do Sul e Central, apresentam a circulação dos quatro sorotipos do vírus dengue (CORDEIRO *et al.*, 2008a).

No Brasil, após a introdução do vetor do vírus, o *Aedes aegypti*, vindo da África no século XVI durante o comércio de escravos (FIGUEIREDO, 1996), o vírus atuou de maneira expressiva em epidemias no Rio de Janeiro (1846, 1922 e 1923), São Paulo (1851, 1853 e 1916) e Curitiba (1896) (BRASIL, 1996).

Com o início da campanha de erradicação do vetor, em 1904, por Oswaldo Cruz para o combate da Febre Amarela, houve uma queda no número de casos e o Brasil se manteve livre do *Aedes aegypti* até o ano de 1976. No fim da década de 70, devido ao rápido e desorganizado crescimento urbano, associado à falta de manutenção do programa de combate à febre amarela, houve a reintrodução do vetor e o estabelecimento do *Aedes aegypti* nas áreas urbanas de vários estados brasileiros (CORDEIRO *et al.*, 2008a; FIGUEIREDO, 1996).

Após cerca de 60 anos sem estar presente na literatura médica, o dengue ressurgiu em Boa Vista/Roraima entre 1981 e 1982, com o isolamento dos sorotipos 1 e 4, tendo ficados restritos a esta região (CORDEIRO *et al.*, 2008a; FIGUEIREDO, 1996). Em 1986, foi introduzido no estado do Rio de Janeiro, o sorotipo 1. Em 1990, a situação da dengue foi agravada pela introdução do sorotipo 2, também no Rio de Janeiro, com o aparecimento dos primeiros casos de febre hemorrágica do dengue, associados à infecção secundária. A introdução do sorotipo 3 no Brasil ocorreu no final do ano 2000, mais uma vez pelo estado do Rio de Janeiro, levando a graves epidemias neste estado e em outros estados brasileiros em 2002, momento em que foram notificados cerca de 791.000 casos, o maior número já registrado dentre todas as epidemias existentes. Estes três sorotipos circulam simultaneamente em todos os estados da federação, contribuindo para a incidência das formas graves da doença (CORDEIRO *et al.*, 2008a; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2002).

Em 30 de julho de 2010, a Secretaria de Saúde de Roraima notificou a Secretaria de Vigilância em Saúde (MS/SVS), um caso suspeito de dengue pelo sorotipo viral 4. O diagnóstico emitido pelo Instituto Evandro Chagas (IEC, Belém-PA) em 05 de agosto do mesmo ano, confirmou o primeiro caso e mais outros três casos, como sendo de infecção pelo sorotipo 4. No dia 03 de janeiro de 2011, o Instituto Evandro Chagas (IEC, Belém-PA) comunicou a Secretaria de Vigilância em Saúde (MS/SVS), a Fundação de Vigilância em Saúde e a Secretaria de Saúde do município de Manaus (SES/AM), a confirmação de um caso de dengue causado pelo sorotipo 4, em Manaus (BRASIL, 2010, 2011).

Em Pernambuco, o primeiro caso de dengue pelo sorotipo 1 foi relatado em 1987, com um reduzido número de casos notificados (2.118 casos) e 1.642 casos confirmados como dengue clássica. Entre os anos de 1988 a 1994, o Estado experimentou um período sem registro de casos autóctones, quando em janeiro de 1995, foram notificados os primeiros casos de dengue que deram início à segunda epidemia em Pernambuco, inicialmente em Recife, com a introdução do dengue sorotipo 2. Nesta ocasião foram notificados 9.982 casos, sem ocorrência ou notificação de casos de dengue hemorrágica. No ano de 2002, o estado experimentou uma epidemia pelo dengue sorotipo 3, com 96,2 % dos casos tendo sido

notificados apenas no primeiro semestre. Esta epidemia ocorreu de forma explosiva, visto que a população era susceptível a este novo sorotipo, com uma incidência de 1.438 casos por 1000 mil habitantes (CORDEIRO *et al.*, 2008b, 2008c). Após este período epidêmico, o dengue 3 permaneceu como o sorotipo predominante até 2008. Já em 2009, os sorotipos dengue 2 e 3 foram isolados em proporções semelhantes, o que caracteriza um cenário no qual não foi possível identificar o predomínio de um sorotipo (INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE, 2009). No ano de 2010, dados da semana epidemiológica 52 referentes ao monitoramento da circulação viral no Estado, confirmaram a circulação dos sorotipos dengue 1 e 2 e, até o momento, não foram isolados outros sorotipos virais em circulação (INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE, 2010).

Atualmente, a dengue é um problema de Saúde Pública, em termos de morbidade e mortalidade, reconhecida em mais de 100 países (nas Américas, Sudeste Asiático, Oeste do Pacífico, África e Leste do Mediterrâneo) e com cerca de três bilhões de pessoas sendo afetadas em áreas de risco (GUY; ALMOND, 2008) e por isso, o desenvolvimento de uma vacina para a doença tem sido uma prioridade da Organização Mundial da Saúde por três décadas (WEBSTER; FARRAR; ROWLAND-JONES, 2009).

1.2 Modo de transmissão

Os arbovírus formam um grupo de agentes infecciosos transmitidos por artrópodes hematófagos de um hospedeiro vertebrado para outro. Este grande grupo inclui as famílias *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Arenaviridae*, *Filoviridae*, *Rabdoviridae* e *Flaviviridae* (BROOKS; BUTEL; ORNSTON, 1998).

A epidemiologia de arboviroses é função de parâmetros ecológicos e fisiológicos, no qual a competência do vetor é muito importante (SONENSHINE; MATHER, 1994). Essa competência e a habilidade do vetor para adquirir, manter e transmitir agentes infecciosos aos seus hospedeiros é determinada por fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo a habilidade fisiológica do tecido do vetor de se tornar infectado e manter um agente infeccioso particular (LANE, 1994).

As suspeitas de que o vírus dengue era transmitido por um mosquito começaram no século XX e em 1906, Bancroft apresentou o *Aedes aegypti* como o principal vetor para o vírus dengue (HENCHAL; PUTNAK, 1990), sendo também o responsável pela transmissão

da doença em áreas urbanas (GUBLER, 1998), em estações chuvosas e quentes (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

Estima-se que cerca de dois terços da população mundial vive em áreas tropicais e subtropicais infestadas pelo mosquito *A. aegypti* e que anualmente 80 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus (GUY; ALMOND; 2008). Muitas áreas urbanas nas regiões tropicais estão expostas à transmissão do dengue e a extensão geográfica da doença está limitada à distribuição dos vetores. No entanto, esta extensão não é estática, com expansões e retrações tendo sido documentadas através dos tempos. Mesmo com os progressos nas novas técnicas para o controle do vetor, o conhecimento sobre como o vírus dengue e seus vetores se tornam extintos, ainda não foi elucidado (WILLIAMS *et al.*, 2010).

O vírus dengue é transmitido entre hospedeiros humanos pelo mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus*, ambos adaptados para se reproduzir em ambientes artificiais (GUBLER, 2002). O principal vetor de transmissão do vírus dengue ao homem nas Américas, o *Aedes aegypti*, é um mosquito de hábito diurno que apresenta picos de atividade ente 2 e 3 horas após o nascer do dia e algumas horas antes do anoitecer. Os mosquitos *Aedes albopictus* são alóctones de região neotropical, cujo primeiro registro em território brasileiro foi feito em 1986, no Rio de Janeiro (LOWENBERG-NETO; NAVARRO-SILVA, 2002). A espécie ainda não foi incriminada como vetor do dengue no Brasil, mas é capaz de infectar-se com o vírus e transmiti-lo. Nas Américas, foi encontrado infectado naturalmente com o vírus da encefalite eqüina do leste e em laboratório demonstrou competência à infecção e à transmissão para vinte e dois distintos arbovírus. No Brasil, sua presença foi detectada em quatorze estados e em laboratório mostrou capacidade de transmitir dengue, febre amarela e vírus da encefalite eqüina venezuelana (SEGURA *et al.*, 2003).

O principal vetor, *Aedes aegypti*, parece ter se originado na África e se disseminou globalmente com a expansão da navegação comercial, nos séculos XVII e XVIII. Embora esta expansão tenha sido significativamente reduzida pelos numerosos programas de erradicação nas Américas (entre 1930 e 1970), o vetor voltou a proliferar e se expandir logo que estas campanhas cessaram (WILLIAMS *et al.*, 2010). O aumento dramático da incidência da doença causada pelo vírus dengue nas Américas, durante as três décadas passadas, deve-se principalmente à expansão geográfica do *Aedes aegypti*, após o declínio das medidas de controle do vetor (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

A plasticidade do vetor favorece a sua adaptação à atividade humana. A produção de reservatórios propícios ao desenvolvimento das larvas (reservatórios artificiais: água estagnada contida em recipientes plásticos, pneus, vasos de plantas, latas, vidros, tonéis,

cisternas, bromélias, buracos em árvores e escavações em rocha e bambu) e a facilidade dos meios de transporte têm favorecido a dispersão e estabelecimento destes mosquitos. O aumento da densidade populacional e da urbanização, sem um planejamento adequado para o abastecimento de água e coleta de dejetos, também tem fornecido condições ideais para a criação deste vetor (MONATH, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2010). Estas espécies depositam seus ovos em recipientes contendo água parada, próximo às habitações humanas, entrando nas casas e fazendo múltiplos repastos sanguíneos durante cada ciclo gonotrófico, tanto para a produção de ovos como para sua nutrição. Estes comportamentos aumentam a competência do vetor e a transmissão a múltiplos hospedeiros humanos (WEAVER; VASILAKIS, 2009).

As fêmeas desse mosquito são as responsáveis pela transmissão e dispersão de vários sorotipos e um único mosquito, se infectado, pode transmitir o vírus para várias pessoas (GUBLER, 1998). A transmissão ocorre em dois ciclos: o intrínseco no homem, que começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o sexto dia da doença, correspondendo ao período de viremia, e o ciclo extrínseco nos mosquitos (fêmeas) que após picar pessoas virêmicas inicia a replicação do vírus no tubo digestivo, e após um período de incubação de 8 a 12 dias, estes são alojados nas glândulas salivares para reiniciar a transmissão (BRASIL, 1996). A manutenção do vírus na natureza também se dá através da transmissão vertical, assim como pela transmissão sexual (CORDEIRO *et al.*, 2008a).

A vida média do mosquito é de seis a oito semanas, e durante este período, ele permanece infectado com o vírus podendo transmitir o dengue para centenas de pessoas. No homem, o período de incubação da dengue é de três a quinze dias, tendo como média de cinco a seis dias (BRASIL, 1996).

1.3 Agente etiológico

O vírus dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* com quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a DENV-4). Assim como outros flavivírus, os virions medem cerca de 60 nm de diâmetro, com um nucleocapsídeo icosaédrico coberto por um envelope lipídico contendo as proteínas virais do envelope e da membrana. O genoma viral é composto de uma molécula de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 10.200 nucleotídios, flanqueados por duas regiões não codificantes (*noncoding regions-NCR*), 5'NCR e 3'NCR e que codificam uma única ORF (*open reading frame*)

(FIGUEIREDO, 1991). A tradução desta ORF vai dar origem a uma longa poliproteína que sofre sucessivas clivagens por proteases do hospedeiro e do próprio vírus. Essas clivagens vão resultar em 10 proteínas virais sendo três proteínas estruturais (capsídeo-C, membrana-M e envelope-E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (RANDOLPH; WINKLER; STOLLAR, 1990).

A proteína C é o primeiro polipeptídeo viral sintetizado durante a tradução, tem um peso molecular em torno de 13,5 kDa e é rica em resíduos de lisina e arginina. Uma área hidrofóbica de aminoácidos no terminal carboxílico da proteína C, provavelmente age como um sinal transmembrana para a proteína pré-membrana (prM), uma precursora da proteína de membrana (M). Uma clivagem proteolítica específica de uma precursora glicosilada de prM durante a maturação viral, resulta na formação da proteína M de 8 kDa (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Esta clivagem que parece ocorrer nas vesículas ácidas do complexo de Golgi precede a liberação viral da célula, visto que a quantidade de prM associada com a partícula viral extracelular é baixa. A formação de M a partir de prM deve ser o evento crucial e final da morfogênese viral (RANDOLPH; WINKLER; STOLLAR, 1990).

A glicoproteína E, a maior glicoproteína do envelope do vírus (51-60 kDa), aparece como um homotrímero na superfície das partículas maduras e pode ser achada intracelularmente em heterodímeros E-prM (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Representa o antígeno viral dominante, desempenhando importantes funções como ligação ao receptor, hemaglutinação de células sanguíneas, indução de resposta imune protetora pela produção de anticorpos, fusão específica de membrana e montagem viral. (GUZMÁN; KOURI, 2004; LEITMEYER *et al.*, 1999). A glicoproteína E contém a maioria dos determinantes envolvidos na adsorção e penetração nas células do hospedeiro, bem como os epítomos responsáveis pela sua neutralização (BIELEFELDT-OHMANN *et al.*, 1997; REY *et al.*, 1995), desempenhando um papel importante na geração de anticorpos neutralizantes e na indução de uma resposta imune protetora (DOS SANTOS *et al.*, 2004).

A estrutura cristalizada dos ectodomínios da glicoproteína E do vírus da encefalite do carrapato (*Tick-Borne Encephalitis Virus-TBEV*) e do DENV-2 foi determinada e observou-se que ambas as estruturas são similares, consistindo de um dímero no qual cada monômero possui três domínios tipo β -pregueada (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Os domínios I, II e III (Figura 1) foram previamente identificados na estrutura molecular da glicoproteína do TBEV. Devido às localizações dos resíduos de cisteína serem conservadas entre as glicoproteínas-E dos flavivírus, assume-se que toda a estrutura da proteína é igual entre os flavivírus, incluindo o dengue (ROEHRIG, 1997).

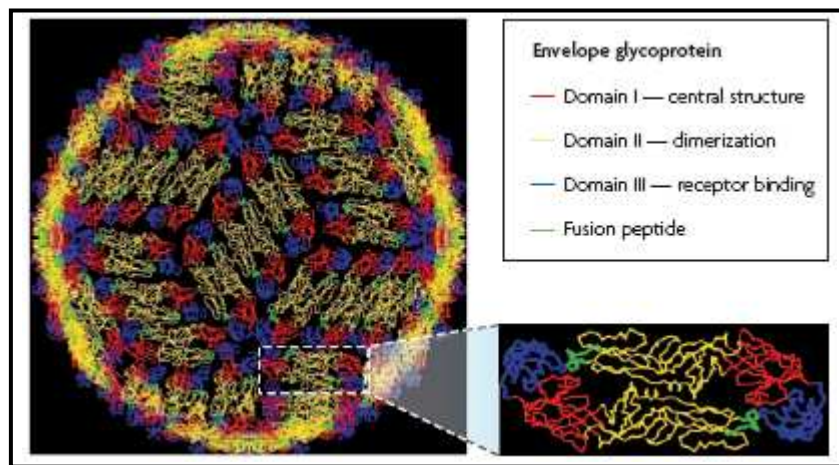


Figura 1- Estrutura da glicoproteína-E do vírus dengue. A proteína é apresentada em azul, verde e amarelo para mostrar seus três domínios específicos.

Fonte: Adaptado de Whitehead *et al.* (2007).

Os domínios I e III contêm predominantemente epítomos do subcomplexo e tipo específico e o domínio II apresenta epítomos de reação cruzada do subgrupo e reativos do grupo, presentes na maioria dos flavivírus (CRILL; CHANG, 2004). A maioria dos anticorpos neutralizantes já caracterizados reconhece epítomos no domínio III, os quais têm sido implicados na ligação com o receptor celular, acreditando-se então que o mecanismo de neutralização para anticorpos contra estes epítomos seja a inibição da ligação ao receptor celular e à adsorção viral. Enquanto anticorpos contra epítomos no domínio I não são neutralizantes, existem anticorpos neutralizantes que reconhecem epítomos conservados entre os sorotipos no domínio II (MODIS *et al.*, 2005). Estudos com vacina de DNA para o DENV-2 contendo genes da região pré-membrana e 92% da proteína do E induziram resposta de anticorpos neutralizantes em camundongos e os animais imunizados tinham alta taxa de sobrevivência quando infectados posteriormente (KOCHEL *et al.*, 1997; PORTER *et al.*, 1998; RAVIPRAKASH *et al.*, 2001).

O papel da proteína não estrutural NS1 (46 kDa) na replicação viral não é conhecido, mas sugere-se que ela auxilie na morfogênese do vírus. A proteína é glicosilada, encontrada na matriz intracelular, na superfície celular (na forma de dímeros) e extracelularmente (na forma de hexâmeros). A glicosilação é de fundamental importância para sua função, secreção e processamento (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A NS1 deve ter também

importância imunológica, uma vez que, células infectadas expressando a proteína na superfície ou em sua forma secretada no meio extracelular se tornam alvo de citólise imune. A forma solúvel da NS1 foi caracterizada como um antígeno de fixação do complemento e sua imunização é capaz de gerar proteção (COSTA; FREIRE; ALVES, 2006). A proteína também tem sido implicada na patogenicidade da infecção e, mais recentemente, vem sendo utilizada como marcador precoce da infecção por dengue (ALCON *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2006).

A proteína NS2a, com aproximadamente 22 kDa é uma pequena proteína associada à membrana. É requerida para o processamento proteolítico próprio do C-terminal de NS1 e NS2b, porém, sua função na replicação viral não é conhecida (MATHEW *et al.*, 1996; MATHEW *et al.*, 1998). Parece coordenar a transição entre a replicação do RNA viral e o seu empacotamento na partícula (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Um estudo mostrou que uma mutação nesta proteína bloqueou a secreção de partículas virais, indicando o envolvimento dela na formação da partícula viral (LEUNG *et al.*, 2008). Ela também participa nos mecanismos de evasão da resposta imune, atuando como antagonista da via de sinalização do interferon (IFN) tipo I pelo DENV (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2005) e inibindo a via de indução do IFN no vírus Oeste do Nilo (LIU *et al.*, 2006).

Assim como a proteína NS2a, a proteína NS2b é hidrofóbica e está associada à membrana. Atua como cofator para a proteína NS3, sendo fundamental para a atividade proteolítica do complexo NS3-NS2b, a protease viral (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

Com aproximadamente 70 kDa, a proteína NS3 é uma grande proteína citoplasmática que se associa à membrana via interação com a NS2b. Contém várias atividades enzimáticas, como RNA helicase, nucleosídeo 5'-trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase (RTPase), o que resulta no processamento da poliproteína e na replicação do RNA, sendo uma das mais conservadas proteínas entre os flavivírus (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Estudos identificaram vários epítomos de reatividade cruzada reconhecidos por células T citotóxicas, contidos na NS3 (MATHEW *et al.*, 1996; SIMMONS *et al.*, 2005; ZIVNY *et al.*, 1999). Mais recentemente, foi mostrado que a NS3 desempenha um papel fundamental na formação da partícula viral, independente das suas funções enzimáticas conhecidas (PATKAR; KUHN, 2008). Por ser conservada entre os flavivírus e desempenhar um importante papel em diversas etapas do ciclo replicativo, a inibição da proteína NS3 tem sido considerada uma valiosa estratégia de intervenção para o tratamento das infecções causadas por flavivírus (LESCAR *et al.*, 2008).

As proteínas NS4a (16 kDa) e NS4b (27 kDa) são pequenas proteínas hidrofóbicas associadas à membrana e parecem ter função na replicação do RNA (LINDENBACH;

THIEL; RICE, 2007). Ambas as proteínas estão envolvidas na replicação do genoma viral, estando a NS4a presente nos sítios de replicação do genoma viral, interagindo com a NS1 (MILLER *et al.*, 2007). Anticorpos anti-NS4a têm sido identificados em pacientes infectados com dengue, sobretudo em infecções secundárias (SE-THOE; NG; LING, 1999). A proteína NS4b (junto com a NS4a) é parte do complexo de replicação, interagindo com a proteína NS3 e com o RNA viral de fita dupla, um intermediário da replicação do genoma viral (UMAREEDY *et al.*, 2006).

A proteína NS5 (105 kDa) é a maior e mais conservada proteína dos flavivírus, contendo homologia entre as enzimas “RNA-polimerase dependente de RNA” de outros vírus (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). É uma proteína multifuncional, fosforilada, envolvida na replicação viral. Apresenta dois domínios funcionais: o domínio 5'-metiltransferase (MTase), localizado na região N-terminal da proteína e o domínio RdRP (*RNA-dependent RNA polimerase*), presente na região C-terminal, o qual atua como polimerase viral, responsável pela síntese dos RNAs virais (BHATTACHARYA, *et al.*, 2009; ISSUR *et al.*, 2009). Por apresentar um sítio de ligação para o trifosfato de guanosina (GTP), o domínio MTase participa da formação do cap tipo I nos RNAs virais, a qual é dependente de elementos específicos na região 5'-UTR (RAY *et al.*, 2006). Forma o complexo replicativo com a proteína NS3, estimulando as atividades NTPase (*nucleotide triphosphatase*) e RTPase (*RNA triphosphatase*) da mesma (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). Além de sua função na replicação, a NS5 também tem sido implicada em mecanismos de evasão da resposta imune, atuando como antagonista da via de sinalização do IFN tipo I em diversos flavivírus (LAURENT-ROLLE *et al.*, 2010), sendo também um dos principais alvos no desenvolvimento de compostos antivirais (DONG; ZHANG; SHI, 2008).

1.4 Aspectos clínicos

A doença é um processo infeccioso que pode cursar de forma assintomática, oligossintomática, podendo evoluir para formas graves e fatais. As manifestações clínicas incluem a dengue clássica (DC) e a febre hemorrágica do dengue (FHD), que pode evoluir para a síndrome do choque do dengue (SCD). Cerca de 100 milhões de casos de dengue são registrados a cada ano, com uma estimativa de 500.000 casos relacionados às formas graves da doença: FHD ou SCD (WEBSTER; FARRAR; ROWLAND-JONES, 2009).

Fatores de risco individuais determinam a severidade da doença e incluem infecção secundária, etnia e possíveis doenças crônicas (asma brônquica, anemia falciforme e diabetes mellitus). As crianças parecem ser menos capazes de se recuperar do extravasamento de plasma que os adultos, e conseqüentemente, apresentam maior risco de desenvolver um quadro de choque (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

A dengue clássica apresenta-se em geral de forma benigna e autolimitada. No entanto, o período de recuperação que varia de 7 a 10 dias, está associado a uma grande debilidade física que pode se estender por várias semanas (GUY; ALMOND, 2008). As manifestações clínicas incluem dor retro-orbitária, cefaléia, artralgia, mialgia, prostração, astenia, náuseas, vômitos, dor abdominal, distúrbios no paladar (sabor metálico nos alimentos) e mudanças no estado psicológico. Exantema ou prurido podem ou não ocorrer, assim como depressão pós-doença (CORDEIRO *et al.*, 2008a). Manifestações clínicas atípicas também têm sido relatadas, com destaque para a ocorrência de encefalite, hepatite e insuficiência renal (WEBSTER; FARRAR; ROWLAND-JONES, 2009). Manifestações hemorrágicas do tipo epistaxe, petéquias, gengivorragias, metrorragias e *rash* também podem ser observadas. Em casos mais raros, podem aparecer sangramentos maiores como hematêmese, melena ou hematúria (BRASIL, 1996).

Na febre hemorrágica do dengue, os sintomas clínicos são indistintos da dengue clássica, porém evoluem rapidamente para as manifestações hemorrágicas de gravidade variável. Os casos severos são caracterizados por febre alta, trombocitopenia, manifestações hemorrágicas e aumento da permeabilidade vascular, com extravasamento de plasma. As manifestações hemorrágicas incluem fragilidade capilar, petéquias, equimoses, sangramento de mucosas, do trato gastrointestinal e hematêmese ou melena (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Nos casos benignos ou moderados, após o desaparecimento da febre, todos os sinais e sintomas diminuem. Em casos graves, após o desaparecimento da febre entre o 3^o e 7^o dia, o estado do paciente complica-se repentinamente, com o surgimento dos sinais de insuficiência circulatória, levando à SCD. O quadro é caracterizado por queda da temperatura corporal, pulso rápido, cianose perioral, hipotensão, pele pegajosa e inquietação. Os casos de febre hemorrágica com choque quando erroneamente ou não tratados, podem levar a uma taxa de letalidade de até 50% (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1996).

O período de incubação do vírus no homem pode variar de 3 a 15 dias, sendo geralmente de 5 a 7 dias. Todos os quatro sorotipos do vírus dengue podem causar doença, desde a dengue clássica até as formas mais graves e todas elas conferem ao indivíduo imunidade permanente ao sorotipo responsável pela infecção. No entanto, a infecção não confere a

imunidade cruzada, de modo que pessoas que vivem em áreas endêmicas, onde circulam todos os sorotipos, poderão ter as quatro infecções durante sua vida (CORDEIRO *et al.*, 2008).

1.5 Patogenia

Desde a década de 70, duas teorias tentam explicar a ocorrência de FHD. A primeira, conhecida como “Teoria da infecção seqüencial heterotípica”, propõe que quando um indivíduo é acometido por duas ou mais infecções sucessivas por sorotipos virais diferentes, ocorre uma maior sensibilização do organismo, formando imunocomplexos que complicam o quadro clínico (HALSTEAD, 1970). Sabe-se que anticorpos não-neutralizantes pré-existentes formam complexos com o vírus dengue infectante e se ligam aos receptores Fc nas células dendríticas e macrófagos, aumentando assim a entrada viral nestas células e conseqüentemente, a replicação do vírus. Isto leva a um aumento da viremia e da severidade da doença, devido à alta produção de citocinas e quimiocinas vasoativas que possuem um papel na disfunção vascular associada com a dengue severa (WEBSTER; FARRAR; ROWLAND-JONES, 2009).

A segunda teoria, chamada de “Teoria da modificação da virulência”, sugere que mutações ocorrem nas diferentes linhagens dos quatro sorotipos de dengue, podendo levar a quadros clínicos graves da doença (ROSEN, 1977). O vírus dengue deve sofrer mudanças devido a pressões de seleção e de evolução, visto que eles passam pela replicação em espécies cruzadas, alternando entre humanos e mosquitos (KAO *et al.*, 2005).

Em 1987, autores cubanos propuseram uma terceira teoria, a “Teoria da multicausalidade”, que une as teorias de Halstead e de Rosen a vários fatores de risco como fatores individuais, virais e epidemiológicos (BRAVO; GUZMAN; KOURI, 1987). Os mecanismos que levam às formas graves da doença ainda não foram completamente elucidados. As alterações observadas na permeabilidade vascular e na coagulação parecem ser resultado de um conjunto de fatores que incluem o aumento da replicação celular, aumento da morte celular por infecção, presença de anticorpos ou células citotóxicas, exacerbada liberação de mediadores inflamatórios por células infectadas e por células imunes, além da ativação do complemento (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Deste modo, a vacina para o vírus dengue apresenta uma dificuldade adicional pela necessidade de ser tetravalente, ou seja, de ser capaz de proteger contra os quatro sorotipos do vírus simultaneamente, sem aumentar o risco de ocorrência da FHD (WHITEHEAD *et al.*,

2007). Por isto, o desenvolvimento de uma formulação tetravalente que retenha a imunogenicidade dos quatro sorotipos tem se tornado muito difícil, necessitando o desenvolvimento de vacinas de nova geração, que estimulem o mesmo espectro das respostas imune inata e específica, como as vacinas de vírus vivos atenuados, mas que apresente a segurança característica das vacinas de vírus inativados (KOFLER *et al.*, 2004).

1.6 Vacinas para dengue em desenvolvimento

O desenvolvimento e a introdução de vacinas para dengue são particularmente importantes. Não existem antivirais disponíveis para o tratamento da infecção e o cuidado clínico dos pacientes é prejudicado pela falta de um diagnóstico apropriado em tempo oportuno, e pela falta de conhecimento entre grande parte dos médicos a respeito das melhores práticas para o manejo dos casos. Além disto, as campanhas de controle do vetor não se mostraram efetivas ou sustentáveis. Assim, uma vacina para dengue é essencial para o controle da doença e as pesquisas envolvendo sua produção têm crescido no mundo inteiro (MAHONEY, 2010).

Uma vacina ideal para o dengue deve ser livre de reatogenicidade significativa, induzir um nível de proteção semelhante ao produzido no curso de uma infecção natural com qualquer um dos quatro sorotipos e promover proteção duradoura. Visto que as muitas regiões que apresentam endemia de dengue são países em desenvolvimento com recursos limitados, a vacina precisa ter baixo custo e de preferência, dose única (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Atualmente, algumas vacinas candidatas estão em andamento (Figura 2) e várias estratégias têm sido utilizadas para a sua produção, incluindo: 1. Vacinas com vírus vivos atenuados (*Sanofi Pasteur/GlaxoSmithKline*), 2. Vacinas vivas atenuadas quiméricas (*National Institute of Health-NIH, Sanofi Pasteur e Centers for Disease Control and Prevention-CDC*), 3. Vacinas de vírus inativado (*Walter Reed Army Institute of Research-WRAIR, USA*) e 4. Vacinas com subunidades da proteína E (*Hawaii Biotech*) (FRANCIS; DOUGLAS; MAHONEY, 2010).

Developer	Manufacturer Sponsor	Approach	Formulation	Trial Status
Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)	GlaxoSmithKline	Cell culture passage of clinical isolates	Tetravalent	Phase 2, adults and children
Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)	GlaxoSmithKline and Oswaldo Cruz Institute	Purified inactivated vaccine	Tetravalent	Preclinical
Acambis (now owned by sanofi pasteur)	sanofi pasteur	Chimeric infectious clones. Yellow fever vaccine virus (nonstructural) + dengue envelope & preM genes	Tetravalent	Phase 3, children
U.S. National Institutes of Health (NIH)	Panacea Biotech Biological E Butantan Vabiotech	Chimeric infectious clones. Dengue-4 D-30 virus (non-structural) + dengue envelope & preM genes. Attenuated D30 dengue-4 virus	Tetravalent	Phase 1, adults
U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)	Inviragen	Chimeric infectious clones. Dengue-2 virus (nonstructural) + dengue envelope & preM genes	Tetravalent	Phase 1
Hawaii Biotech	Merck Vaccine	Recombinant envelope subunit	Monovalent	Phase 1

Figura 2- Vacinas para dengue em desenvolvimento.

Fonte: Adaptado de Francis; Douglas; Mahoney (2010).

Embora as tradicionais vacinas de vírus atenuados apresentem a vantagem de induzir resposta imune celular e humoral para proteínas estruturais e não-estruturais do vírus, mimetizando a infecção natural, a base da atenuação é desconhecida e pode haver reversão na virulência, além da possibilidade dos vírus vacinais serem disseminados pelo mosquito vetor (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Dentro desta abordagem, grupos da Tailândia (Universidade Mahidol) e dos Estados Unidos da América (*Walter Reed Army Institute of Research-WRAIR*) têm utilizado métodos convencionais para o desenvolvimento de candidatas à vacina tetravalente, através da técnica de atenuação por passagem em cultura celular. Porém, a vacina candidata do grupo Tailandês cuja patente hoje se encontra com a *Sanofi Pasteur*, não atingiu resposta imune balanceada para cada um dos quatro componentes e os indivíduos que a receberam, apresentaram sintomas sistêmicos (KITCHENER *et al.*, 2006). Para o grupo americano, com patente da *GlaxoSmithKline*, a formulação vacinal tetravalente encontra-se nos ensaios de triagem de fase II na América e na Ásia, em adultos e crianças, mas as bases da atenuação continuam desconhecidas (EDELMAN *et al.*, 2003; FRANCIS; DOUGLAS; MAHONEY, 2010).

Uma estratégia diferente para a atenuação foi utilizada pelo NIH dos Estados Unidos, onde técnicas de genética reversa foram empregadas para introduzir mutações definidas que levam à atenuação dentro da região 3'UTR (*Untranslated Region*) do genoma viral do DENV-4 (vacina quimérica atenuada). O cDNA deste clone infeccioso quimérico foi então utilizado para clonar as proteínas de pré-membrana e envelope dos demais sorotipos virais (DENV-1 -3), no lugar das proteínas de pré-membrana e envelope do DENV-4 atenuado. A formulação tetravalente pareceu ser atenuada, altamente imunogênica e protetora em macacos *Rhesus* (BLANEY *et al.*, 2006). No entanto, os testes de triagem de fase I foram iniciados em adultos, apenas para as formulações com DENV-2 e DENV-4, com produção sob a responsabilidade da *Panacea Biotech, Biological E*, Instituto Butantan e *Vabiotech* (BLANEY *et al.*, 2006; FRANCIS; DOUGLAS; MAHONEY, 2010).

A plataforma da ChimeriVax (*Acambis-Sanofi Pasteur*) tem sido utilizada para a criação de uma vacina quimérica atenuada pela substituição dos genes das proteínas prM e E de cada um dos quatro sorotipos virais, pelos respectivos genes do vírus vacinal da febre amarela cepa 17D. A atenuação neste caso, acredita-se ser devido a quimerização em si e a algumas mutações já intrínsecas ao *background* genético de cepa vacinal 17D. A administração da formulação tetravalente em macacos induziu a produção de altos níveis de anticorpos neutralizantes (GUIRAKHOO *et al.*, 2006). A vacina tetravalente encontra-se hoje nos ensaios de triagem de fase III de testes em crianças, sendo a abordagem mais promissora até o momento (FRANCIS; DOUGLAS; MAHONEY, 2010).

Outra abordagem para desenvolver uma vacina quimérica atenuada foi utilizada pelo Centro para Controle de Doenças e Prevenção dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention-CDC*), utilizando o clone infeccioso do DENV-2 como vetor para as proteínas de pré-membrana e envelope dos demais sorotipos virais do dengue. A abordagem tetravalente, com patente da Inviragen, encontra-se nos ensaios de triagem de fase I (FRANCIS; DOUGLAS; MAHONEY, 2010).

As vacinas de vírus inativados apresentam segurança contra reversão ao vírus selvagem e resposta humoral balanceada, no entanto, não replicam em altos títulos, requerem adjuvantes, dose-reforço, necessitam de alta concentração viral e apresentam custo elevado (CHAMBERS *et al.*, 1999). A vacina desenvolvida pelo *Walter Reed Army Institute of Research-WRAIR*, utilizando esta abordagem, apresentou altos títulos de anticorpos neutralizantes e proteção em modelos primatas para a formulação com DENV-2 (PUTNAK *et al.*, 2005). A produção da formulação tetravalente encontra-se hoje sob a responsabilidade da

GlaxoSmithKline junto com o Instituto Oswaldo Cruz-RJ, cujos ensaios ainda estão na fase pré-clínica (FRANCIS; DOUGLAS; MAHONEY, 2010).

Antígenos do dengue, primariamente a proteína do envelope, têm sido produzidos em muitos sistemas de expressão para gerar vacinas de subunidades candidatas. Em sua maioria, as preparações elicitam de moderados a altos níveis de anticorpos em camundongos. As vacinas de subunidades para dengue não foram testadas em humanos, no entanto, dois estudos em macacos *Rhesus* utilizando proteínas E truncadas de DENV-2 e DENV-4, mostraram proteção parcial após desafio com as respectivas cepas selvagens. A vacina de subunidades contendo a proteína E purificada para cada um dos quatro sorotipos, produzida pela *Hawaii Biotech* (patente da *Merck Vaccine*), está nos ensaios de triagem de fase I (FRANCIS; DOUGLAS; MAHONEY, 2010; WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Os antígenos do vírus dengue podem também ser introduzidos dentro de células e subseqüentemente traduzidos em antígenos virais ou partículas subvirais, constituindo as vacinas de DNA. Embora apresentem vantagens em relação às vacinas convencionais, incluindo uma fácil produção, estabilidade, reduzida interferência de replicação e a possibilidade de vacinar contra múltiplos patógenos numa única formulação, experiências recentes com este tipo de abordagem chamaram atenção para a necessidade de múltiplas doses, o uso de adjuvantes e equipamentos de injeção especializados. Abordagens utilizando uma combinação de vetores vivos ou vetores de DNA, expressando a proteína do envelope, mostraram-se complicadas para formulações tetravalentes (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Devido às dificuldades que têm sido encontradas nas formulações vacinais até hoje testadas, a produção de uma vacina segura contra o vírus dengue requer a utilização de novas e modernas tecnologias. Isto inclui a identificação de determinantes antigênicos (epítomos) na superfície do vírus e o uso do domínio III da glicoproteína do envelope dos sorotipos DENV-1 a 4, que podem ser incorporados dentro de uma vacina quimérica para induzir a produção de anticorpos neutralizantes (KHANAM; KHANNA; SWAMINATHAN, 2006; SERAFIN; AASKOV, 2001). Além disso, é necessário o uso de novos vetores vacinais como os replicons e moléculas sinalizadoras que aumentam e direcionam a apresentação destes antígenos para o sistema imune.

1.7 Novas tecnologias para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue

1.7.1 Mapeamento de epítomos

Atualmente, as pesquisas estão sendo direcionadas para o desenvolvimento de uma nova geração de vacina baseada na inclusão de epítomos imunogênicos em vetores recombinantes, direcionando a resposta imune contra epítomos protetores, no intuito de aumentar a eficácia de imunização (WELSH; FUJINAMI, 2007).

A resposta imune adaptativa possui duas armas principais: a resposta imune celular por linfócitos T e a resposta imune humoral por linfócitos B secretores de anticorpos. Em ambos os casos a resposta imune é estimulada através do reconhecimento pelo receptor de uma pequena parte do antígeno conhecida como epítopo ou determinante antigênico (KORBER; LABUTE; YUSIM, 2006). Os epítomos que elicitam respostas por linfócitos B e T (epítomos de células B e T) podem ser lineares, consistindo de uma seqüência contínua de aminoácidos (aa) ou podem ser conformacionais, quando apresentam uma seqüência descontínua com a proteína em sua forma conformacional (SAHA; BHASIN; RAGHAVA, 2005).

É possível mimetizar estes determinantes antigênicos, produzindo curtas cadeias de aminoácidos (peptídeos lineares) e usá-los como base para o desenvolvimento de vacinas (FRANCIS, 1996). Por isso, peptídeos sintéticos definidos através do mapeamento de epítomos têm sido empregados com sucesso como componentes de tratamentos preventivos e terapêuticos e para diagnosticar e tipificar espécies virais, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus-HIV*) e vírus da hepatite C (*Hepatitis C Virus-HCV*) (HEWER; MEYER, 2003; HUANG, *et al.*, 1996).

O conhecimento de epítomos de células B em proteínas virais é essencial para o conhecimento da patogênese e resposta imunológica da infecção e para o desenvolvimento de vacinas efetivas (LIU *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2001). Dentro desta perspectiva, diversas proteínas têm sido estudadas e possíveis epítomos de célula B identificados, não apenas para o dengue, mas para diversos vírus como: vírus da encefalite do vale Murray (*Murray Valley Encephalitis Virus-MVEV*), vírus da encefalite japonesa (*Japanese Encephalitis Virus-JEV*), Citomegalovírus Humano (*Human Cytomegalovirus-HCMV*), HIV e vírus da síndrome respiratória aguda grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome Virus-SARS*) (HEWER;

MEYER, 2003; HUANG *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006; MATHEWS *et al.*, 1992; TAKAHASHI *et al.*, 2002).

Uma das estratégias para se evitar a patogenia associada com a vacina para o dengue, seria a construção de uma vacina de DNA quimérica, composta de epítomos selecionados dos quatro sorotipos. A maioria desses epítomos parece estar presente na glicoproteína E, por ser esta a maior proteína de superfície presente no vírus e estar relacionada às funções de ligação com receptores celulares e interação com a membrana da célula hospedeira para fusão e subsequente entrada na célula (SERAFIN; AASKOV, 2001). Embora a proteína E seja imunodominante, a presença de anticorpos contra as proteínas não-estruturais também foi demonstrada. Um estudo mostrou que anticorpos anti-NS1 e anti-NS3 são detectados principalmente nos casos de infecção secundária (VALDES *et al.*, 2000). A vacinação com proteínas não-estruturais como a proteína NS1 do vírus da febre amarela pode ser protetora em modelos animais e a resposta de células T contra vírus, em humanos, é direcionada às proteínas não-estruturais (AMANNA; SLIFKA, 2009).

Desta maneira, determinantes antigênicos nas proteínas estruturais e não estruturais do dengue têm sido extensivamente mapeados. Usando um painel de peptídeos sintéticos derivados da seqüência de aminoácidos da glicoproteína E do DENV-2, cepa da Jamaica (JAM), Roehrig *et al.*, 1990, determinaram previamente que 11 peptídeos definiam regiões antigênicas nas posições 1-55, 79-172, 225-249 e 333-388 (ROEHRIG *et al.*, 1990). Sete epítomos também já foram mapeados na glicoproteína E do DENV-2, cepa New Guinea C-NGC (HENCHAL *apud* ROEHRIG; BOLIN; KELLY, 1998). Em 1999, Huang *et al.*, identificaram o peptídeo derivado da proteína NS1 de DENV-2 (aa 1-15) como o epítomo imunodominante, tendo a imunoglobulina IgM como o anticorpo isotipo-específico (HUANG *et al.*, 1999). Neste mesmo ano foram mapeados epítomos na glicoproteína-E (aa 274-283 e aa 349-359) e na proteína de membrana-M (aa 40-49) do DENV-2, utilizando anticorpos monoclonais e peptídeos sintéticos (FALCONAR, 1999).

Já em 2001, através do método de *phage-display* foi proposto um possível epítomo de célula B sorotipo-específico contendo os aminoácidos de 111-116 da proteína NS1 de DENV-1 (WU *et al.*, 2001). Com a mesma metodologia, Thullier e colaboradores publicaram o resultado de um possível epítomo na glicoproteína E capaz de elicitar resposta por anticorpos neutralizantes, utilizando o anticorpo monoclonal 4E11 o qual neutralizou os quatro sorotipos do vírus dengue pela ligação aos resíduos 296-400 (THULLIER *et al.*, 2001). Também foi divulgada a presença de epítomos não especificados na proteína E do DENV-1 e do DENV-3, reconhecidos por anticorpos monoclonais IgM específicos para estes sorotipos (BEASLEY;

AASKOV, 2001; SERAFIN; AASKOV, 2001). Cinco peptídeos foram mapeados em três regiões distintas da proteína prM do DENV-2 (VÁZQUEZ *et al.*, 2002).

O mapeamento da proteína não-estrutural NS1 para o DENV-2, a partir do uso de peptídios sintéticos justapostos, sugeriu que a sequência SHRLHNTMPSES seria um provável epítipo de célula B (WU *et al.*, 2003). Em 2004, Crill e Chang identificaram na glicoproteína-E do DENV-2 três epítipos distintos de reação cruzada, dois destes epítipos contendo resíduos contínuos localizados dentro do peptídeo de fusão que é altamente conservado entre os flavivírus e um terceiro contendo resíduos descontínuos (CRILL; CHANG, 2004). Epítipos lineares imunodominantes foram mapeados no capsídeo (na região C-terminal) e na proteína NS4a (na região amino-terminal) do DENV-2, utilizando peptídeos sintéticos tipo *multi-pin* (ANANDARAO; SWAMINATHAN; KHANNA, 2005).

Dentro desta perspectiva, foram identificados dentro do meu projeto de mestrado, onze peptídeos lineares IgG específicos distribuídos em 5 regiões ao longo da glicoproteína E do envelope do DENV-3, com aminoácidos na posições 51-65 (peptídeo 11), 71-90 (peptídeos 15 e 16), 131-170 (peptídeos 27, 28, 29, 30, 31 e 32), 196-210 (peptídeo 40) e 246-260 (peptídeo 50). As predições de hidropaticidade (hidrofilicidade e hidrofobicidade) realizada para cada um destes peptídeos mostraram que os onze estão presentes em regiões hidrofílicas da glicoproteína. Já as predições de acessibilidade e antigenicidade realizadas, mostraram que os peptídeos 27 e 30 são os mais expostos na superfície da molécula e os peptídeos 11, 15, 27 e 30 os mais antigênicos. Testes de imunogenicidade realizados pelo nosso grupo em camundongos Balb-C, apresentaram para nove dos onze peptídeos, resposta humoral significativa 30 dias após o desafio com os peptídeos mapeados (SILVA *et al.*, 2009).

Adicionalmente, também se faz necessário o mapeamento dos epítipos virais que são reconhecidos pelos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, no intuito de se desenhar uma vacina recombinante contendo os epítipos mais imunogênicos para uma resposta imune eficaz, acompanhada da geração satisfatória de células de memória. A identificação de epítipos de célula T requer um suporte arrojado de bioinformática para uma triagem inicial de epítipos relevantes, antes da validação experimental no laboratório. Com isto, o mapeamento de epítipos reativos para a proteína estrutural do envelope e não-estruturais NS1 e NS3 do vírus dengue sorotipo 3, foi realizado em nosso laboratório através da técnica de ELISPOT para IFN- γ , utilizando-se células mononucleares do sangue periférico – PBMCs – de pacientes infectados com DENV-3 frente a peptídeos sintéticos que englobam todo o genoma. Nesta

abordagem, foram identificados vinte e dois epítomos em NS1, vinte e um em NS3 e onze na glicoproteína estrutural do envelope (em fase de elaboração)¹.

1.7.2. Domínio III da glicoproteína do envelope

Além de epítomos definidos de célula B e T, outra subunidade potencial que vem sendo utilizada em construções vacinais, constitui o domínio III (DIII) da glicoproteína do envelope, o qual está localizado em sua região C-terminal. O mesmo abrange os resíduos 300 a 400 da proteína, se apresenta altamente estável e está exposto e acessível na superfície do vírion, está envolvido na ligação a receptores do hospedeiro e contém epítomos do tipo e subtipo específicos que elicitam anticorpos neutralizantes (KHANAM *et al.*, 2006).

Embora o domínio III represente apenas uma fração da proteína do envelope viral, a remoção de outros epítomos que elicitam anticorpos não-neutralizantes e de reação cruzada, presentes nos domínios I e II, reduzem o risco da evolução para os quadros graves de FHD e SCD. Já foi demonstrado que o DIII do envelope possui baixo potencial de induzir anticorpos de reação cruzada a sorotipos heterólogos do dengue (SIMMONS *et al.*, 1998). Além disto, o menor tamanho do DNA (~0,1 Kb) requerido para codificar o DIII em relação à proteína do envelope inteira, permite o desenvolvimento de uma vacina tetravalente (~0,4 Kb) dentro de uma única formulação, ou seja, a clonagem do DIII dos quatro sorotipos virais em uma única vacina (KHANAM; KHANNA; SWAMINATHAN, 2006).

Quando o domínio III de cada um dos quatro sorotipos é misturado, a vacina tetravalente resultante pode induzir anticorpos neutralizantes contra todos os quatro sorotipos em camundongos (SIMMONS *et al.*, 2001). Deste modo é possível evitar a interferência que pode ocorrer entre antígenos, pela mistura dos quatro componentes monovalentes, no caso das formulações de vírus atenuados. Embora os ensaios pré-clínicos utilizando vacinas de vírus atenuados sejam promissores, a interferência e competição replicativa entre sorotipos resulta numa resposta imune não uniforme (SABCHAREON *et al.*, 2002).

O DIII recombinante do vírus dengue se mostrou imunogênico e protetor em camundongos desafiados (MOTA *et al.*, 2005). Dados mostraram que uma construção vacinal

¹ O mapeamento de epítomos de células T foi realizado como parte de um projeto desenvolvido no Departamento de Virologia e Terapia Experimental-CPqAM, pela estudante Liciane Alencar e pela Dra. Joelma Souza, cujos dados ainda não foram publicados.

utilizando o adenovírus como vetor, com substituição da proteína do envelope do DENV-2 pelo DIII do mesmo sorotipo, elicitou resposta significativa por anticorpos neutralizantes e resposta imune celular do tipo Th1 (KHANAM; KHANNA; SWAMINATHAN, 2006; KHANAM *et al.*, 2007). A criação de um gene bivalente contendo o DIII do DENV-2 e DENV-4, expresso em *Escherichia coli*, elicitou a produção de anticorpos que foram capazes de bloquear a ligação dos vírus dengue sorotipos 2 e 4 às células de hospedeiro e neutralizar sua infectividade (KHANAM *et al.*, 2006).

O uso de anticorpos monoclonais para o mapeamento de epítomos do DENV-2 identificou sítios antigênicos similares presentes no DIII, conservados entre as diferentes cepas deste sorotipo, que podem ser utilizados no desenvolvimento de uma vacina racional contra o DENV-2 (GROMOWSKI; BARRETT, 2007). Várias vacinas baseadas no DIII têm sido demonstradas como imunogênicas e efetivas sob certas condições para outros vírus como vírus Oeste do Nilo e vírus da encefalite japonesa (MARTINA *et al.*, 2008). O soro de animais imunizados com a construção tetravalente do domínio III confirmou a presença de altos títulos de anticorpos contra DENV-1, 2 e 4 e níveis moderados contra o DENV-3, após desafio (CHEN, *et al.*, 2007). O DIII da proteína do envelope do DENV-2 foi expresso com sucesso em *E. coli* e a proteína recombinante foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes e proteger camundongos após desafio letal (ZHANG *et al.*, 2007).

O domínio III do DENV-4 em combinação com adjuvantes foi capaz de gerar resposta imune celular e humoral, por anticorpos neutralizantes, em camundongos (BADU *et al.*, 2008). A avaliação, em primatas não-humanos, de uma proteína recombinante contendo o DIII do DENV-1 emulsificado no adjuvante *Freund*, mostrou-se altamente imunogênica em macacos do tipo *Macaca fascicularis* e *Macaca mulatta*, esse último mais conhecido como macaco *Rhesus* (BERNARDO *et al.*, 2008). O DIII dos quatro sorotipos do DENV, clonados e expressos como uma ORF única em um vetor de expressão para células eucarióticas, elicitou níveis significantes de anticorpos anti-DIII em camundongos, capazes de neutralizar os quatro sorotipos do vírus e prevenir a morte celular induzida pela infecção do dengue (RAMANATHAN *et al.*, 2009). Um trabalho recente mostrou que uma vacina de subunidades, construída a partir da seqüência consenso para o DIII dos quatro sorotipos virais, foi capaz de elicitar resposta imune humoral com anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos do dengue, em camundongos Balb/c imunizados (LENG *et al.*, 2009). Um vetor de adenovírus tipo 5 (AdV5) codificando como antígeno tetravalente o DIII do envelope do DENV-1 a 4, elicitou resposta imune contra os quatro sorotipos do vírus em camundongos, na presença de imunidade prévia contra AdV5 (KHANAM *et al.*, 2009).

1.7.3 Moléculas sinalizadoras: *Lysosome-Associated Membrane Protein-LAMP*

A ineficiência de algumas estratégias de vacinação, baseadas em vacinas de DNA, provavelmente está relacionada ao mecanismo de apresentação destes antígenos ao sistema imune dos hospedeiros. Isto se deve ao fato de que a maioria dos antígenos produzidos endogenamente, característicos das vacinas de DNA, são seqüestrados e apresentados ao sistema imune do hospedeiro por moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHC I). A via MHC I de processamento e apresentação antigênica está mais associada à resposta celular citotóxica, não estimulando uma resposta humoral suficiente para a geração de altos títulos de anticorpos neutralizantes, que são essenciais para uma resposta eficiente contra infecções virais. Para uma resposta imune satisfatória, com alta produção de anticorpos neutralizantes, é crítico que os antígenos sejam apresentados a células do tipo T CD4+ por moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II-MHC II (JANEWAY *et al.*, 2002).

A ativação de células T CD4+ via MHC II, é vital para a função das vacinas de DNA, como já foi demonstrado em estudos de deleção do MHC II ou de células T CD4+ em camundongos (MAECKER *et al.*, 1998). A resposta mediada por MHC II inclui a ativação de células T CD8+, as quais requerem células T CD4+ para a expansão secundária e desenvolvimento de memória (JANSEN *et al.*, 2003). Para que estes antígenos sejam dirigidos a moléculas de classe II, ao invés de classe I, é necessário que estas proteínas sejam fusionadas a peptídeos sinais que as direcionem para o compartimento lisossomal da célula, visando sua degradação e apresentação via MHC II (JANEWAY *et al.*, 2002).

A possibilidade de direcionamento de antígenos, produzidos endogenamente, para o processamento via MHC II foi firmemente reforçada após o descobrimento de uma proteína trans-membrana do tipo I denominada de *Lysosome-Associated Membrane Protein-LAMP*. LAMP é uma proteína que se liga à membrana externa do lisossomo através de sua seqüência carboxi-terminal YXXØ, presente numa cauda citoplasmática de 11 aminoácidos (GUARNIERI *et al.*, 1993; OBERMULLER *et al.*, 2002; ROHRER *et al.*, 1996). O tráfego intracelular de LAMP inclui compartimentos multilaminares especializados de células apresentadoras de antígenos imaturas, chamados MIIC e CIIV, onde ocorre o processamento e formação dos complexos peptídeos antigênicos-MHC II (DRAKE *et al.*, 1999; KLEIJMEER *et al.*, 1997; TURLEY *et al.*, 2000).

Desta forma, a constatação da co-localização das moléculas LAMP e MHC II vem servindo como suporte para a utilização de genes heterólogos, contendo as seqüências alvos de LAMP, visando o direcionamento do processamento antigênico para o compartimento MHC II. Diferentes grupos descreveram previamente o desenvolvimento de vacinas de DNA baseadas na expressão das proteínas selvagens de membrana e envelope, de diferentes vírus, associadas à LAMP. Deste modo, as proteínas de membrana e envelope dos flavivírus, co-expressas como antígenos fusionados à LAMP, constituem uma abordagem promissora na prevenção da infecção pelos mesmos (DHALIA *et al.*, 2009). O direcionamento da proteína E dos flavivírus ao MIIC mostrou um aumento na produção de anticorpos neutralizantes em camundongos imunizados e em primatas não-humanos (ANWAR *et al.*, 2005).

Estudos em camundongos, macacos e estudos clínicos em humanos vêm demonstrando que os antígenos fusionados à LAMP (antígeno/LAMP) são capazes de gerar uma maior atividade proliferativa de linfócitos antígeno-específicos, altos títulos de anticorpos e intensa atividade T- citotóxica em relação aos antígenos selvagens não fusionados a esta proteína (ANWAR *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 1996; LU *et al.*, 2003; ROWELL *et al.*, 1995; RUFF *et al.*, 1997; SU *et al.*, 2002).

1.7.4 Vetores vacinais: replicons

O uso das tecnologias já citadas acoplado ao uso de vetores vacinais mais seguros pode constituir o futuro no desenvolvimento de vacinas. Deste modo, várias tecnologias podem ser utilizadas para a apresentação de genes heterólogos ao sistema imunológico, como o uso de vetores virais e de plasmídeos que codificam estes antígenos virais protetores (vacinas de DNA). No entanto, as vacinas de DNA têm se mostrado pouco imunogênicas e as vacinas baseadas em vetores virais sofrem diminuição de sua imunogenicidade devido à imunidade dirigida ao vetor (MASON; SHUSTOV, FROLOV, 2006).

Ambas as abordagens têm induzido respostas imunes protetoras menores do que aquelas resultantes da infecção viral ou de outras formas de imunização, como o uso de partículas virais atenuadas. As vacinas de DNA perdem imunogenicidade quando o volume utilizado para imunização é reduzido, sugerindo que o dano no tecido local e a conseqüente inflamação, são críticos para a eficácia da vacina (DIEBOLD *et al.*, 2009). Embora muitos sistemas de vetores recombinantes tenham sido utilizados para expressar antígenos do dengue,

as vacinas candidatas resultantes apresentaram respostas limitadas quando utilizados adenovírus e vírus vaccinia como vetores vacinais (MURPHY; CHANOCK, 2001).

A tecnologia para aperfeiçoar a imunogenicidade de vacinas de DNA está evoluindo e estudos recentes têm mostrado que a imunogenicidade destas vacinas pode ser aumentada usando vetores plasmidiais associados aos sistemas de replicon (MURPHY; CHANOCK, 2001).

A técnica de genética reversa, ou seja, a síntese de RNA *in vitro* a partir do cDNA do genoma viral clonado (clone infeccioso) tem contribuído bastante para o desenvolvimento de vírus atenuados assim como para a confecção de vetores vacinais (ZABEREZHNYI, 2004). A partir dos clones infecciosos também vem sendo desenvolvido sistemas de genética reversa denominados de replicons.

Os replicons são RNAs virais replicativos que possuem os elementos genéticos necessários para sua amplificação autônoma dentro da célula (genes que codificam para as proteínas não-estruturais), mas não apresentam os genes estruturais necessários para a produção da progênie viral (MASSÉ *et al.*, 2010). Assim, uma grande vantagem do uso de certos replicons é o isolamento da replicação de RNA do empacotamento e amadurecimento da partícula viral, permitindo um mapeamento mais preciso das proteínas, sítios, e seqüências de RNA diretamente envolvidas na replicação viral. Além disto, a amplificação do RNA do replicon no citoplasma das células faz deles excelentes vetores para a expressão de genes heterólogos em altos níveis, de maneira transiente e estável (KHROMYKH, 2000).

Vacinas baseadas em replicons, de vírus RNA de cadeia positiva, têm recentemente emergido como um potente vetor para o desenvolvimento de vacinas. Várias qualidades fazem esses vetores serem ideais para o desenvolvimento de vacinas eficientes e seguras, incluindo: a) altos níveis de expressão devido à habilidade do replicon se auto-replicar dentro da célula, b) replicação exclusiva no citoplasma, o que elimina qualquer possibilidade de integração no cromossomo da célula, c) a incapacidade do RNA do replicon sair da célula transfectada (ou infectada) e infectar outra célula, o que faz deste vetor um instrumento seguro para o desenvolvimento de vacinas, d) genoma pequeno (~9 kb), permitindo assim uma fácil manipulação do genoma e geração de recombinantes (HARVEY *et al.*, 2004)

A construção de replicons já foi demonstrada para diversos vírus com RNA de cadeia positiva como: poliovírus (KAPLAN; RACANIELLO, 1988), vírus Sindbis (XIONG *et al.*, 1989), rinovírus humano 14 (MCKNIGHT; LEMON, 1996), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (PUSHKO *et al.*, 1997), vírus da rubéola (TZENG *et al.*, 2001), vírus da hepatite C (BLIGHT; MACKEATING; RICE, 2002; LOHMANN *et al.*, 1999), vírus da

Febre do Oeste do Nilo (SHI; TILGNER; LO, 2002), vírus Kujin (HARVEY *et al.*, 2004; KHROMYKH; WESTAWAY, 1997), vírus da diarreia viral bovina (ANSARI *et al.*, 2004; BEHRENS *et al.*, 1998), vírus Semliki Forest (TANNIS *et al.*, 2005), vírus da encefalite do carrapato (YOSHII *et al.*, 2005), vírus da febre amarela (JONES; PATKAR; KUHN, 2005), DENV-2 (JONES *et al.*, 2005; PANG; ZHANG; DAYTON, 2001a; PANG; ZHANG; DAYTON, 2001b) e DENV-3 (MOSIMANN *et al.*, 2010)

Vacinas de replicon do gênero *Alfavírus* (os quais incluem os vírus Sindbis, Semliki Forest Vírus, encefalite Venezuela equina), demonstraram ser capazes de induzir potente resposta humoral e celular (linfócitos T CD8+) em camundongos, coelhos, cobaias e macacos, e tem sido utilizados para o desenvolvimento de vacinas contra o HIV (HARVEY *et al.*, 2003; MEGEDE *et al.*, 2006; NORDSTROM *et al.*, 2005), tuberculose (KIRMAN *et al.*, 2003), câncer (GOLDBERG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005), Marburg (HEVEY *et al.*, 1998), *Neisseria gonorrhoeae* (THOMAS *et al.*, 2006), sarampo (CAPOZZO *et al.*, 2006), ebola (OLINGER *et al.*, 2005), antrax (LEE; HADJIPANASYIS; WELKOS, 2003), peste suína clássica (MAURER *et al.*, 2005) e dengue (WHITE *et al.*, 2007).

Replicons de flavivírus como Kujin e encefalite do carrapato também tem demonstrado serem potentes ativadores da resposta celular em camundongos (ABERLE *et al.*, 2005; ANRAKU *et al.*, 2002), e tem sido utilizados para o desenvolvimento de vacinas contra o HIV (HARVEY *et al.*, 2003) e papiloma vírus (HERD *et al.*, 2004).

Deste modo, os replicons podem ser utilizados como ferramentas moleculares para a expressão de genes heterólogos (proteínas ou epítopos) que conferem imunidade, e como vetores para propósitos terapêuticos e profiláticos. A entrega dos RNAs dos replicons nas células hospedeiras pode ser feita de três maneiras: (a) transfecção com o RNA do replicon transcrito *in vitro*; (b) transfecção com o DNA plasmideal que codifica as seqüências do replicon sob o controle do promotor para a RNA polimerase do tipo II celular e (c) infecção com VLPs (*Virus-Like Particles*) geradas pelo empacotamento do RNA do replicon com proteínas estruturais do vírus fornecidas *in trans* (GEEHRKE *et al.*, 2003).

As VLPs são capazes de iniciar um ciclo único de infecção, constituindo uma maneira rápida e eficiente para levar o RNA do replicon para dentro das células hospedeiras, sendo importantes vetores para a expressão de genes (terapia gênica) e vacinas (KHROMYKH, 2000; YOSHII *et al.*, 2005). O empacotamento dos replicons em VLPs pode ser realizado utilizando linhagens celulares que fornecem *in trans*, as proteínas estruturais que foram deletadas destes replicons. O empacotamento do vírus *Kunjin* foi reportado através do fornecimento *in trans*, das proteínas estruturais do mesmo, pela expressão transiente de um

replicon de alfavírus (KHROMYKH; VARNAVSKI; WESTAWAY, 1998). Células expressando altos níveis das proteínas estruturais do vírus Oeste do Nilo (C, Pr-M e E) codificadas por um replicon do vírus Sinbdis, foram utilizadas para empacotar replicons do vírus Oeste do Nilo em VLPs, capazes de iniciar um ciclo único de infecção em células (FAYZULIN *et al.*, 2006). Alguns sistemas de empacotamento têm utilizado linhagens celulares desenvolvidas para expressar proteínas estruturais de flavivírus sob o controle de promotores eucarióticos, permitindo um empacotamento constitutivo dos replicons (GEHRKE *et al.*, 2003; HARVEY *et al.*, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A dengue é um problema de saúde pública, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade e por isso, o desenvolvimento de uma vacina para a doença é considerada prioridade pela Organização Mundial de Saúde. No entanto, o desenvolvimento da vacina encontra sua dificuldade na imunopatogênese da doença, fazendo-se necessária a construção de uma vacina tetravalente que seja capaz de imunizar contra os quatro sorotipos do vírus sem elicitar um quadro de febre hemorrágica do dengue. Para isto, novas tecnologias têm sido utilizadas no lugar dos sistemas de atenuação e inativação viral.

A identificação de epítomos definidos e o direcionamento e apresentação destes para o compartimento MHC II, utilizando moléculas de sinalização de tráfego celular como LAMP, gera uma maior atividade proliferativa de linfócitos antígeno-específicos, abordagem importante para o desenvolvimento de uma vacina racional. A resposta do sistema imune também pode ser potencializada com a fusão de genes heterólogos (como o domínio III do envelope) aos replicons de flavivírus, induzindo um nível de expressão muito superior aos plasmídeos normalmente utilizados em vacinas de DNA. Assim, o desenvolvimento destas duas estratégias vacinais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o dengue pode constituir um importante avanço para o desenvolvimento de vacinas de última geração.

O uso das diversas tecnologias acima expostas para a construção de novas formulações vacinais e todos os conhecimentos gerados neste projeto poderão ser utilizados no desenvolvimento de outras vacinas como HIV, Febre Oeste do Nilo e Hepatite C, constituindo assim um importante avanço para o desenvolvimento de vacinas mais potentes que as de DNA convencionais e revolucionando o conceito de vacinas genéticas no futuro.

3 PERGUNTA CONDUTORA

O uso de novas tecnologias como moléculas sinalizadoras (LAMP) e vetores auto-replicativos (replicons) podem servir como ferramentas para o desenvolvimento de uma vacina efetiva para o dengue?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver e avaliar duas novas estratégias vacinais contra o vírus dengue.

4.2 Objetivos específicos

- a) Construir cassetes de DNA com epítomos de célula B e T imunologicamente reativos do DENV-3 e fusioná-los com a proteína LAMP;
- b) Construir cassetes de DNA com o domínio III (DIII) da glicoproteína do envelope dos quatro sorotipos do vírus dengue (DENV-1 a DENV-4), como construções monovalente e tetravalente (*in tandem*) e fusioná-los ao replicon de febre amarela;
- c) Analisar a expressão protéica das construções realizadas em células eucariotas;
- d) Produzir *Virus Like Particles* (VLPs) utilizando linhagem celular para transcomplementação dos replicons que expressam o DIII;
- e) Avaliar a eficiência dos antígenos codificados na vacina de DNA baseada em epítomos, quanto à obtenção de resposta imune protetora em camundongos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Etapas envolvidas no desenvolvimento das estratégias vacinais contra o vírus dengue

O fluxograma abaixo relata as etapas envolvidas no desenvolvimento das duas estratégias vacinais contra o vírus dengue: a primeira constitui uma vacina de DNA baseada em epítomos de células B e T do DENV-3 e a segunda uma vacina tetravalente baseada no replicon do vírus da febre amarela expressando o domínio III do envelope do vírus dengue.

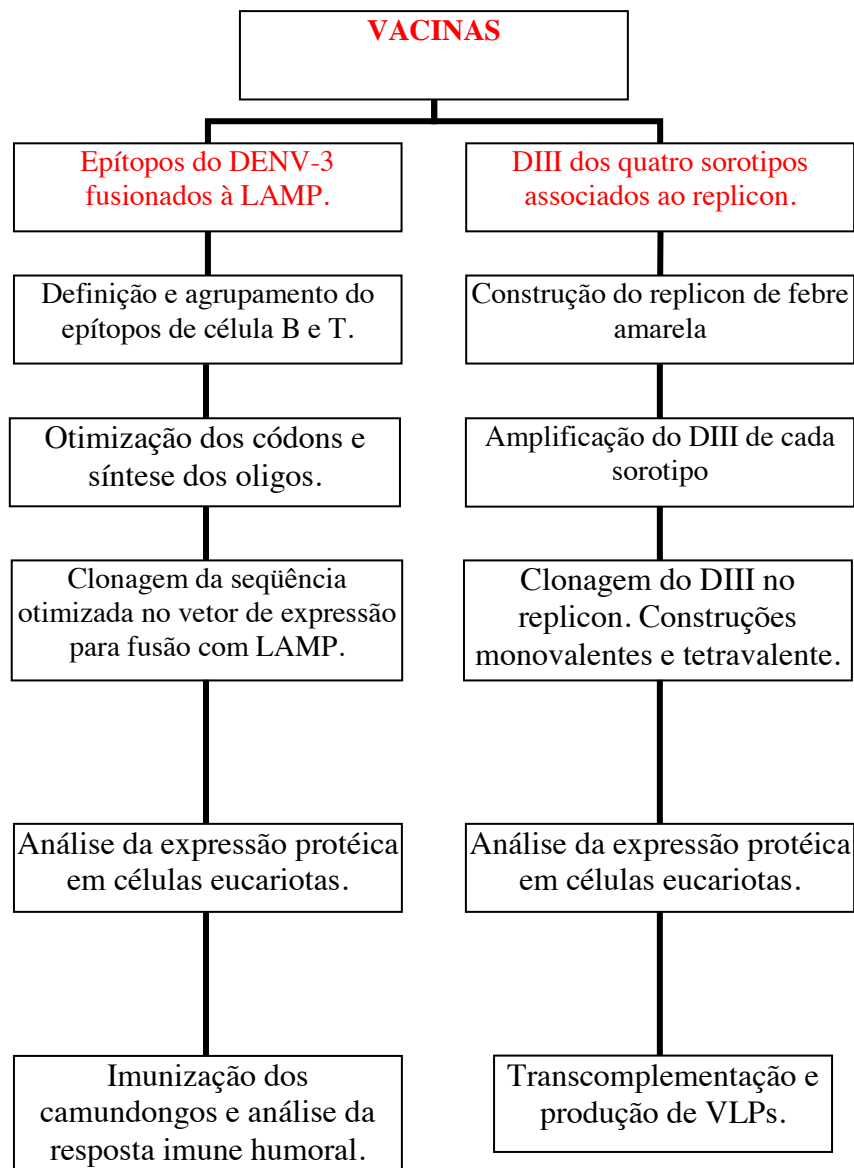


Figura 3- Fluxograma metodológico.

Fonte: Dados da autora.

5.2 Desenvolvimento de uma vacina de DNA contra o vírus dengue sorotipo 3 utilizando epítomos de células B e T mapeados

5.2.1 Cultivo de células e de vírus

As células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney cells*) e VERO (*African Green Monkey Kidney cells*) foram mantidas em meio MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL, Gibco). As células COS-1 (*African Green Monkey Kidney Cells-SV40 transformed*) foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*) suplementado com 10% soro bovino fetal, 1% de 2 mM L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 1% de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL, Gibco), em estufa à 37°C com 5% de CO₂.

Todas as células foram observadas diariamente quanto a sua viabilidade e mantidas por tempo indeterminado, sendo repicadas a cada três dias, para as células BHK-21 e VERO e a cada dois dias para as células COS-1, até o momento da realização dos ensaios.

Para os testes de neutralização por redução de placas foram utilizadas células VERO e como vírus, uma quimera formada por febre amarela/DENV-3 (YFV-DENV-3, clone #3) no qual a região dos genes que expressam as proteínas prM/E do vírus da febre amarela foram substituídas pela região prM/E do vírus da dengue sorotipo 3, cepa BR95016 (em fase de elaboração)². O vírus quimera foi crescido em célula VERO e titulado por ensaio de placa (dados não mostrados).

5.2.2 Mapeamento de epítomos e montagem da estratégia vacinal

Os epítomos de célula B e de célula T do DENV-3 cepa brasileira (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2002) foram previamente mapeados utilizando, respectivamente, as técnicas de *Enzyme-linked immunosorbent assay*-ELISA (SILVA *et al.*, 2009) e de *Enzyme-linked*

² As quimeras virais fazem parte dos trabalhos realizados pela Dra. Laura Gil, do Departamento de Virologia e Terapia Experimental, cujos dados ainda não foram publicados.

immunosorbent spot-ELISPOT (em fase de elaboração)³. A escolha do sorotipo 3 para a construção da nossa abordagem vacinal, deve-se ao fato de que, o mapeamento dos epítomos utilizados neste trabalho foi realizado entre os anos de 2003-2007, momento em que o sorotipo de dengue predominante no estado de Pernambuco era o sorotipo 3 (CORDEIRO *et al.*, 2008). Deste modo, todas as amostras de soros humanos utilizadas para o mapeamento de epítomos de células B e T foram de pacientes infectados com o DENV-3 e por isso, os ensaios de ELISA e ELISPOT foram realizados com peptídeos sintéticos que cobriam a seqüência das proteínas E, NS1 e NS3 também do DENV-3.

Para a construção da vacina de DNA expressando epítomos de célula B e célula T, além das cinco regiões que incluem os onze epítomos de célula B mapeados na proteína do envelope (E) (Quadro 1), foram incluídos também onze epítomos de célula T do E (Quadro 2), vinte epítomos da proteína não-estrutural (NS), NS1, e vinte e um epítomos da proteína NS3 (Quadros 3 e 4, respectivamente).

Posição dos resíduos na proteína	Seqüência dos aminoácidos
51-65	TQLATLRKLCIEGKI
71-85	DSRCPTQGEAVLPPEE
76-90	TQGEAVLPPEEQDPNY
131-145	QYENLKYTVIIITVHT
136-150	KYTVIIITVHTGDQHQ
141-155	ITVHTGDQHQVGNET
146-160	GDQHQVGNETQGVTA
151-165	VGNETQGVTAETPQ
156-170	QGVTAETPQASTTE
196-210	LLTMKNKAWMVHRQW
246-260	PEVVVLGSQEGAMHT

Quadro 1- Epítomos de célula B mapeados na glicoproteína do envelope do DENV-3.

Fonte: Silva *et al.* (2009).

³ O mapeamento de epítomos de células T foi realizado como parte de um projeto desenvolvido no Departamento de Virologia e Terapia Experimental-CPqAM, pela estudante Liciane Alencar e pela Dra. Joelma Souza, cujos dados ainda não foram publicados.

Posição dos resíduos na proteína	Seqüência dos aminoácidos
56-70	LRKLCIEGKITNITT
86-100	QDPNYVCKHTYVDRG
91-105	VCKHTYVDRGWGNGC
286-301	KMDKLELKGMSYAMC
296-310	SYAMCTNTFVLKKEV
356-370	VTKKEEPVNIEAEP
456-470	GIGVLLTWIGLNSKN
461-475	LTWIGLNSKNTSMSF
466-480	LNSKNTSMSFSCIAI
471-485	TSMSFSCIAIGIITL
476-493	SCIAIGIITLYLGAVVQA

Quadro 2- Epítomos de célula T mapeados na glicoproteína do envelope do DENV-3.

Fonte: Alencar *et al.* (em fase de elaboração)⁴.

⁴ O mapeamento de epítomos de células T na glicoproteína do envelope foi realizado como parte de um projeto desenvolvido no Departamento de Virologia e Terapia Experimental-CPqAM, pela estudante Lician Alencar, cujos dados ainda não foram publicados.

Posição dos resíduos na proteína	Seqüência dos aminoácidos
41-55	RLATAIAGAWENGVC
45-59	AIAGAWENGVCGIRS
65-79	NLLWKQIANELNYIL
85-99	KLTVVVVDIIGVLEQ
93-107	IIGVLEQ GKRTLTPQ
105-119	TPQPMELKYSWKTWG
121-135	AKIVTAETQNSSFII
173-187	EVYTQLCDHRLMSAA
177-191	QLCDHRLMSAAVKDE
181-195	HRLMSAAVKDERAVH
185-199	SAAVKDERAVHADMG
237-251	LESDMIIPKSLAGPI
241-255	MIIPKSLAGPISQHN
245-259	KSLAGPISQHNHRPG
253-267	QHNHRPGYHTQTAGP
285-299	VVITENCGTRGPSLR
289-303	ENCGTRGPSLRTTTV
297-311	SLRTTTTVSGKLIHEW
309-323	HEWCCRSCTLPPLRY
321-335	LRYMGEDGCWYGMEI

Quadro 3- Epítomos de célula T mapeados na proteína não-estrutural NS1 do DENV-3.

Fonte: Souza *et al.* (em fase de elaboração)⁵.

⁵ O mapeamento de epítomos de células T na proteína NS1 foi realizado como parte de um projeto desenvolvido no Departamento de Virologia e Terapia Experimental-CPqAM, pela Dra. Joelma Souza, cujos dados ainda não foram publicados.

Posição dos resíduos na proteína	Seqüência dos aminoácidos
89-103	WQKGEEVQVIAVEPG
177-191	PELEEEEMFKKRNLTI
181-195	EEMFKKRNLTIMDLH
185-199	KKRNLTIMDLHPGSG
209-223	VREAIKRRLRTLILA
277-291	PNYNLIIMDEAHFTD
281-295	LIIMDEAHFTDPASI
285-299	DEAHFTDPASIAARG
381-395	KKVIQLSRKTFDTEY
385-399	QLSRKTFDTEYQKTK
389-403	KTFDTEYQTKLNDW
393-407	TEYQTKLNDWDFVV
405-419	FVVTTDISEMGANFK
409-423	TDISEMGANFKADRV
413-427	EMGANFKADRVIDPR
485-499	DHAHWTEAKMLLDNI
493-507	KMLLDNINTPEGIIP
497-511	DNINTPEGIIPALFE
501-515	TPEGIIPALFEPERE
513-527	EREKSAAIDGEYRLK
525-539	RLKGESRKTFFVELMR

Quadro 4- Epítomos de célula T mapeados na proteína não-estrutural NS3 do DENV-3.

Fonte: Souza *et al.* (em fase de elaboração)⁶.

Os epítomos correspondentes em cada proteína foram organizados em grupos, de modo que os peptídeos que apresentavam sobreposição de seqüências foram considerados como únicos (Quadros 5-8). Todas estas seqüências foram localizadas ao longo das proteínas do E, NS1 e NS3 do DENV-3, junto aos epítomos também mapeados, mas que não faziam sobreposição (Quadro 9). As seqüências que se mostraram muito próximas uma das outras ao longo da glicoproteína também foram consideradas como únicas, evitando a separação de

⁶ O mapeamento de epítomos de células T na proteína NS3 foi realizado como parte de um projeto desenvolvido no Departamento de Virologia e Terapia Experimental-CPqAM, pela Dra. Joelma Souza, cujos dados ainda não foram publicados.

possíveis epítomos conformacionais. Após esta análise, foram adicionados cinco aminoácidos (originais da seqüência de cada proteína) que apareciam antes e depois de cada epítomo construído, visando um melhor processamento do construído vacinal (resíduos flanqueantes).

Por fim, foram definidos os epítomos para a abordagem vacinal dentro de cada proteína (E, NS1 e NS3), como demonstrado nos Quadros de 10 a 12.

Seqüência dos resíduos na proteína	Análise da sobreposição e seqüência final definida
71-85	DSRCPTQGEAVLPEE
76-90	TQGEAVLPEEQDPNY
	DSRCPTQGEAVLPEEQDPNY
131-145	QYENLKYTVIITVHT
136-150	KYTVIITVHTGDQHQ
141-155	ITVHTGDQHQVGNET
146-160	GDQHQVGNETQGVTA
151-165	VGNETQGVTAETIPQ
156-170	QGVTAETIPQASTTE
	QYENLKYTVIITVHTGDQHQVGNETQGVTAETIPQASTTE

Quadro 5- Epítomos de célula B da glicoproteína E do envelope do DENV-3 definidos após análise da sobreposição.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A seqüência final encontra-se destacada em vermelho. São apresentados aqui apenas os epítomos que apresentavam sobreposição de seqüência entre os epítomos mapeados, como mostrado na Tabela 1.

Seqüência dos resíduos na proteína	Análise da sobreposição e seqüência final definida
86-100	QDPNYVCKHTYVDRG
91-105	VCKHTYVDRGWGNGC
	QDPNYVCKHTYVDRGWGNGC
286-301	KMDKLELKGMSYAMC
296-310	SYAMCTNTFVLKKEV
	KMDKLELKGMSYAMCTNTFVLKKEV
456-470	GIGVLLTWIGLNSKN
461-475	LTWIGLNSKNTSMSF
466-480	LNSKNTSMSFSCIAI
471-485	TSMSFSCIAIGIITL
476-493	SCIAIGIITLYLGAVVQA
	GIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGIITLYLGAVVQA

Quadro 6- Epítomos de célula T da glicoproteína E do envelope do DENV-3 definidos após análise da sobreposição.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A seqüência final encontra-se destacada em vermelho. São apresentados aqui apenas os epítomos que apresentavam sobreposição de seqüência entre os epítomos mapeados, como mostrado na Tabela 2.

Seqüência dos resíduos na proteína	Análise da sobreposição e seqüência final definida
41-55	RLATAIAGAWENGVC
45-59	AIAGAWENGVCGIRS
	RLATAIAGAWENGVCGIRS
85-99	KLTVVVGDIIGVLEQ
93-107	IIGVLEQGKRTLTPQ
105-119	TPQPMELKYSWKTWG
	KLTVVVGDIIGVLEQGKRTLTPQPMELKYSWKTWG
173-187	EVYTQLCDHRLMSAA
177-191	QLCDHRLMSAAVKDE
181-195	HRLMSAAVKDERAVH
185-199	SAAVKDERAVHADMG
	EVYTQLCDHRLMSAAVKDERAVHADMG
237-251	LESDMIIPKSLAGPI
241-255	MIIPKSLAGPISQHN
245-259	KSLAGPISQHNHRPG
253-267	QHNHRPGYHTQTAGP
	LESDMIIPKSLAGPISQHNHRPGYHTQTAGP
285-299	VVITENCGTRGPSLR
289-303	ENCGTRGPSLRTTTV
297-311	SLRTTTVSGKLIHEW
309-323	HEWCCRCTLPLRLRY
321-335	LRMGEDGCWYGMEI
	VVITENCGTRGPSLRTTTVSGKLIHEWCCRCTLPLRLRYMGEDGCWYGMEI

Quadro 7- Epítomos de célula T da proteína não-estrutural NS1 do DENV-3 definidos após análise da sobreposição.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A seqüência final encontra-se destacada em vermelho. São apresentados aqui apenas os epítomos que apresentavam sobreposição de seqüência entre os epítomos mapeados, como mostrado na Tabela 3.

Seqüência dos resíduos na proteína	Análise da sobreposição e seqüência final definida
177-191	PELEEEEMFKKRNLTI
181-195	EEMFKKRNLTIMDLH
185-199	KKRNLTIMDLHPGSG
	PELEEEEMFKKRNLTIMDLHPGSG
277-291	PNYNLIIMDEAHFTD
281-295	LIIMDEAHFTDPASI
285-299	DEAHFTDPASIAARG
	PNYNLIIMDEAHFTDPASIAARG
381-395	KKVIQLSRKTFDTEY
385-399	QLSRKTFDTEYQKTK
389-403	KTFDTEYQTKLNDW
393-407	TEYQTKLNDWDFVV
405-419	FVVTTDISEMGANFK
409-423	TDISEMGANFKADRV
413-427	EMGANFKADRVIDPR
	KKVIQLSRKTFDTEYQTKLNDWDFVVTTDISEMGANFKADRVIDPR
485-499	DHAHWTEAKMLLDNI
493-507	KMLLDNINTPEGIIP
497-511	DNINTPEGIIPALFE
501-515	TPEGIIPALFEPERE
513-527	EREKSAAIDGEYRLK
525-539	RLKGESRKTFFVELMR
	DHAHWTEAKMLLDNINTPEGIIPALFEPEREKSAAIDGEYRLKGESRKTFFVELMR

Quadro 8- Epítomos de célula T da proteína não-estrutural NS3 do DENV-3 definidos após análise da sobreposição.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A seqüência final encontra-se destacada em vermelho. São apresentados aqui apenas os epítomos que apresentavam sobreposição de seqüência entre os epítomos mapeados, como mostrado na Tabela 4.

ORIGEM						
1	MNNQRKKTGK	PSINMLKRVR	NRVSTGSOLA	KRFSKGLLNG	QGPMKLVMAF	IAFLRFLAIP
61	PTAGVLARWG	TFKKSGAIKV	LKGFKKEISN	MLSIINKRKK	TSLCLMMILP	AALAFHLTSR
121	DGEPRMIVGK	NERGKSLLFK	TASGINMCTL	IAMDLGEMCD	DTVTYKCPHI	TEVEPEDIDC
181	WCNLTSTWVT	YGTCNQAGER	RRDKRSVALA	PHVGMGLDTR	TQTWMSAEGA	WRQVEKVETW
241	ALRHPGFITL	ALFLAHYIGT	SLTQKVVFIF	LLMLVTPSMT	MRCVGVGNRD	FVEGLSGATW
301	VDVLEHGGC	VTTMAKNKPT	LDIELQKTEA	TQLATLRKLC	IEGKITNITT	DSRCPTQGEA
361	VLPEEQDQNY	VCKHTYVDRG	WGNGCGLFGK	GSLVTCAKFO	CLEPIEGKVV	QYENLKYTVI
421	ITVHTGDQHQ	VGNETQGVTA	EITPQASTTE	AILPEYGTLG	LECSPTGLD	FNEMILLTMK
481	NKAWMVHROW	FFDLPLPWTG	GATTETPTWN	RKELLVTFKN	AHAKKQEVVV	LGSQEGAMHT
541	ALTGATEIQN	SGGTSIFAGH	LKCRLLKMDKL	ELKGMYSYAMC	TNTFVLKKEV	SETQHGTTIL
601	KVEYKGEDAP	CKIPFSTEDG	QGKAHNGRLI	TANPVVTKKE	EPVNI EAEP	FGESNIVIGI
661	GDKALKINWY	RKGSSIGKMF	EATARGARM	AILGDTAWDF	GSVGGVLNSL	GKMHVQIFGS
721	AYTALFSGVS	WVMKIGIGVL	LTWIGLNSKN	TSMSFSCIAI	GIITLYLGA	VQADMGCVIN
781	WKGKELKCGS	GIFVTNEVHT	WTEQYKQFAD	SPKRLATAIA	GAWENGVCGI	RSTTRMENLL
841	WKQIANELNY	ILWENNIKLT	VVVGDIIGVL	EOGKRTLTPQ	PMELKYSWKT	WKGAKIVTAE
901	TQNSSFIIDG	PNTPECPAS	RAWNVWEVD	YGFVFTTNI	WLKLRVYTA	LCDHRLMSAA
961	VKDERAVHAD	MGYWI ESQKN	GSWKLEKASL	IEVKTCWPK	SHTLWSNGVL	ESDMIIPKSL
1021	AGPISQHNHR	PGYHTQTAGP	WHLGKLELDF	NYCEGTTVVI	TENCGTRGPS	LRTTTVSGKL
1081	IHEWCCRST	LPPLRYMGED	GCWYGMETIRP	ISEKEENMVK	SLVSAGSGKV	DNFTMGVLC
1141	AILFEEVMRG	KFGKHHMIAG	VFFTFVLLLS	GQITWRDMAH	TLIMIGSNAS	DRMGMGVTYL
1201	ALIATFKIQP	FLALGFLLRK	LTSRENLLLG	VGLAMATTLQ	LPEDIEQMAN	GIALGLMALK
1261	LITQFETQQL	WTALISLTC	NTMFTLTVAG	RTATLILAGV	SLLPVCSMS	MRKTDWLPMA
1321	VAAMGVPLP	LFIFSLKDTL	KRRSWPLNEG	VMAVGLVSL	ASSLLRNDVP	MAGPLVAGGL
1381	LIACYVITGT	SADLTVEKAA	DITWEEEAEG	TGVSHNLMIT	VDDDGTMRK	DDETENILTV
1441	LLKTALLIVS	GVFPYSIPAT	LLVWHTWQKQ	TQRSGLWDV	PSPPETQKAE	LEEGVYRIKQ
1501	QGIFGKTQVG	VGVOKEGVFH	TMWHVTRGAV	LTYNKRLPEP	NWASVKKDLI	SYGGGWRLSA
1561	QWQKGEVQV	IAVEPKKNPK	NFQTMPGTFQ	TTTGEIGAI	LDKPKGTS	PIINREGKV
1621	GLYGNVVTK	NGGYVSGIAQ	TNAEPDGP	ELEEEMFKKR	NLTIMDLHPG	SGKTRKYLPA
1681	IYREAIKRR	RTLILAPTRV	VAAEMEEALK	GLPIRYQTTA	TKSEHTGREI	VDMKATDFT
1741	MRLSPVRVP	NYNLIIMDEA	HFTDPASIAA	RGYISTRVGM	GEAAAI FMTA	TPPGTADAFP
1801	QSNAPIQDEE	RDIPERSWNS	GNEWITDFAG	KTVWFVPSIK	AGNDIANCLR	KNGKKVIQLS
1861	RKTFDTEYQK	TKLNDWDFVV	TTDISEMGAN	FKADRVIDPR	RCLKPVILTD	GPERVILAGP
1921	MPVTAASAAQ	RRGRVGRNPQ	KENDQYIFTG	QPLNNDHA	HWTEAKMLLD	NINTPEGIIP
1981	ALFEPEREKS	AAIDGEYRLK	GESRKTFFVEL	MRRGDLPVWL	AHKVASEGIK	YTDRKWCDFG
2041	ERNNQILEEN	MDVEIWTKEG	EKKKLRPRWL	DARTYSDPLA	LKEFKDFAAG	RKSIADLVT
2101	EIGRVPSHLA	HKTRNALDNL	VMLHTSEHGG	RAYRHAVEEL	PETMETLLL	GLMILLTGGA
2161	MLFLISGKGI	GKTSIGLICV	IASSGMLWMA	EIPLQWIASA	IVLEFFMMVL	LIPEPEKQRT
2221	PQDNQLAYVV	IGILTLAAII	AAANEMGLET	TKRDLGMSKE	PGVVSPTS	DVDLHPASAW
2281	TLYAVATTVI	TPMLRHTIEN	STANVSLAAI	ANQAVVLMGL	DKGWPI SKMD	LGVPLLAGC
2341	YSQVNPLTTL	AAVLLLTITHY	AIIGPGLQAK	ATREAQKRTA	AGIMKNPTVD	GIMTIDLDPV
2401	IYDSKFEKQL	GQVMLLVLC	VQLLLMRTSR	ALCEALTLAT	GPITTLWEGS	PGKFWNTTIA
2461	VSMAIFRGS	YLAGAGLAFS	IMKSVGTGKR	GTGSQGETLG	EKWKKLNQL	SRKEFDLYKK
2521	SGITEVDRTE	AKEGLKRGEI	THHAVSRGSA	KLQWFVERNM	VIPEGRVID	GCGRGGWSY
2581	CAGLKKVTEV	RGYTKGGPGH	EPEVPMSTYG	WNIVKLSMGK	DVFYLPPEK	DTLLCDIGES
2641	SPSPTVEESR	TIRVLKMEVP	WLKNNQFCIK	VLNPYMPVI	EHLERLQRKH	GGMLVRNPLS
2701	RNSTHEMYWI	SNGTGNIVAS	VNMVSRLLLN	RFTMTTHRRPT	IEKDVDL GAG	TRHVNAEPET
2761	PNMDVIGERI	KRIKEEHNST	WHYDDENPYK	TWAYHGSYEV	KATGSASSMI	NGVVKLLTKP
2821	WDVVPMTQM	AMTDTTPFGQ	QRFVKEKVD	RTPRSMPTGTR	RVMGITAEWL	WRTLGRNKR
2881	RLCTREEFTK	KVRTNAAMGA	VFTENQWDS	AKAAVEDEF	WKLVDRELE	HKLKCGSCV
2941	YNMMGKREK	LGEFGKAKGS	RAIWYMWLGA	RYLEFEALGF	LNEDHWF SRE	NSYSGVEGEG
3001	LHKLGYILRD	ISKIPGGAMY	ADDTAGWDTR	ITEDDLHNEE	KITQOMDPEH	ROLANAI FKL
3061	TYQNKVVKVQ	RPTPTGTVM	IISRKQDQGS	GOVGTYGLNT	FTNMEAQLIR	QMEGEGVLSK
3121	ADLENPHLPE	KKITQWLETK	GVERLKRMAI	SGDDCVVKPI	DDRFANALLA	LNDMGKVRKD
3181	IPQWQPSKGW	HDWQQVPFCS	HHFHELIMKD	GRKLVVPCRP	QDELIGRARI	SQGAGWSLRE
3241	TACL GKAYAQ	MWSLMYFHRR	DLRLASNAIC	SAVPVHWVPT	SRTTWSIH AH	HQWMTTEDML
3301	TVWNRVWIED	NPWMDKTPV	TTWENVPYLG	KREDQWC GSL	IGLTSRATWA	QNILTAIQQV
3361	RSLIGNEEFL	DYMPSMKRFR	KEESEGAIW			

Quadro 9- Quadro aberto de leitura (*open reading frame – ORF*) do vírus DENV-3.

Fonte: Dados da autora.

Nota: Cepa BR74886. Epítotos mapeados na proteína do envelope em rosa, NS1 em azul e NS3 em verde.

ORIGEM	
1	MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVLEHGGCVTTMAKNKPTLDIEL <u>OKTEATQ</u> LATLRKLC
61	<u>IEGKITNIT</u> TD SRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGC <u>GLFGK</u> GSLVTCAKFO
121	CLEPI <u>EGKVVQ</u> YENLK YTVIITVHTGDQHVGNETQGVTAETPQASTTE <u>AILPE</u> YGTLG
181	LECSPTGLD <u>FNEMILL</u> TMKNKAWMVHRQW <u>FFDLP</u> LPWTS GATTETPTWNRKELLVTFKN
241	A <u>HAKKQ</u> EVVVLGSQEGAMHT <u>ALTGA</u> TEIQNSGGT SIFAGH <u>LKCRL</u> KMDKLELKGMSYAMC
301	<u>TNTFVLKKEV</u> SETQHGTILIKVEYKGEDAPCKIPFSTEDGQGAHNGRLI <u>TANPV</u> VTKKE
361	<u>EPVNIEAEP</u> PFGESNIVIGIGDKALKINWYRKGSSIGKMF EATARGARRMAILGDTAWDF
421	GSVGGVLSLNGKMHQIFGSAYTALFSGVS <u>WVMKI</u> GIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAI
481	<u>GIITLYLGAVVQ</u> ADMGCV

Quadro 10- Sequência da proteína do envelope.

Fonte: Dados da autora.

Nota: As seqüências finais definidas para síntese encontram-se destacadas em cinza, incluindo os resíduos flanqueantes em vermelho e epítomos mapeados em preto sublinhado. Os resíduos DMGCV no fim da seqüência da proteína acima, diz respeito ao começo (origem) da proteína não-estrutural NS1 e foram adicionados como parte dos resíduos flanqueantes por serem, as proteínas do envelope e NS1, consecutivas dentro da mesma janela aberta de leitura.

ORIGEM	
1	DMGCVINWKGKELKCGSGIFVTNEVHTWTEOYKFO <u>ADSPKRL</u> LATAIAGAWENGVCIRST
61	<u>TRMENLLWKQ</u> IANELNYILWENNIKLTVVVGDIIGVLEQ GKRTLTPQPMELKYSWKTWGK
121	<u>AKIVTAETQ</u> NSSFII <u>DGPNT</u> PECPSASRAWNVWEVEDYGFVFTTNI <u>WLKLR</u> EVYTQLCD
181	<u>HRLMSAAVK</u> DERAVHADMG <u>YWIES</u> QKNGSWKLEKASLIEVKTCTWPKSHTL <u>WSNGV</u> LESD
241	<u>MIIPKSLAG</u> PISQHNHRPGYHTQTAGP <u>WHLGK</u> LELDFNY <u>CEGTT</u> VVITENCGTRGPSLRT
301	<u>TTVSGKLI</u> HEWCCR SCTLPLRYMGEDGCWYGMET <u>RPISE</u> KEENMVKSLVSA

Quadro 11- Sequência da proteína não-estrutural NS1.

Fonte: Dados da autora.

Nota: As seqüências finais definidas para síntese encontram-se destacadas em cinza, incluindo os resíduos flanqueantes em vermelho e epítomos mapeados em preto sublinhado.

ORIGEM	
1	SGVLWDVPSPPETQKAELEEGVYRIKQOGIFGKTQVGVGVQKEGVFHTMWHVTRGAVLTY
61	NGKRLEPNWASVKKDLISYGGGW <u>RLSAQWQKGEVQVIAVEPG</u> <u>KNPKN</u> FQTMPGTFQTTT
121	GEIGAIALDFKPGTSGSPIINREGKVVGLYGNGVVTKNGGYVSGIAQTNAE <u>PDGPTPELE</u>
181	<u>EEMFKRNLTIMDLHPGSG</u> <u>KTRKY</u> LP AIVREAIKRRLRTLILAPTRVVAEMEEALKGLP
241	IRYQTTATKSEHTGREIVDLMCHATFTMRL <u>SPVRV</u> PNYNLIIMDEAHFTDPASIAARGY
301	<u>ISTR</u> VGMGEAAAI FMTATPPGTADAFPOSNAPIQDEERDIPERSWNSGNEWITDFAGKTV
361	WFVPSIKAGNDIANC <u>LRKNG</u> <u>KKVIQLSRKTFDTEYQKTKLNDWDFVVTTDISEMGANFKA</u>
421	<u>DRVIDPR</u> <u>RCLKP</u> VILTDGPERVILAGPMPVTAASAAQRGRVGRNPQKENDQYIFTGQPL
481	<u>NNDE</u> DHAHWTEAKMLLDNINTPEGIIPALFEPEREKSAIDGEYRLKGESRKTFFVELMR
541	<u>GDLP</u> VWLAHKVASEGIKYTDRKWCDFGERNNQILEENMDVEIWTKEGEKKKLRPRWLDAR
601	TYSDPLALKEFKDFAAGRK

Quadro 12- Sequência da proteína não-estrutural NS3.

Fonte: Dados da autora.

Nota: As seqüências finais definidas para síntese encontram-se destacadas em cinza, incluindo os resíduos flanqueantes em vermelho e epítomos considerados em preto sublinhado.

5.2.3 Otimização das seqüências dos epítomos selecionados

Os epítomos selecionados foram organizados como uma seqüência única de aminoácidos e traduzidos para a respectiva seqüência de oligonucleotídeos. A otimização da seqüência de DNA para uma melhor expressão da proteína em células eucarióticas foi realizada utilizando o software Leto 1.0 (Entelechon GmbH, versão 1.0.11, USA), o qual combina a troca de códons de uma dada seqüência de DNA, sem alterar a seqüência original de aminoácidos. Através de cálculos complexos realizados sobre a estrutura do RNA, o programa realiza a substituição de códons raramente reconhecidos pela maquinaria celular de síntese protéica em células eucarióticas, por códons mais comumente reconhecidos, o que possibilita uma maior expressão do antígeno. As seqüências otimizadas foram adaptadas à expressão em um organismo alvo (humanos), levando em consideração diversos parâmetros biológicos como o número de seqüências repetitivas, a estrutura do mRNA, o conteúdo de GC (guanina e citosina), a presença e/ou ausência de sítios de restrição e *splicing*.

Para as estratégias de clonagem foram adicionadas à sequência otimizada: fragmento de Kozak, códons de iniciação (ATG) e parada (TGA), assim como sítios para enzimas de restrição (para posterior clonagem da sequência em plasmídios de expressão em células eucarióticas).

5.2.4 Construção dos vetores p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit

A sequência otimizada gerada pelo programa Leto 1.0 (ANEXO A) foi enviada para síntese comercial, onde foi clonada no vetor plasmidial pGA15, gerando o plasmídeo sintético pGA15_DENV3_epit_opt (GENEART Inc., Regensburg, Deutschland) (Figura 4). Após recebimento em nosso laboratório, o plasmídeo foi então transformado em bactérias *E.coli* cepa K12TB1 por choque térmico e crescido em meio LB (*Luria-Bertani Broth*) com canamicina a 50 mg/mL. A extração do DNA plasmideal foi realizada através do kit Midi prep QIAGEN (QIAGEN, Valencia, CA).

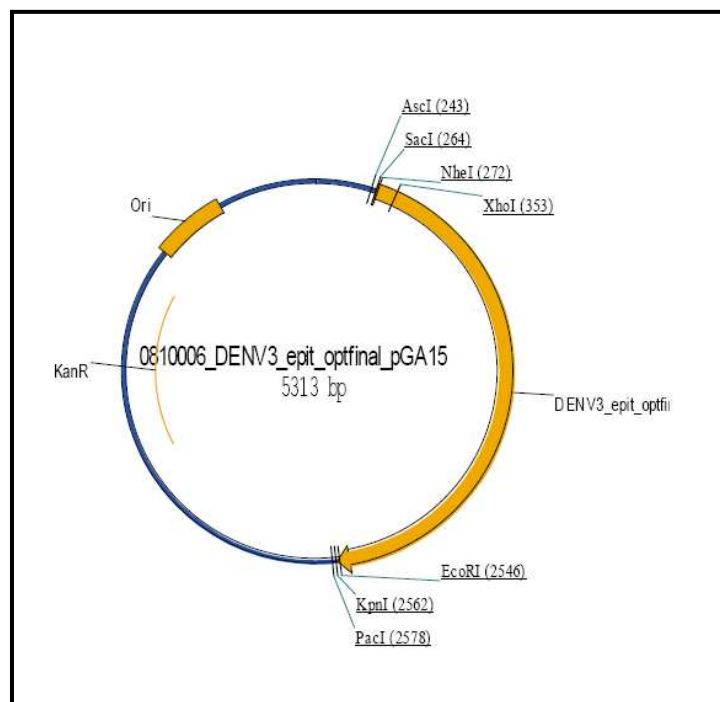


Figura 4- Mapa do plasmídeo sintético pGA15_DENV3_epit_opt.

Fonte: Genart (2008).

Nota: Ori: origem; DENV-3_epit_optfinal: sequência final dos epítomos otimizados; AscI, SacI, NheI, XhoI, EcoRI, KpnI, PacI: enzimas de restrição e KanR: marca de resistência à canamicina.

Para a construção dos plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit, o gene de interesse contendo os epítomos de DENV3 (DENV3_epit_opt) foi retirado do vetor comercial por digestão, utilizando os sítios para enzimas de restrição presentes no plasmídeo, e em seguida clonado no vetor de expressão de células eucarióticas p43-HIVhumanLAMP/Gag, o qual contém as porções N e C-terminal da proteína LAMP-1 humano flanqueando o gene da proteína Gag do HIV (CHIKHILIKAR *et al.*, 2004), como demonstrado na Figura 5. Para estas clonagens, duas abordagens foram utilizadas: a primeira, consistiu na clonagem do gene de interesse no plasmídeo p43-HIVhumanLAMP/Gag, tendo sido mantida toda a seqüência da proteína LAMP e retirado a porção que codifica a proteína Gag do HIV (p43_DENV3_epit_LAMP). Para isto, os plasmídeos p43-HIVhumanLAMP/Gag e pGA15_DENV3_epit_opt foram digeridos com as enzimas XhoI e EcoRI. A segunda abordagem incluiu a clonagem do gene de interesse (epítomos de DENV3) no vetor p43-HIVhumanLAMP/Gag, mas retirando do mesmo a seqüência codificante de LAMP e Gag (p43_DENV3_epit), com o objetivo de simular as proteínas selvagens e sendo este um controle para testes futuros. Para este propósito, os plasmídeos p43-HIVhumanLAMP/Gag e pGA15_DENV3_epit_opt foram digeridos utilizando-se os sítios de restrição para as enzimas NheI e KpnI.

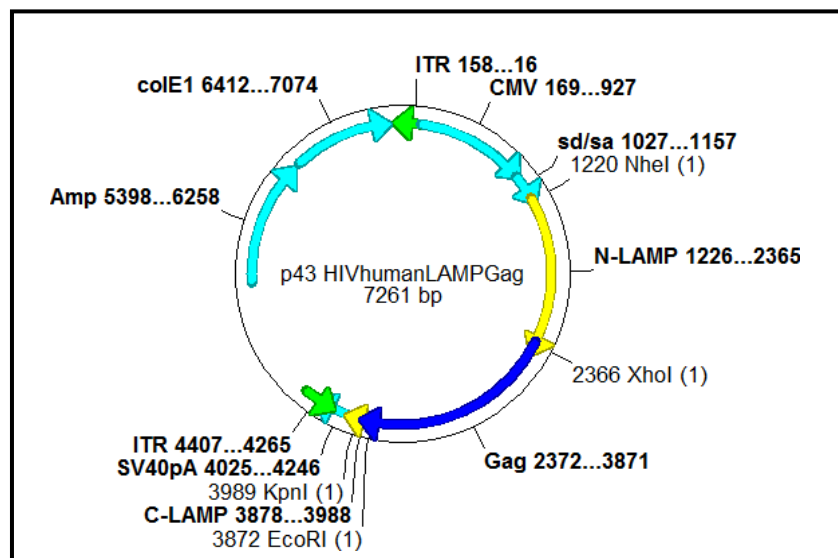


Figura 5- Mapas do plasmídeo p43_HIVhumanLAMP/gag.

Fonte: Dados da autora.

Nota: Plasmídeo p43HIVhumanLAMP/Gag. CMV- promotor; n-LAMP- região N-terminal de LAMP; Gag – gene da proteína Gag do HIV; c-LAMP- região c-terminal de LAMP; AmpR- marca de resistência a ampicilina; NheI, NotI e EcoRI- enzimas de restrição.

As reações de digestão foram realizadas com 1 μ L do DNA (1-2 μ g) de cada um dos plasmídeos, 1 μ L de cada enzima selecionada de acordo com a estratégia de subclonagem: XhoI + EcoRI ou NheI + KpnI (*New England Biolabs*, Ipswich, MA) e 2 μ L do tampão das mesmas, para um volume final de 20 μ L. As condições para as digestões foram de 6h a 37°C, seguidos de 15min a 65°C, para inativação das enzimas. Uma vez digeridos e purificados (QIAquick protocol para purificação do gel), a seqüência DENV3_epit_opt e o vetor foram fusionados através da reação de ligação, utilizando a enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs*, Ipswich, MA), de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, células de *Escherichia coli*, cepa TG1, foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos recombinantes e colônias individualizadas de p43_DENV3_epit_LAMP e de p43_DENV3_epit foram selecionadas para a confirmação das clonagens.

5.2.5 Confirmação da fusão dos genes clonados nas construções p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit

5.2.5.1 Digestão enzimática

As construções foram confirmadas através do ensaio de digestão, utilizando os sítios de restrição para as enzimas XhoI e EcoRI ou NheI e KpnI, presentes nas construções vacinais, de acordo com as estratégias de clonagem citadas no item 5.2.4.

5.2.5.2 Sequenciamento

Todas as construções realizadas foram posteriormente seqüenciadas para a confirmação da identidade dos genes clonados e fusionados. As reações de seqüenciamento foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas-NPT, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE, através da utilização do kit ABI BigDye *terminator cycle*

sequencing e do seqüenciador ABI 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, Foster City, CA). A análise das seqüências foi realizada através do programa Lasergene (DNA Star, Inc, Madison, WI). Os mapas das seqüências dos plasmídios construídos foram adquiridos através do programa ApE-A plasmid Editor v1.10.4.

5.2.6 Transfecção em células BHK-21 e COS-1

As células BHK-21 e COS-1 foram transfectadas isoladamente, com 10 μg de DNA dos plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit, utilizando o kit *PolyFect® Transfection Reagent* (QiAGEN, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante. Como controle, as células foram transfectadas com a mesma quantidade de DNA dos plasmídeos p43-HIVhumanLAMP/Gag e p43.2-vetor vazio sem LAMP ou epítomos (controles positivo e negativo, respectivamente).

Resumidamente, placas de 6 poços (15 mm de diâmetro) contendo quatro lamínulas por poço, foram cultivadas com 4×10^5 células por 24 horas. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução contendo meio de cultivo DMEM com 10% de soro bovino fetal, 10 μg de DNA para cada plasmídeo e 20 μl de *PolyFect Transfection Reagent*. Após 48 horas, as lamínulas contendo as células transfectadas foram fixadas com metanol 100% para os ensaios de imunofluorescência (vide seção 5.2.7).

Como controle da eficiência da transfecção, as células BHK-21 e COS-1 foram transfectadas com a mesma quantidade de DNA do plasmídeo repórter pCMV- βgal . Após 48 horas de transfecção as células foram lavadas com PBS, fixadas com uma solução de 0,2% de glutaraldeído em tampão PBS pH 7,2, por 5min e em seguida incubadas com uma solução contendo o substrato X-gal (20 mg de X-gal, 5 M de ferricamida de potássio, 5 M de ferrociamida de potássio, 2 M de MgCl_2 em tampão PBS pH 7,2). A revelação da atividade da enzima β -galactosidase foi visualizada após incubação de 4h, a 37°C, pelo aparecimento de células azuis, como medida direta da expressão do gene repórter.

5.2.7 Ensaio de imunofluorescência indireta

Para análise da expressão das proteínas clonadas, as células BHK-21 e COS-1 transfectadas com os plasmídeos construídos foram avaliadas através do ensaio de imunofluorescência indireta para detecção da proteína LAMP-1. Resumidamente, 24 e 48 horas após a transfecção, as lamínulas contendo as células transfectadas foram retiradas das placas, lavadas com tampão PBS pH 7,2 e as células presentes nas mesmas fixadas em metanol gelado 100%. As lamínulas foram então fixadas com esmalte em lâmina para microscópio e incubadas com o anticorpo primário. Foram testados dois anticorpos primários, sendo eles o E-5 (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*) e o H4A3, gentilmente cedido pelo Dr. Eduardo Nascimento (*Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, USA*). Ambos os anticorpos, que são monoclonais produzidos em camundongo, reconhecem o LAMP-1 humano e foram utilizados na diluição 1:50. Em seguida, a lâmina foi lavada duas vezes com tampão PBS (10 minutos de incubação para cada lavagem) e incubada durante 1 hora, a 37°C, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, produzido em caprino e conjugado ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína-FITC, 1mg/mL (Sigma, St. Louis, MO), na diluição 1:100. Por fim, a lâmina foi novamente lavada como descrito acima, contra-corada com o corante azul de Evans (0,01%) por 1 minuto, montada com glicerol tamponado e selada com uma lamínula. A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o microscópio Leica DMI 4000B. Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células.

Foram utilizados como controles positivo e negativo para as reações de imunofluorescência, lamínulas contendo células BHK-21 e COS-1 transfectadas com os vetores p43-HIVhumanLAMP/Gag e p43.2-vetor vazio, respectivamente.

5.2.8 Teste de imunogenicidade dos epítomos de célula B do DENV-3 em camundongos

Os camundongos Balb/c foram fornecidos por *Jackson Laboratories* (Maryland, USA) e mantidos em ambiente SPF (*Specific Pathogen Free*), no biotério da Escola de Medicina, da Universidade Johns Hopkins (Maryland, USA). Os animais foram divididos em seis grupos (dois animais por grupo), onde cinco grupos representavam cada uma das cinco regiões

mapeadas como epítomos de célula B na glicoproteína do envelope do DENV-3 e o sexto grupo representava o controle negativo. Os camundongos foram imunizados com uma injeção subcutânea (SC), na base da cauda, duas vezes em um intervalo de 3 semanas, com 50 µg de cada peptídeo sintético (referente a cada epítopo) diluído no adjuvante TiterMax (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Quando a região que mapeava um epítopo era composta de dois ou mais peptídeos, eles eram diluídos em *pool* de modo que, para a injeção, a concentração final também fosse de 50µg. As cinco regiões referentes aos epítomos anteriormente mapeados compreendem os aminoácidos de 51-65, 71-90, 131-170, 196-210 e 246-260, como descrito anteriormente na Tabela 1 do item 5.2.2. Os animais que serviram como controle negativo foram imunizados com o adjuvante TiterMax apenas. Os soros dos camundongos imunizados foram coletados antes da imunização, três semanas após a imunização (quando foi dada também uma dose-reforço) e duas semanas após a dose-reforço, visando à análise da resposta imune humoral e celular.

5.2.9 Imunização dos camundongos com os construídos vacinais p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit

Quatro grupos, cada um com sete camundongos fêmeas (5 semanas de idade) Balb/C, foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de laboratório-CECAL, FIOCRUZ-RJ e mantidos no biotério experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE. Dos quatro grupos, dois foram utilizados para imunizar os animais com uma injeção subcutânea, na base da cauda, com 50 µg de DNA de cada um dos construídos p43_DENV3_epit_LAMP ou p43_DENV3_epit, livre de endotoxinas, no volume final de 50µl (1µg/µL). Uma dose-reforço foi realizada com os mesmos antígenos, 4, 6 e 8 semanas após a imunização (*prime*), quando também foram coletadas amostras de soros de cada grupo. Após 10 semanas foi realizada a sangria total dos animais. Os dois grupos restantes foram utilizados como controles, onde os animais foram imunizados nas mesmas condições, com o vetor vazio p43.2 (sem epítomos e LAMP) ou com tampão PBS pH 7,2.

5.2.10 ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* para avaliação da resposta imune humoral dos epítomos de célula B em camundongos Balb/C

Para avaliação da resposta imune humoral dos epítomos de célula B em camundongos Balb/c, resumidamente, placas Nunc foram sensibilizadas com 100µg/mL dos peptídeos (100 µL por poço) diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas O/N (*overnight*) a 4°C. Após a lavagem com 0,05% Tween 20 em PBS pH 7,2, as placas foram bloqueadas por 1h, a 37°C, com 5% de BSA-soro albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em tampão PBS pH 7,2. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas por 2h a 37°C com uma diluição seriada dos soros dos camundongos (10^{-2} a 10^{-7}) em tampão de diluição (BSA 0,1% em tampão PBS pH 7,2). Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Como controle negativo, os mesmos soros foram incubados em poços não sensibilizados. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por 45min, a 37°C, com o anticorpo IgG (FAB)² anti-camundongo produzido em cabra e conjugado a HRP-*horseradish-peroxidase* (*Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.*), diluído 1:100 em tampão de diluição. As placas foram então lavadas e a revelação foi feita com 100 µL do substrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine-TMB (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), por 30min a T.A. (temperatura ambiente) e a reação interrompida com 100 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em filtro de λ 450 nm, em leitor de ELISA (Benchmark Plus, Bio-Rad).

5.2.11 ELISPOT- *Enzyme-Linked Immunosorbent Spot* para avaliação da resposta imune celular dos epítomos de célula B em camundongos Balb/c

Para avaliação da resposta imune celular dos epítomos de célula B em camundongos Balb/c, o ensaio de ELISPOT foi realizado utilizando o kit comercial para ELISPOT (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) como descrito pelo fabricante. Em resumo, placas PVDF (*polyvinylidene fluoride*) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-interferon-γ de camundongo (5 µg/mL), diluído em PBS 1X pH 7,2 e incubadas O/N a 4°C. As placas foram então lavadas e bloqueadas com meio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Grand Island-NY, USA) contendo 10% de soro bovino fetal, por 2h, a T.A.

Os esplenócitos foram coletados de cada camundongo e plaqueados de três formas: a) como células totais, b) como esplenócitos depletados de células TCD4⁺ (amostras enriquecidas com células TCD8⁺) e c) como esplenócitos depletados de células TCD8⁺ (amostras enriquecidas com células TCD4⁺). As depleções de células TCD4⁺ e TCD8⁺ foram realizadas utilizando esferas imuno-magnéticas recobertas com anticorpos para TCD4⁺ e TCD8⁺, respectivamente, e colunas de depleção de acordo com o protocolo do fabricante (Miltenyi Biotec). Em seguida, 100 µL da suspensão de células contendo de 0,3 x 10⁶ a 1 x 10⁶ células foram adicionadas aos poços contendo 100 µL dos peptídeos representando cada epítipo anteriormente mapeados, na concentração final de 10 µg/mL. Como controles positivo e negativo foram utilizados respectivamente, concanavalina A 5 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e meio de cultura RPMI 1640.

As placas foram então incubadas O/N a 37°C, em estufa contendo 5% CO₂. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS pH 7,2 0,05% Tween 20 e incubadas com o anticorpo biotilado anti- interferon-γ de camundongo (2 µg/mL), por 2h a T.A. Após a etapa de lavagem, as placas foram incubadas novamente por 1h, a T.A., com streptavidina conjugada à HRP-*horseradish-peroxidase*, diluída 100x, seguida de nova lavagem e incubação com o substrato 3-amino-9-ethylcarbazole, por 20min, a T.A. A reação foi interrompida com água destilada e as placas colocadas para secar. Os “spots” foram contados utilizando o equipamento CTL analyser (CTL ImmunoSpot® S5 Macro Analyser, USA) com o software ImmunoSpot. A média do número de células formadoras de “spots” (SFC) foi normalizada para 1 x 10⁶ esplenócitos. Os resultados foram considerados significantes quando a média SFC menos duas vezes o desvio padrão era maior do que a média do “background” mais duas vezes o desvio padrão e quando a média dos peptídeos experimentais foi maior do que 10 SFCs por 10⁶ células.

5.2.12 Análise da resposta humoral por anticorpos neutralizantes através do Teste de Neutralização por Redução de Placas

O teste de neutralização foi realizado pela redução da formação de placas do vírus quimera febre amarela/DENV-3 (YFV-DENV-3, clone #3) em células VERO, como descrito anteriormente (RUSSELL *et al.*, 1967). Após a inativação dos soros dos camundongos (30

min; 56°C), os mesmos foram diluídos em meio MEM contendo 0,25% soro fetal bovino, nas diluições 1:10, 1:20 e 1:40. Em seguida, os soros em cada diluição foram incubados com o vírus quimera YFV-DENV-3, no título de 1×10^{-2} por 60 min, a 37°C. Posteriormente, o inóculo foi adicionado às placas de 6 poços, contendo 3×10^5 células por poço e incubados por 1 hora. Em seguida, o inóculo foi removido e o meio semi-sólido contendo agarose foi adicionado. Após uma incubação de 7 dias, a 37°C, as placas foram fixadas com uma solução de formalina 1:3,6 e a formação de placas virais foi detectada pela coloração com cristal violeta. O teste de neutralização por redução de placas (“Fifty percent plaque reduction neutralization titer PRNT50”) foi definido pela diluição na qual o número de placas foi reduzido em 50% quando comparado com o controle (quimera viral YFV-DENV-3 #3).

5.3 Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra o vírus dengue, utilizando como vetor o replicon do vírus da febre amarela expressando o domínio III do envelope

5.3.1 Cultivo de células

Células BHK-21 foram mantidas em meio MEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL, Gibco), em estufa 37°C com 5% de CO₂. Células HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) serão mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles's Medium*) suplementado com 10% SBF, 1% de 2 mM L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 1% de antibióticos (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL, Gibco), em estufa 37°C com 5% de CO₂.

A linhagem celular para a transcomplementação (célula BHK-YFV-PrM/E) foi mantida em meio MEM suplementado com 10% de SBF, 1% de antibióticos (penicilina 10.000U/mL e estreptomicina 10.000µg/mL, Gibco) e 500 µg/ml da droga de seleção geneticina (Gibco). Para os ensaios de transcomplementação, as células BHK-YFV-PrM/E foram mantidas em meio MEM com 1% de SBF, prevenindo um super crescimento das mesmas.

5.3.2 Construção do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP

Primeiramente, um replicon (pBSC_rep_YFV_17D) de febre amarela foi construído de modo a apresentar uma deleção das proteínas estruturais do vírus da febre amarela, permanecendo apenas 21 aminoácidos da região N-terminal da proteína do capsídeo (uma seqüência de ciclização de RNA necessária para a replicação autônoma do replicon) e 26 aminoácidos da região C-terminal da proteína do envelope (uma seqüência sinal para a proteína NS1) (GIL *et al.*, em fase de elaboração)⁷. Para a construção deste replicon foi utilizado o clone infeccioso do vírus da febre amarela cepa vacinal 17D (pBSC_SP6_YFV-17D), construído a partir do plasmídeo parental (AgeNar-G112-T3/27), gentilmente cedido pelo Dr. Ricardo Galler-FIOCRUZ-RJ. Uma vez construído o replicon pBSC_rep_YFV_17D,

⁷ O replicon referido faz parte dos trabalhos realizados pela Dra. Laura Gil, do Departamento de Virologia e Terapia Experimental, cujos dados ainda não foram publicados.

o sítio de restrição para a enzima *NarI*, localizado entre as porções N-terminal do capsídeo e C-terminal da proteína E, foi utilizado para gerar um *gap* onde foi clonado o gene repórter GFP (*Green Fluorescence Protein*).

A construção do replicon do vírus da febre amarela expressando o gene repórter GFP (pBSC_rep_YFV_EGFP) foi construído através da técnica de recombinação homóloga em levedura, com dois fragmentos: o primeiro fragmento refere-se ao vetor pBSC_rep_YFV_17D digerido com a enzima de restrição *NarI*, seguindo instruções do fabricante. O segundo fragmento, contendo a região referente à seqüência codificante do gene repórter *Green Lantern*, o qual foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo *Green Lantern* (Stratagene), utilizando pares de *primers* específicos. Para 40 µL de reação de PCR foram utilizados 20 µL de tampão de PCR 2x, 3 µL do primer rep_YFV_EGFP-F (5 pmol), 3 µL do primer rep_YFV_EGFP-R (5 pmol), 0,5 µL da enzima Tgo DNA polimerase de alta fidelidade (Roche) e 1 µL do DNA molde (30 ng). As condições da PCR foram: 5min a 94°C, para desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos. Cada ciclo foi composto de 30seg de desnaturação a 94°C, 30seg de anelamento a 55°C, 1min de extensão a 72°C, seguidos de mais 15min finais de extensão.

5.3.3 Construção do replicon pBSC_rep_ΔprM-E_YFV17D

Este replicon do vírus da febre amarela (pBSC_rep_ΔprM-E_YFV17D) foi construído de modo a apresentar uma deleção parcial da proteína de membrana e deleção total da seqüência codificante da proteína do envelope, como mostra a Figura 2. Para a construção do replicon, o vetor pBSC_T7_YFV-17D #2 contendo o clone infeccioso do vírus da febre amarela (o qual foi construído a partir do plasmídeo pBSC_SP6_YFV-17D através da substituição do promotor SP6 pelo promotor T7 de bacteriófagos), foi digerido utilizando os sítios presentes no mesmo para as enzimas de restrição *RsrII* e *NarI* (*New England BioLab_{inc.}*, USA), gerando uma deleção total das proteínas estruturais do vírus da febre amarela, assim como da sua região 5'UTR flanqueante. O *gap* gerado foi utilizado então para clonar de volta as seqüências codificantes do promotor T7 (para transcrição *in vitro*), assim como a região 5'UTR (importante para a replicação autônoma do replicon), o capsídeo e parte da proteína prM do vírus da febre amarela. Todo o capsídeo foi mantido visando abordagens futuras de

trans-empacotamento. Apenas uma pequena seqüência da proteína prM foi mantida para correta clivagem do capsídeo (18pb). A proteína do envelope foi totalmente deletada para dar lugar às seqüências codificantes dos domínios III dos quatro sorotipos do dengue.

A construção do replicon pBSC_rep_ΔprM-E_YFV17D foi realizada através da técnica de recombinação homóloga em levedura, com três fragmentos: o primeiro fragmento refere-se ao vetor pBSC_T7_YFV-17D #2 digerido com as enzimas de restrição NarI e RsrII (*New England BioLab_{inc.}*, USA), seguindo as instruções do fabricante. O segundo fragmento continha a região referente à seqüência codificante do promotor T7 para a RNA polimerase, da região 5'UTR e da proteína estrutural do capsídeo do vírus da febre amarela. O terceiro fragmento apresentava a seqüência codificante de 6 aminoácidos da proteína estrutural de pré-membrana do vírus da febre amarela. O segundo e terceiro fragmentos foram amplificados pela técnica padrão de PCR, a partir do molde de DNA, o plasmídeo pBSC_T7_YFV-17D #2.

Para 20 µL de reação de PCR foram utilizados 10 µL de tampão de PCR 2x, 1,5 µL de cada par de *primer* específico na concentração de 5 pmol, 0,3 µL da enzima Tgo DNA polimerase de alta fidelidade (Roche) e 0,7 µL do DNA molde (30 ng). As condições da PCR foram: 5min a 94°C, para desnaturação inicial, seguidos de 32 ciclos. Cada ciclo foi composto de 30seg de desnaturação a 94°C, 30seg de anelamento a 55°C, 45seg de extensão a 72°C, seguidos de mais 7min finais de extensão.

5.3.4 Construção dos replicons tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D e monovalentes pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4)

Para construir os replicons de febre amarela que expressam o domínio III (DIII) do vírus dengue, duas diferentes abordagens foram utilizadas: a primeira, incluiu a construção de um replicon tetravalente (pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D), o qual expressa os domínios III dos quatro sorotipos do dengue *in tandem*. A segunda abordagem, tratou da construção de quatro replicons monovalentes (pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D), os quais expressam o DIII de cada sorotipo do dengue individualmente (Figura 6B e C).

5.3.4.1 Construção do replicon tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D

A construção do replicon tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D foi realizada através da técnica de recombinação homóloga em levedura com seis fragmentos (1 vetor + 5 insertos), como descrito abaixo:

- a) Vetor- refere-se ao vetor pBSC_T7_YFV-17D #2 digerido com as enzimas de restrição Nar-I e Rsr-II.
- b) Inseto 1- contém a região referente à sequência codificante do promotor T7 para a RNA polimerase, da região 5'UTR, da proteína estrutural do capsídeo e de 6 aminoácidos da proteína de pré-membrana, todos do vírus da febre amarela.
- c) Insetos 2, 3, 4 e 5 - contém cada um a sequência codificante do domínio III do vírus dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4, respectivamente .

Todos os fragmentos de DNA (insertos) contendo o DIII do vírus dengue, amplificados por PCR neste estudo, correspondem aos resíduos 300 a 400 da glicoproteína do envelope de cada um dos quatro sorotipos do vírus dengue. Além da região de 100 aminoácidos da proteína do envelope, também foram mantidos 27pb da proteína não-estrutural NS1 de cada sorotipo equivalente do vírus dengue, para o correto processamento do domínio III, de cada sorotipo. Esta sequência referente a 9 aminoácidos da proteína NS1, foi inserida na construção através dos *primers* específicos que foram utilizados para a recombinação.

A reação de digestão do vetor pBSC_T7_YFV-17D #2 foi realizada, em duplicata, com 8 µL do DNA (2 µg) deste plasmídeo, 1,5 µL da enzima NarI, 1,5 µL da enzima RsrII (*New England Biolabs*, Ipswich, MA) e 2 µL do tampão das mesmas, para um volume final de 20 µL. As condições para as digestões foram de 6h, a 37°C, seguidos de 15min, a 65°C (para inativação das enzimas). Posterior a digestão foi adicionado 1 µL de fosfatase alcalina-CIP (*New England Biolabs*, Ipswich, MA), por 1h, a 37 °C. Os produtos foram mantidos em gelo até a separação eletroforética em gel de agarose.

Todos os insertos (com exceção do vetor) foram amplificados por PCR, utilizando pares de *primers* específicos. Para o inseto 1 foi utilizado como molde de DNA, o plasmídeo pBSC_T7_YFV-17D #2. Para os insertos 2-5, foram utilizados como molde de DNA as quimera virais pBSC_YFV_DENV-1 #2, pBSC_YFV_DENV-2 #1, pBSC_YFV_DENV-3 #1, pBSC_YFV_DENV-4 #2, gentilmente cedidas pela Dra. Laura Gil (Centro de Pesquisas

Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE). Nestas quimeras, a região dos genes que expressam as proteínas prM/E do vírus da febre amarela foram substituídas pela região prM/E do vírus da dengue (GIL *et al.*, em fase de elaboração)⁸.

Para 20 µL de reação de PCR foram utilizados 10 µL de tampão de PCR 2x, 1,5 µL de cada par de *primer* específico na concentração de 5 pmol, 0,3 µL da enzima Tgo DNA polimerase de alta fidelidade (Roche) e 1 µL do DNA molde (30 ng). As condições da PCR foram: 5min a 94°C, para desnaturação inicial, seguidos de 32 ciclos. Cada ciclo foi composto de 30seg de desnaturação a 94°C, 30seg de anelamento a 55°C, 1min e 20seg de extensão a 72°C, seguidos de mais 7min finais de extensão.

Tanto a digestão do vetor como os produtos de PCR de cada inserto amplificado foram avaliados em gel de agarose. As bandas correspondentes aos segmentos necessários a recombinação, foram excisadas do gel e purificadas com o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Posterior a purificação, vetor e insertos foram novamente avaliados em gel de agarose a fim de determinar a concentração necessária do vetor e de cada inserto, para a recombinação.

5.3.4.2 Construção dos replicons monovalentes pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4)

A construção dos replicons monovalentes pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D foi realizada através da técnica de recombinação homóloga em levedura com três fragmentos (1 vetor + 2 insertos), como descrito abaixo:

- a) Vetor- refere-se ao vetor pBSC_T7_YFV-17D #2 digerido com as enzimas de restrição Nar-I e Rsr-II.
- b) Inseto 1- contém a região referente à sequência codificante do promotor T7 para a RNA polimerase, da região 5'UTR, da proteína estrutural do capsídeo e de 6 aminoácidos da proteína de pré-membrana, todos do vírus da febre amarela.

⁸ As quimeras virais fazem parte dos trabalhos realizados pela Dra. Laura Gil, do Departamento de Virologia e Terapia Experimental, cujos dados ainda não foram publicados.

- c) Inseto 2- contém a sequência codificante do domínio III do vírus dengue, de acordo com o sorotipo que constituiria a construção.

Todos os fragmentos de DNA (insetos) contendo o DIII do vírus dengue, amplificados por PCR neste estudo, correspondem aos resíduos 300 a 400 da glicoproteína do envelope de cada um dos quatro sorotipos do vírus dengue. Neste caso, ao contrário da construção tetravalente, a região que se refere aos 27 pb da proteína não-estrutural NS1 para o correto processamento do DIII de cada sorotipo, não foi inserida por *primers*. Para este propósito, utilizamos a mesma região referente na proteína NS1 do vírus da febre amarela que flanqueia o domínio III nas construções monovalentes.

A reação de digestão do vetor pBSC_T7_YFV-17D #2 foi realizada, em duplicata, com 8 µL do DNA (2 µg) deste plasmídeo, 1,5 µL da enzima *NarI*, 1,5 µL da enzima *RsrII* (*New England Biolabs*, Ipswich, MA) e 2 µL do tampão das mesmas, para um volume final de 20 µL. As condições para as digestões foram de 6h, a 37°C, seguidos de 15min, a 65°C (para inativação das enzimas). Posterior a digestão foi adicionado 1 µL de fosfatase alcalina-CIP (*New England Biolabs*, Ipswich, MA), por 1h, a 37 °C. Os produtos foram mantidos em gelo até a aplicação em gel de agarose.

Os insetos 1 e 2 foram amplificados por PCR, utilizando pares de *primers* específicos. Para o inseto 1 foi utilizado como molde de DNA, o plasmídeo pBSC_T7_YFV-17D #2. Para o inseto 2, foram utilizados como molde de DNA (de acordo com a construção a ser realizada) as quimeras virais pBSC_YFV_DENV-1 #2, pBSC_YFV_DENV-2 #1, pBSC_YFV_DENV-3 #1, pBSC_YFV_DENV-4 #2, já descritas acima.

Para 20 µL de reação de PCR foram utilizados 10 µL de tampão de PCR 2x, 1,5 µL de cada par de *primer* específico na concentração de 5 pmol, 0,3 µL da enzima Tgo DNA polimerase de alta fidelidade (Roche) e 1 µL do DNA molde (30 ng). As condições da PCR foram: 5min a 94°C, para desnaturação inicial, seguidos de 32 ciclos. Cada ciclo foi composto de 30seg de desnaturação a 94°C, 30seg de anelamento a 55°C, 1min e 20seg de extensão a 72°C, seguidos de mais 7min finais de extensão.

Tanto a digestão do vetor como os produtos de PCR de cada inseto amplificado foram avaliados em gel de agarose. As bandas correspondentes aos segmentos necessários a recombinação, foram excisadas do gel e purificadas com o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Posterior a purificação, vetor e insetos

foram novamente avaliados em gel de agarose a fim de determinar a concentração necessária do vetor e de cada inserto, para as recombinações.

Todos os pares de *primers* utilizados para a realização das construções tetra e monovalentes estão descritos nos Quadros 13-15.

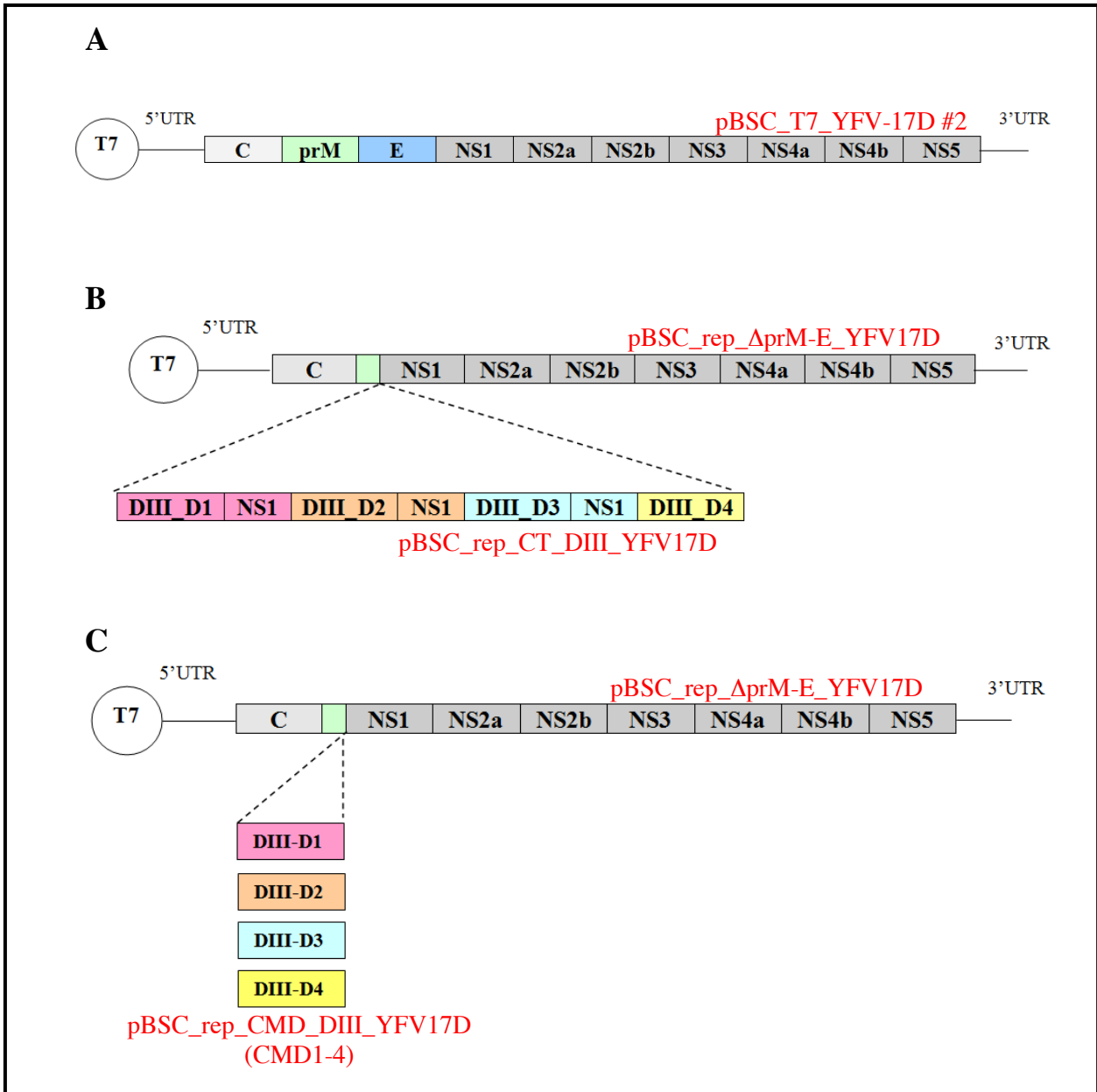


Figura 6- Diagrama esquemático da estratégia de construção dos replicons tetravalente e monovalentes.

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A) genoma total do vírus da febre amarela, (B) replicon pBSC_rep_AprM-E_YFV17D expressando o domínio III dos sorotipos dengue clonados *in tandem* (construção tetravalente) e (C) replicon pBSC_rep_AprM-E_YFV17D expressando o domínio III dos sorotipos dengue clonados individualmente (construções monovalentes).

Construção Tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D		
Fragmentos	Primers	Sequência
Insero 1	pBSC-RsrII-T7-5'YFV-F	CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTCGGTCCGTAATACGACTCACTATAGAGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGG
	prM _{Cap} -R	TTTCCGCACCAAGGTCCTC
Insero 2	D1DIII-F	CGGTGGAGTGACCTTGGTGCGGAAATCATATGTGATGTGCACAGGC
	D1Tet-R	CTTCCAGTTGATTACGCATCCCGAGTCCGCTTGAACCATGACTCCTAG
Insero 3	D2Tet-F	GACTCGGGATGCGTAATCAACTGGAAGTCTATGTGTACAGGAAAGTTTAA
	D2Tet-R	TTTCCAGCTCACGACGCAACCACTATCAGCCTGCACCATAGCTCCC
Insero 4	D3Tet-F	GATAGTGGTTGCGTCGTGAGCTGGAAATGCACGAATACCTTTGTGTTG
	D3Tet-R	TTTCCAATTTATAACACAGCCCATGTCAGCTTGCACCACAGCTCCC
Insero 5	D4Tet-F	GACATGGGCTGTGTTATAAATTGAAAACGATGTGTTTCAGGAAAGTTTT
	YFV-2980-R	CAGTCTATGGTGTATTCAAAG

Quadro 13- Lista dos pares primers específicos utilizados para a construção do replicon tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D.

Fonte:Dados da autora.

Construção Monovalente pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D		
Fragmentos	Primers	Sequência
Insero 1	pBSC-RsrII-T7-5' YFV-F	CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTCGGTCCGTAATACGACTCACTATAGAGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGG
	prM _{Cap} -R	TTTCCGCACCAAGGTCCTC
Insero 2	D1DIII-F	CGGTGGAGTGACCTTGGTGCGGAAATCATATGTGATGTGCACAGGC
	D1DIII-R	CAAAGTTGATGGCGCATCCTTGATCCGCTTGAACCATGACTCCTAG
Construção Monovalente pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D		
Fragmentos	Primers	Sequência
Insero 1	pBSC-RsrII-T7-5' YFV-F	CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTCGGTCCGTAATACGACTCACTATAGAGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGG
	prM _{Cap} -R	TTTCCGCACCAAGGTCCTC
Insero 2	D2DIII-F	CGGTGGAGTGACCTTGGTGCGGAAATCTATGTGTACAGGAAAGTTTAA
	D2DIII-R	CAAAGTTGATGGCGCATCCTTGATCAGCCTGCACCATAGCTCCC

Quadro 14- Lista dos pares primers específicos utilizados para a construção dos replicons monovalentes pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D.

Fonte:Dados da autora.

Construção Monovalente pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D		
Fragmentos	<i>Primers</i>	Sequência
Insero 1	pBSC-RsrII-T7-5' YFV-F	CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTCGGTCCGTAATACGACTCACTATAGAGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGG
	prM _{Cap} -R	TTTCCGCACCAAGGTCCTC
Insero 2	D3DIII-F	CGGTGGAGTGACCTTGGTGCGGAAATGCACGAATACCTTTGTGTTG
	D3DIII-R	CAAAGTTGATGGCGCATCCTTGATCAGCTTGCACCACAGCTCCC
Construção Monovalente pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D		
Fragmentos	<i>Primers</i>	Sequência
Insero 1	pBSC-RsrII-T7-5' YFV-F	CAAGCATGTAAATATCGTTTGAGTTCGGTCCGTAATACGACTCACTATAGAGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGG
	prM _{Cap} -R	TTTCCGCACCAAGGTCCTC
Insero 2	D4DIII-F	CGGTGGAGTGACCTTGGTGCGGAAAACGATGTGTTTCAGGAAAGTTTC
	YFV-2980-R	CAGTCTATGGTGTATTCAAAG

Quadro 15- Lista dos pares primers específicos utilizados para a construção dos replicons monovalentes pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D.

Fonte:Dados da autora.

5.3.5 Recombinação homóloga em levedura

Como citado anteriormente, todas as construções deste estudo foram realizadas através da técnica de recombinação homóloga em levedura. Para isto, uma colônia da linhagem RFY206 (FINLEY; BRENT, 1994) de *Saccharomyces cerevisiae* foi crescida em 5 mL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*), a 30°C, O/N. No dia seguinte, foi preparado um inóculo com uma densidade óptica (*Optical Density*, OD) de 0,2 em meio YPD. Este inóculo foi então incubado a 30°C até alcançar uma OD de 0,55. As células foram então coletadas por centrifugação, lavadas uma vez com ddH₂O e transformadas por acetato de lítio (LiOAc), como descrito anteriormente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Sucintamente, o *pellet* foi ressuspensão na solução 1X TE/LiOAc (TE-Tris 1M pH 7,5, EDTA 0,5M/LiOAc-acetato de lítio 1M), em um volume de acordo com o número de recombinações a serem realizadas e distribuído em 1 mL por tubo. As células foram concentradas por centrifugação e lavadas mais uma vez com a mesma solução. Em outro tubo foi adicionado o vetor digerido (200 ng), cuja concentração foi estipulada por gel de agarose de acordo com a concentração do inserto de escolha, de modo que a concentração do último fosse 10 vezes maior que a concentração do vetor. A este tubo, foram adicionados também 30 µg do DNA carreador *Salmon Sperm* (Invitrogen), 2 µL 1x TE (Tris 1M pH 7,5, EDTA 0,5M), 2 µL 1x LiOAc (1M) e o inserto na concentração apropriada (2 µg). Como controle, a mesma reação foi repetida em outro tubo, adicionando água no lugar do inserto.

As reações dos tubos de recombinação e controle foram misturadas às leveduras competentes presentes em outros tubos e em seguida foram adicionados aos mesmos, 140 µL da solução 1x TE/LiOAc/PEG (TE-Tris 1M pH 7,5, EDTA 0,5M/LiOAc-acetato de lítio 1M/PEG-3350 50%). A suspensão foi homogeneizada e incubada a 30°C, por 40min. Após o tempo de incubação, foi adicionado aos tubos 20 µL de DMSO (dimetilsulfóxido). A suspensão foi levemente homogeneizada e incubada a 42°C, por 20min. Por fim, as leveduras foram coletada por centrifugação e o *pellet* (sedimento) ressuspensão em uma solução de 500 µL de aminoácidos sem triptofano. A suspensão foi plaqueada em placas contendo meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) na ausência de triptofano (YNB [-Trp]) e incubadas a 30°C por 3 dias.

5.3.6 Extração de DNA plasmideal de levedura

Colônias positivas foram selecionadas e crescidas em 5 mL de meio YNB (-Trp) a 30°C, O/N. Este pré-inóculo foi diluído em 500 mL de meio YNB (-Trp) e crescido a 30°C por 2 dias. Após o período de incubação, as células foram concentradas por centrifugação e lavadas uma vez com ddH₂O. O *pellet* (sedimento) foi ressuspensão em 4 mL de tampão SCE (1M Sorbitol, 100mM NaAC e 60 mM EDTA). Em seguida, 50 µL de zimolase (200 mg/mL) e 30 µL de β-mercaptoetanol foram adicionados. As células foram incubadas a 37°C por 2h e depois concentradas por centrifugação. A partir desta etapa, a extração de DNA plasmideal foi realizada utilizando o kit Plasmid Midi (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA extraído foi então utilizado para as etapas seguintes de seqüenciamento e síntese de RNA.

5.3.7 Confirmação das clonagens por PCR e seqüenciamento

Todas as construções realizadas foram verificadas quanto à eficiência da clonagem pela técnica padrão de PCR, utilizando *primers* específicos para cada construído.

Os três clones selecionados da construção do plasmídeo tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D, foram seqüenciados para a confirmação da identidade dos genes clonados e fusionados. As reações de seqüenciamento foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas-NPT, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE, através da utilização do kit ABI BigDye *terminator cycle sequencing* e do seqüenciador ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). A análise das seqüências foi realizada através do programa Lasergene (DNA Star, Inc, Madison, WI). Os mapas das seqüências dos plasmídeos construídos foram adquiridos através do programa ApE-A plasmid Editor v1.10.4.

5.3.8 Síntese de RNA e caracterização do replicon *in vitro*

5.3.8.1 PCR do genoma completo do replicon

A amplificação completa do genoma de cDNA do replicon foi realizada em uma reação de 50 μ l utilizando a enzima KlenTaq-LA (Clontech). A reação foi composta de 100 ng de plasmídeo DNA (miniprep de levedura), 1X do tampão KlenTaq-LA, 1,3% DMSO, 0,4 M betaína (Sigma), 200 μ M de cada dNTP (*Invitrogen*), 1U KlenTaq-LA polymerase e 5 pmol dos pares de *primers* específicos. As condições de amplificação foram: 5min a 95°C para desnaturações iniciais, seguidas de 32 ciclos, cada ciclo composto de 1min de desnaturação a 93°C, 1min de anelamento a 56°C, 11min de extensão a 72°C e 20min finais de extensão a 72°C.

5.3.8.2 Transcrição *in vitro*

Para a transcrição do genoma completo do replicon, o produto da PCR descrita acima foi purificado com fenol-clorofórmio, seguido da precipitação com etanol. A transcrição foi mediada pelo promotor T7. Os RNAs de cada construção foram produzidos utilizando o kit *T7 MEGAscript in vitro transcription* (Ambion), com adição do análogo ao cap tipo I (7-metil-guanosina, Ambion), seguindo as recomendações do fabricante.

5.3.8.3 Transfecção do RNA em células BHK-21 por eletroporação

Para a eletroporação de célula BHK-21 com os RNAs dos construídos, 2×10^6 células foram ressuspensas em 100 μ L de tampão *cytomix* (ANSARI *et al.*, 2004) e a suspensão de células foi misturada com cerca de 5 μ g de RNA transcrito *in vitro*. A eletroporação foi feita em cuvetas de 2 mm, seguindo as seguintes condições para o eletroporador ECM-830 (BTX): 500 V (voltagem), 99 μ seg (duração do pulso), 5 pulsos com intervalo de 1seg entre os pulsos.

Após a transfecção, as células foram transferidas em meio MEM completo (10% de SBF e 1% de antibióticos) e observadas através de ensaio de imunofluorescência com 24, 48 e 72h, para avaliar a eficiência de transfecção e a expressão dos replicons construídos.

5.3.8.4 Imunofluorescência indireta

Para análise da expressão dos replicons, as células BHK-21 foram analisadas através do ensaio de imunofluorescência indireta para detecção da proteínas estruturais e não-estruturais presentes no vírus da febre amarela. Resumidamente, 24, 48 e 72 horas após a transfecção, as lamínulas contendo as células transfectadas foram retiradas das placas, lavadas com tampão PBS 1X e as células presentes nas mesmas fixadas em metanol gelado 100%. As lamínulas foram então fixadas com esmalte em lâmina para microscópio e incubadas com o anticorpo primário diluído 1:100, o fluido ascítico hiperimune anti-flavivirus do grupo B (que marca as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da febre amarela), gentilmente cedido pelo Dr. Pedro Vasconcelos (Instituto Evandro Chagas-IEC, Ministério da Saúde, Belém-PA). Em seguida, a lâmina foi lavada duas vezes com PBS 1X (10 minutos de incubação para cada lavagem) e incubada durante 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, produzido em caprino e conjugado ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína-FITC, 1mg/mL (Sigma, St. Louis, MO), na diluição 1:100. Por fim, a lâmina foi novamente lavada como descrito acima, contra-corada com o corante azul de Evans (0,01%) por 1 min, montada com glicerol tamponado e selada com uma lamínula. A microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o microscópio Leica DMI 4000B. Os campos analisados foram escolhidos de acordo com a dispersão e morfologia das células.

Como controle positivo da técnica de transfecção, foram utilizadas lamínulas com células BHK-21 transfectadas (no mesmo momento das transfecções com os replicons), com o RNA transcrito *in vitro* do vírus da febre amarela cepa vacinal 17D (plasmídeo pBSC_T7_YFV-17D #2). Como controle positivo da reação de imunofluorescência indireta, foram utilizadas *coverslips* com células BHK-21 infectadas com o vírus da febre amarela. Como controle negativo para a mesma reação, foram utilizadas lamínulas contendo células BHK-21 (não infectadas ou transfectadas).

5.3.9 Trans-complementação e produção de VLPs

O *trans*-empacotamento foi realizado em células de trans-complementação (293-YFV-PrM/E) previamente desenvolvidas em nosso laboratório (ALMEIDA *et al*, dados não publicados. A linhagem celular 293-YFV-PrM/E expressa as proteínas estruturais prM e E do vírus da febre amarela, permitindo o empacotamento *in trans* do replicon que apresenta deleção destas proteínas estruturais, mas que mantém a seqüência codificante do capsídeo e das proteínas não estruturais do mesmo vírus (item 5.3.4, Figura 2). Caso houvesse empacotamento dos replicons construídos neste trabalho, haveria a formação de VLPs (*Virus Like Particles*), as quais poderiam ser coletadas no sobrenadante de células desta linhagem, transfectadas. Os ensaios visando a trans-complementação foram então realizados utilizando 4 μ g do RNA transcrito *in vitro*, das construções monovalentes e tetravalentes, utilizando o kit *PolyFect® Transfection Reagent* (QiAGEN, Valencia, CA), seguindo as instruções do fabricante. Como controle positivo da transfecção, foram utilizadas células 293-YFV-PrM/E transfectadas (no mesmo momento das transfecções com os replicons), com o RNA transcrito *in vitro* do vírus da febre amarela cepa vacinal 17D (plasmídeo pBSC_T7_YFV-17D #2). Como controle negativo para a mesma reação, foram utilizadas células 293-YFV-PrM/E não-transfectadas (células *mock*).

Resumidamente, placas de 6 poços (15 mm de diâmetro) foram cultivadas com 6 x 10⁵ células 293-YFV-PrM/E por poço, durante 24 horas. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução contendo meio de cultivo DMEM com 10% de soro bovino fetal, 4 μ g do RNA de cada construído e 8 μ l de *PolyFect Transfection Reagent*. Após 48 e 72 horas pos-transfecção, o sobrenadante foi coletado e passado para células HEK-293 (em placas de 6 poços, contendo 4 lamínulas por poço), para análise da infecção por imunofluorescência indireta, 72 horas após infecção.

5.3.10 Aspectos éticos

O referido projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa, o qual avaliou que o mesmo não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, resolução CNS 196/196, tendo parecer número 16/2009.

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA, lei número 6.638 de oito de maio de 1979. Os experimentos com animais foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal-CEUA-CPqAM/Fiocruz, cuja licença de uso segue o número de protocolo pra projeto anteriormente aprovado em nosso laboratório: CEUA: L-013/06.

6 RESULTADOS

6.1 Desenvolvimento de uma vacina de DNA contra o vírus dengue sorotipo 3 utilizando epítomos de células B e T mapeados

6.1.1 Análise da imunogenicidade em camundongos imunizados com epítomos humanos de célula B mapeados na glicoproteína do envelope do DENV-3

A construção desta vacina de DNA foi baseada em epítomos de células B e T previamente identificados, utilizando as técnicas de ELISA e de ELISPOT, respectivamente, como citado anteriormente (ver metodologia item 5.2.2).

Antes de partirmos para o desenvolvimento desta vacina, os 11 epítomos de célula B anteriormente mapeados e que se encontram distribuídos em cinco regiões ao longo da proteína do envelope do DENV-3, foram testados quanto à imunogenicidade em camundongos Balb/c. No intuito de identificar se estas regiões eram capazes de eliciar resposta imune em modelo animal, os camundongos foram imunizados com os peptídeos referentes a cada região e as respostas imunes humoral e celular foram analisadas (SILVA *et al.*, 2009). A Figura 7 mostra o nível total de anticorpo do tipo IgG em diferentes diluições para cada região após a primeira dose (*priming*) ou após dose reforço (*boosting*). Como observado, as regiões 51-65 (Figura 7A), 131-170 (Figura 7C) e 196-210 (Figura 7D) elicitaram resposta do tipo IgG após ambos os pontos analisados (primeira dose e dose reforço), enquanto a região 246-260 (Figura 7E) elicitou resposta apenas após dose reforço. A magnitude da produção de IgG (após *priming*) parece seguir a seguinte ordem: 51-65>131-170>196-210>246-260. A região 71-90 foi a única que não elicitou resposta por IgG em modelo animal.

A produção de interferon gama (IFN- γ) por esplenócitos totais, células T CD4⁺ e CD8⁺ *enriched*, também foi avaliada através da técnica de ELISPOT nos animais imunizados e nos controles. Dentre as regiões analisadas, os epítomos 131-170, 196-210 e 246-260, elicitaram produção elevada de IFN- γ por esplenócitos totais. Ensaios de depleção revelaram que a resposta celular era exclusivamente de células TCD4⁺ (Figura 8).

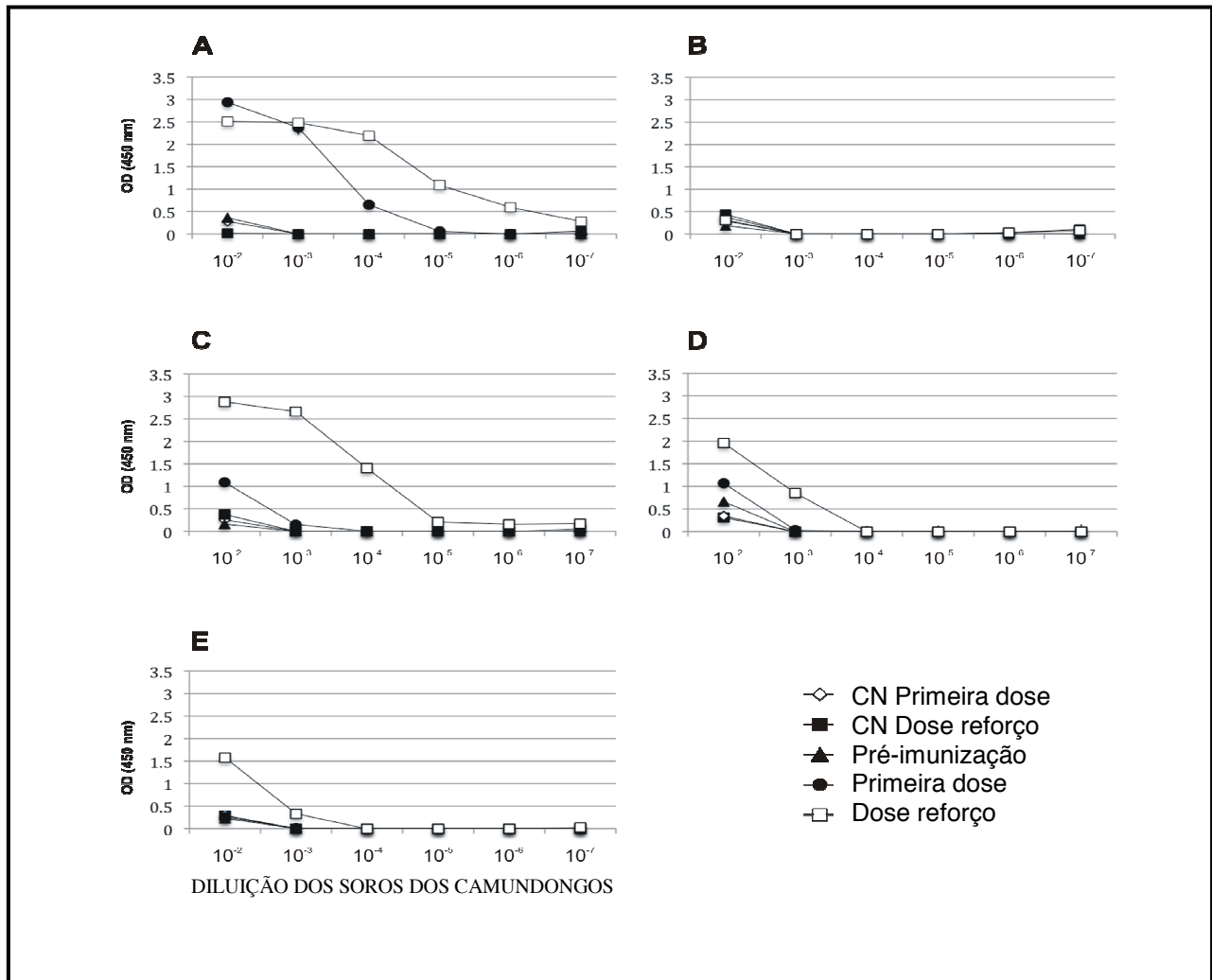


Figura 7- Produção total de IgG em camundongos Balb/c elicitada por epítomos do envelope do DENV-3. **Fonte:** Silva *et al.* (2009).

Nota: Regiões: (A) 51-65, (B) 71-90, (C) 131-170, (D) 196-210 e (E) 246-260. Camundongos Balb/c foram imunizados duas vezes (primeira dose- *priming* e dose reforço- *boosting*) com os diferentes epítomos e a resposta imune humoral foi analisada através do ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) após a primeira dose e após a dose reforço, em diferentes concentrações dos soros. CN=Controle Negativo.

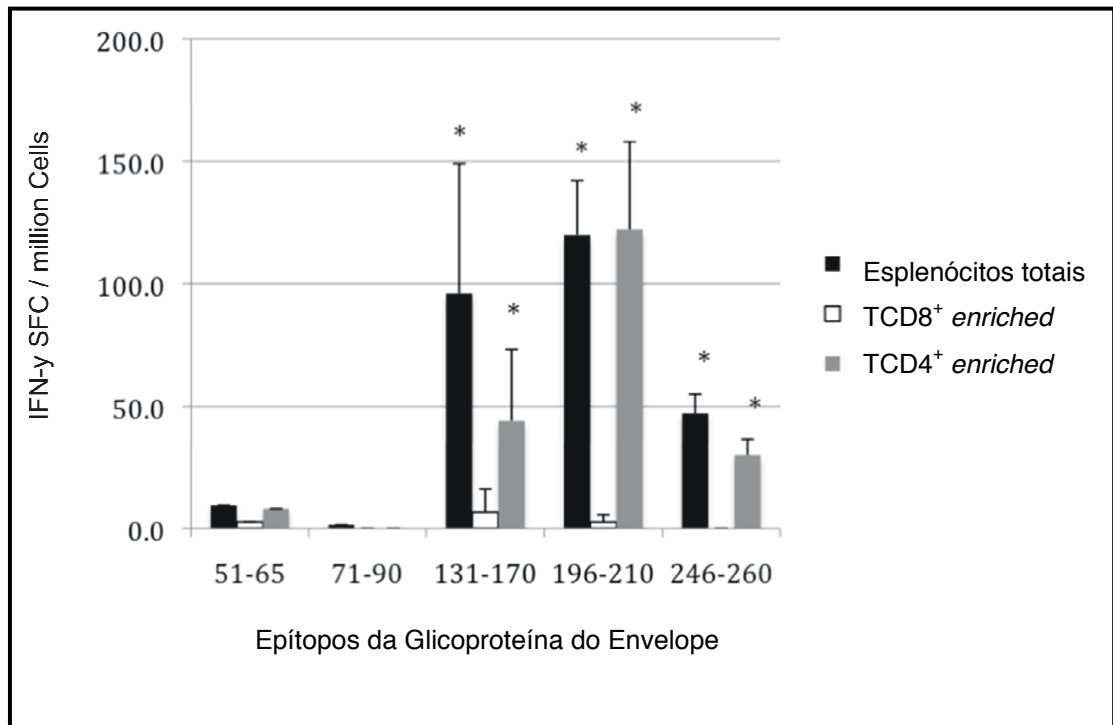


Figura 8- Resposta imune celular elicitada em camundongos Balb/c imunizados com epítos do envelope do DENV-3.

Fonte: Silva *et al.* (2009).

Nota: A resposta de células T foi avaliada utilizando esplenócitos totais coletados de camundongos Balb/c imunizados, assim como células TCD4⁺ *enriched* (células TCD8⁺ depletadas) e células TCD8⁺ *enriched* (células TCD4⁺ depletadas). A análise foi realizada através de ELISPOT (*Enzyme Linked Immunosorbent Spot*) para as regiões: 51-65, 71-90, 131-170, 196-210 e 246-260. Em asterístico (*) estão os grupos considerados positivos, baseado no seguinte critério: a média das Células Formadoras de *Spots*- SFC menos duas vezes o desvio padrão, era maior do que a média do “background” mais duas vezes o desvio padrão e a média dos peptídeos experimentais era maior do que 10 SFCs por 10⁶ células. O resultado mostrado consiste na média e desvio padrão de dois diferentes camundongos.

6.1.2 Montagem da estratégia vacinal utilizando epítomos de célula B e T mapeados

Uma vez que os epítomos de célula B foram capazes de elicitar resposta imune significativa através da imunização em camundongos Balb/c, partimos para a montagem da estratégia vacinal, adicionando à mesma epítomos de célula T que também haviam sido mapeados em nosso laboratório, como descrito na metodologia. Após as análises, a construção vacinal foi realizada pelo agrupamento de dezesseis epítomos, incluindo sete epítomos identificados na proteína do envelope (sendo um deles epítomo comum de célula B e T), quatro em NS1 e cinco em NS3 (Quadro 16).

6.1.3 Otimização dos códons para expressão em células eucariotas

Para uma melhor expressão da proteína em células eucarióticas foi realizada a otimização da sequência de DNA dos epítomos selecionados, utilizando o software Leto 1.0 (Entelechon, versão 1.0.11), visando aumentar a eficiência da expressão dos mesmos. As mudanças realizadas na sequência original dos epítomos incluíram: a frequência dos sítios de restrição escolhidos ao longo da sequência, a diminuição do número de estruturas secundárias, a análise do conteúdo de GC e a diminuição dos sítios de *splicing*. Estes e outros parâmetros modificados na sequência original, assim como a nova sequência gerada que foi utilizada para síntese, estão descritos no Anexo A.

Proteína	Epítopo	Seqüência final
E	B e T	<u>OKTEA</u> TQLATLRKLCIEGKITNITTTDSRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYVDRG WNGC <u>GLFGK</u>
E	B	<u>EGKVV</u> QYENLKYTVIITVHTGDQHQVGNETQGVTAETPQASTTE <u>AILPE</u>
E	B	<u>FNEMI</u> LLTMKNKAWMVHRQW <u>FFDLP</u>
E	B	<u>HAKKQ</u> EVVVLGSQEGAMHT <u>ALTGA</u>
E	T	<u>LKCRL</u> KMDKLELKGMSYAMCTNTFVLKKEV <u>SETQH</u>
E	T	<u>TANPV</u> VTKKEEPVNIEAEP <u>FGESN</u>
E	T	<u>WVMKI</u> GIGVLLTWIGLNSKNTSMSFSCIAIGIITLYLGAVVQ <u>ADMGCV</u>
NS1	T	<u>ADSPK</u> RLATAIAGAWENGVCGIRSTTRMENLLWKQIANELNYILWENNIKLTVVV GDIIGVL EQGKRTLTPQPMELKYSWKTWGKAKIVTAETQNSSFI <u>DGPNT</u>
NS1	T	<u>WLKLR</u> EVYTLQCDHRLMSAAVKDERAVHADMG <u>YWIES</u>
NS1	T	<u>WSNGV</u> LESDMIIPKSLAGPISQHNHRPGYHTQTAGP <u>WSNGV</u>
NS1	T	<u>CEGTT</u> VVITENCGTRGPSLRRTTVSGKLIHEWCCRSCSLPPLRYMGEDGCWYGME <u>IRPISE</u>
NS3	T	<u>RLSAQ</u> WQKGEEVQVIAVEPG <u>KNPKN</u>
NS3	T	<u>PDGPT</u> PELEEEEMFKKRNLTIMDLHPGSG <u>KTRKY</u>
NS3	T	<u>SPVRV</u> PNYNLIIMDEAHFTDPASIAARG <u>YISTR</u>
NS3	T	<u>LRKNG</u> KKVIQLSRKTFDTEYQKTKLNDWDFVVTDDISEMGANFKADRVIDPR <u>RCL</u> <u>KP</u>
NS3	T	<u>LNNDE</u> DHAHWTEAKMLLDNINTPEGIIPALFEPEREKSAAIDGEYRLKGESRKTF VELMR <u>RGDLP</u>

Quadro 16- Seqüências finais dos epítomos para síntese.

Fonte: Dados da autora.

Nota: Os resíduos flanqueantes a estas regiões destacam-se em vermelho sublinhado. E=epítopo presente na proteína do envelope; NS1= epítopo presente na proteína não estrutural NS3=epítopo presente na proteína não-estrutural NS3; B= refere-se aos epítomos de célula B e T= refere-se aos epítomos de célula T.

6.1.4 Construção dos vetores p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit: confirmação da fusão dos genes clonados

6.1.4.1 Digestão enzimática

Para confirmação do sucesso da clonagem, cinco clones de cada um dos plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit foram digeridos, respectivamente, com as enzimas de restrição XhoI /EcoRI e NheI/KpnI. Todos os cinco clones selecionados para cada uma das duas construções realizadas, liberaram fragmentos com tamanhos esperados de 5,7 pb e 2,1 pb para p43_DENV3_epit_LAMP, e 4,4 pb e 2,2 pb para p43_DENV3_epit. Como controle da digestão enzimática foi utilizado o vetor p43-HIVhumanLAMP/Gag, o qual gerou fragmentos de 3,8 pb e 1,5 pb quando digerido com as enzimas XhoI /EcoRI e de 2,7 pb e 2,5 pb quando digerido com as enzimas NheI/KpnI (Figura 9 A e B). O clone 1 de cada construído foi selecionado para dar continuidade aos estudos seguintes, por isso, os ensaios que seguem foram realizados com os plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP #1 e p43_DENV3_epit #1.

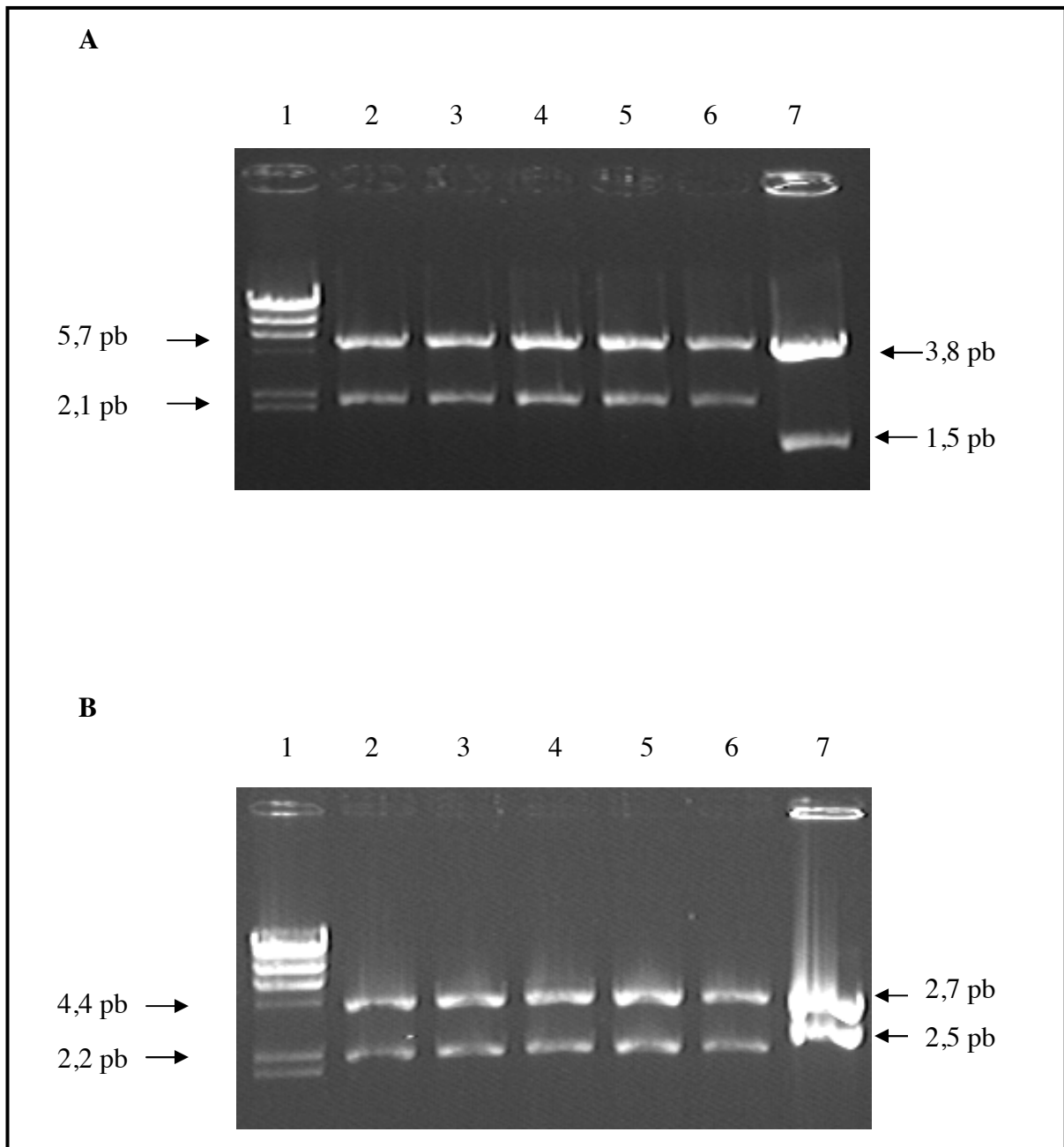


Figura 9- Confirmação das clonagens por digestão enzimática.

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A) p43_DENV3_epit_LAMP, clones 1 a 5 (colunas 2 a 6, respectivamente) (B) p43_DENV3_epit, clones 1 a 5 (colunas 2 a 6, respectivamente). Como marcador de peso molecular (coluna 1) foi utilizado o Lambda DNA-Hind III (Invitrogen, Carlsbad, CA). Como controle positivo da digestão (coluna 7) foi utilizado o plasmídeo p43-HIVhumanLAMP/Gag -(A) e (B).

6.1.4.2 Sequenciamento

O clone 1 selecionado de cada uma das construções foi submetido ao sequenciamento para confirmar a qualidade e identidade dos genes clonados e fusionados ao LAMP. A análise dos alinhamentos dos produtos sequenciados mostrou que não houve mutação em nenhuma das construções realizadas (p43_DENV3_epit_LAMP #1 e p43_DENV3_epit #1). Após a aquisição das seqüências foram construídos os mapas virtuais para cada plasmídeo, como ilustrado na Figura 10.

6.1.5 Análise da expressão de LAMP do construído p43_DENV3_epit_LAMP em células BHK-21 e COS-1

Uma vez confirmada a identidade dos construídos, a expressão do gene da proteína LAMP fusionada aos epítomos de DENV3 no plasmídeo p43_DENV3_epit_LAMP foi analisada através de ensaio de imunofluorescência indireta. Para isso, células COS-1 e BHK-21, as quais não apresentam a expressão endógena do LAMP-1 humano, foram transfectadas com os construídos e posteriormente utilizadas para os ensaios de imunofluorescência indireta. Como controles positivo e negativo, foram utilizados os plasmídeos p43-HIVhumanLAMP/Gag e o vetor vazio p43.2, respectivamente. O sucesso da expressão da proteína LAMP plasmideal foi observada para os plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP#1 e p43-HIVhumanLAMP/Gag através da emissão de fluorescência em células COS-1 e BHK-21, transfectadas com cada um destes plasmídeos. Como esperado, o controle negativo e o plasmídeo p43_DENV3_epit #1, os quais não possuem o gene da proteína LAMP, não apresentaram fluorescência. Os resultados podem ser vistos nas Figuras 11 e 12.

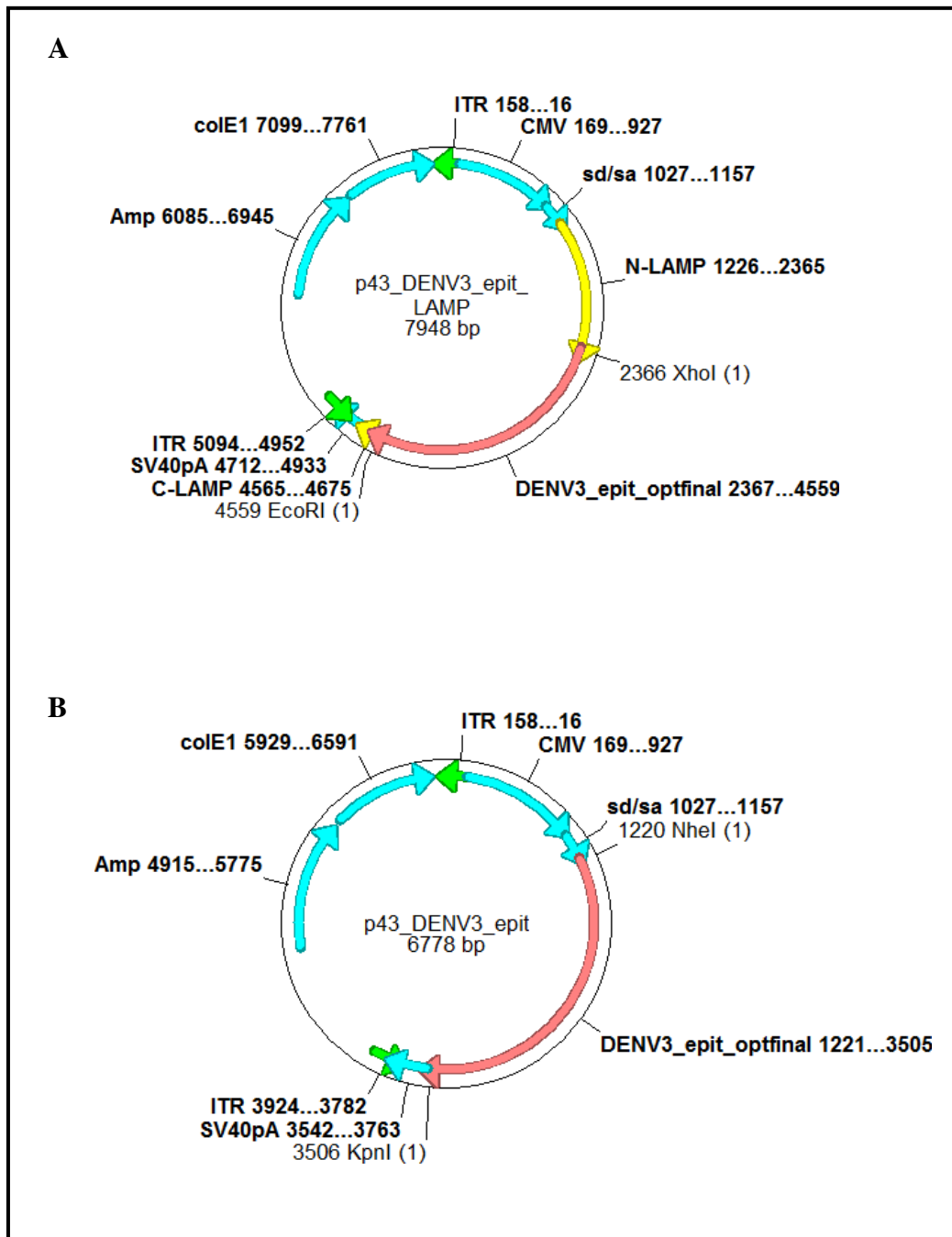


Figura 10- Mapas dos plasmídeo p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit.

Fonte: Dados da autora.

Nota: **A.** Plasmídeo p43_DENV3_epit_LAMP, **B.** Plasmídeo p43_DENV3_epit. ITR- repetição terminal invertida, CMV- promotor; N-LAMP- região N-terminal de LAMP; C-LAMP- região terminal de LAMP; DENV-3_epit- sequência final otimizada dos epítomos selecionados; Amp- marca de resistência à ampicilina, XhoI, EcoRI, NheI, KpnI- sítios para enzimas de restrição, SV40pA- sinal de poliadenilação do vírus SV40.

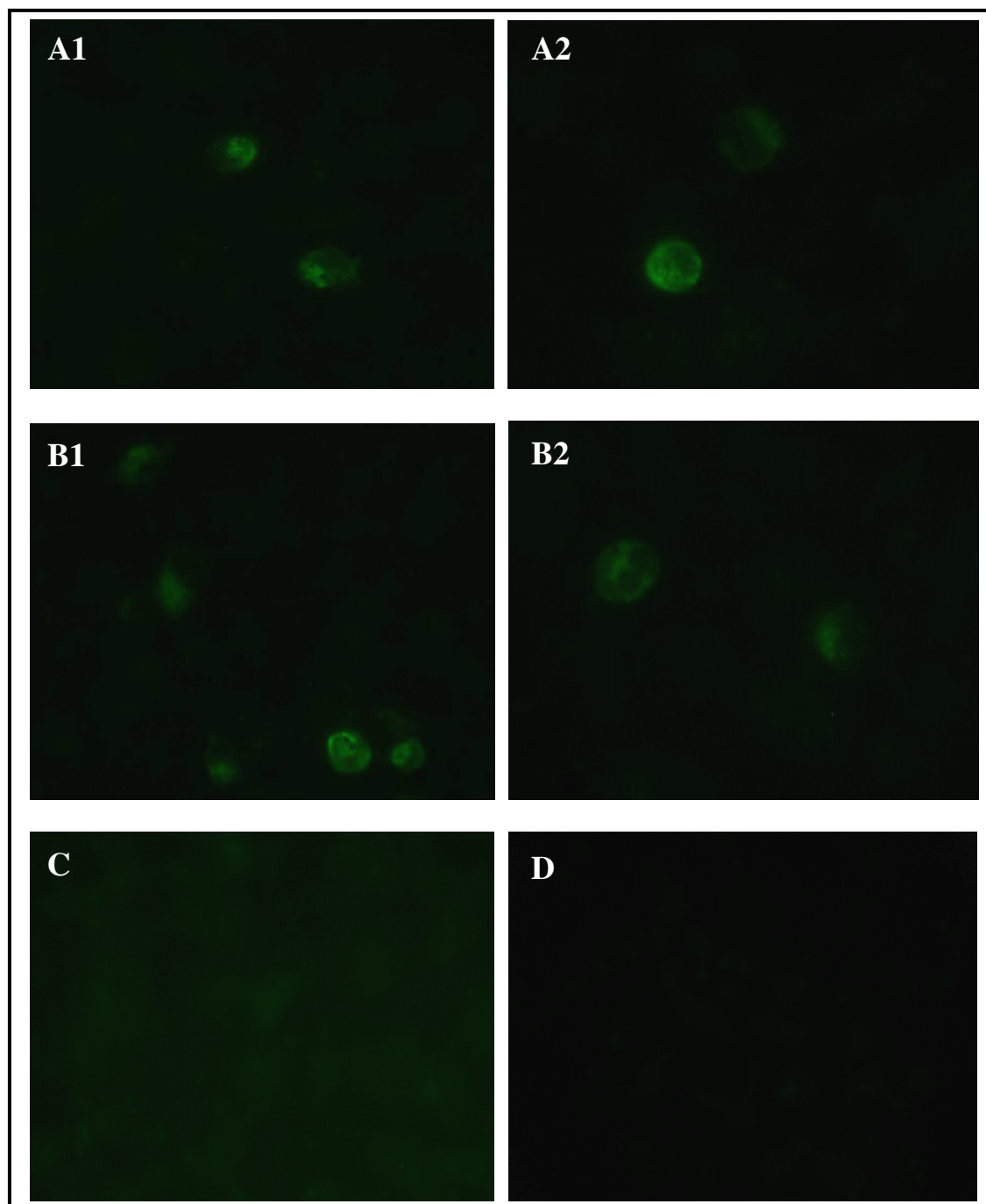


Figura 11- Expressão dos construídos vacinais em células COS-1 transfectadas, avaliadas através de imunofluorescência utilizando anticorpos que reconhecem a proteína LAMP-1.

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A1 e 2) p43_DENV3_epit_LAMP #1 (B1 e 2) p43-HIVhumanLAMP/Gag, controle positivo (C) p43_DENV3_epit #1 e (D) p43.2, controle negativo. A melhor marcação no ensaio de imunofluorescência indireta para células COS-1 foi vista utilizando-se o anticorpo E-5, 48 horas após transfecção. Aumento: 630x em óleo de imersão.

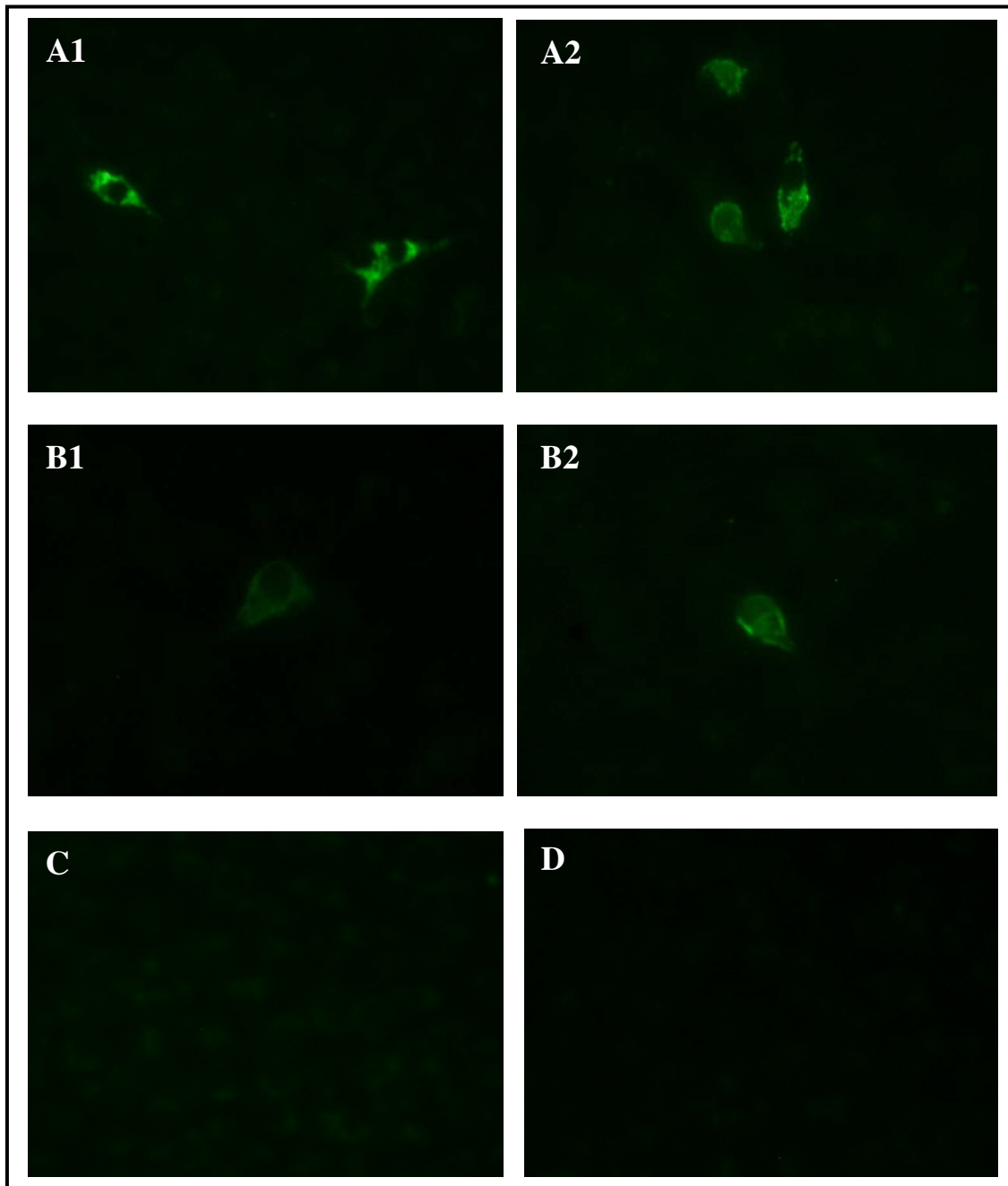


Figura 12- Expressão dos construídos vacinais em células BHK-21 transfectadas, avaliadas através de imunofluorescência utilizando anticorpos que reconhecem a proteína LAMP-1

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A1 e 2) p43_DENV3_epit_LAMP #1 (B1 e 2) p43-HIVhumanLAMP/Gag, controle positivo (C) p43_DENV3_epit #1 e (D) p43.2, controle negativo. A melhor marcação no ensaio de imunofluorescência indireta para células BHK-21 foi vista utilizando-se o anticorpo H4A3, 48 horas após transfecção. Aumento: 630x em óleo de imersão.

6.1.6 Avaliação da resposta imune humoral em camundongos Balb/C imunizados com os construídos p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit

Os plasmídeos referentes a cada construído vacinal p43_DENV3_epit_LAMP, p43_DENV3_epit foram utilizados para a imunização de camundongos Balb/C. Como controle, foi utilizado o vetor vazio p43.2. A análise da resposta imune humoral dos camundongos imunizados foi realizada através do teste de neutralização por redução de placas (PRNT). Os testes indicaram que os construídos vacinais não foram capazes de elicitar resposta imune protetora nos animais pela produção de anticorpos neutralizantes, como observado na Figura 13A e B. Diferentes diluições foram testadas com o objetivo de checar se a concentração de soro dos animais estaria influenciando no desenvolvimento da resposta imune. No entanto, não foi observada resposta imune protetora na menor diluição 1:10, tendo os controle PBS e p43.2, apresentado resposta semelhante ao do construído expressando LAMP. O mesmo pode ser observado de maneira mais clara na diluição 1:40, tendo os animais que foram imunizados com PBS e demais construídos sem expressão de LAMP, praticamente a mesma resposta quando comparados aos animais imunizados com o construído expressando LAMP.

Não foi possível avaliar a resposta celular gerada por estes construídos vacinais, pois seria necessária a imunização de animais transgênicos para cada um dos epítomos definidos. Para isto, faz-se necessário um estudo mais apurado quanto à restrição de HLA para cada um dos epítomos de célula T mapeados, o que ainda está sendo realizado por outros pesquisadores em nosso laboratório.

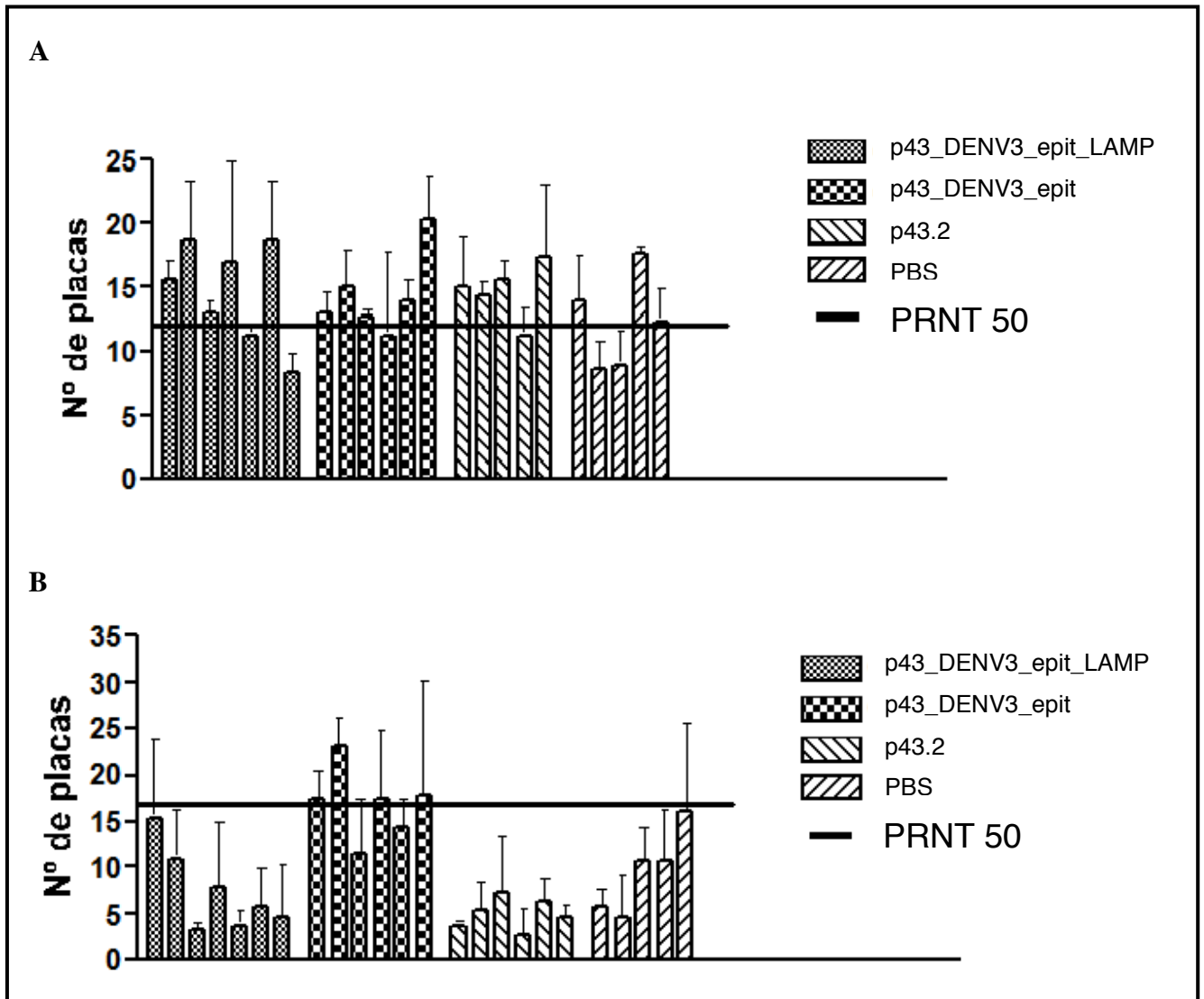


Figura 13- Teste de neutralização por redução de placas utilizando soros de camundongos Balb/c imunizados com os construídos (p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit) e com os controles (p43.2 e PBS).

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A) soros utilizados na diluição 1:40, décima semana pós-priming (B) soros utilizados na diluição 1:10, sexta semana pós-priming . Os soros dos animais foram analisados individualmente. p43.2-vetor vazio; PBS-Phosphate Buffered Saline; PRNT50-Plaque Reduction Neutralization Test 50%.

6.2 Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra o dengue, utilizando como vetor o replicon do vírus da febre amarela expressando o domínio III do envelope

6.2.1 Construção do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP

Com o objetivo de avaliar a eficiência de replicação do clone infeccioso pBSC_SP6_YFV-17D, o qual serviria de base para o desenvolvimento de todos os replicons apresentados neste trabalho, iniciamos o mesmo construindo um replicon de febre amarela (pBSC_rep_YFV_EGFP) que expressava um gene repórter cuja atividade refletiria diretamente a capacidade de replicação do replicon e conseqüentemente nos daria a informação sobre o bom funcionamento das proteínas não-estruturais presentes no clone infeccioso pBSC_SP6_YFV-17D. Após a recombinação em levedura, quatro clones da construção pBSC_rep_YFV_EGFP foram selecionados e a confirmação da clonagem foi realizada por PCR, utilizando *primers* específicos (rep-YFV-EGFP-F e YFV-2912-R). Como pode ser observado, dos quatro clones selecionados, todos amplificaram um fragmento esperado de 1.272 pb, que compreende a região entre o capsídeo, GFP (*Green fluorescent Protein*) e a porção N-terminal da proteína NS1 do vírus da febre amarela (Figura 14), confirmando o sucesso da clonagem.

O mapa gerado para a construção do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP, está ilustrado na Figura 15.

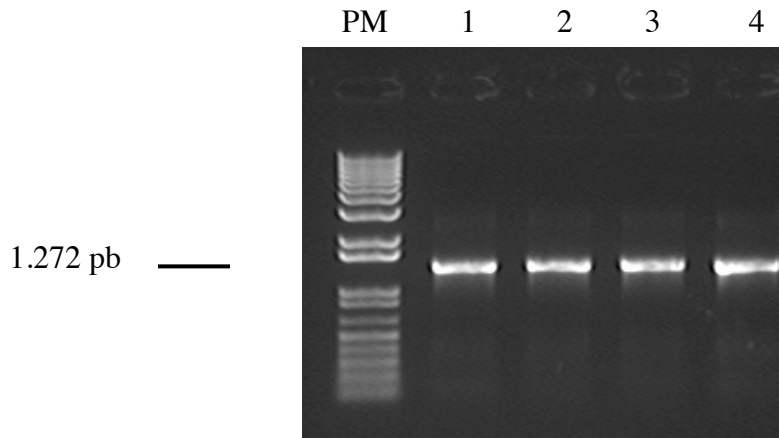


Figura 14- PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.

Fonte: Dados da autora.

Nota: clones 1 a 4 (colunas de 2 a 5, respectivamente) do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP. Peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (coluna 1).

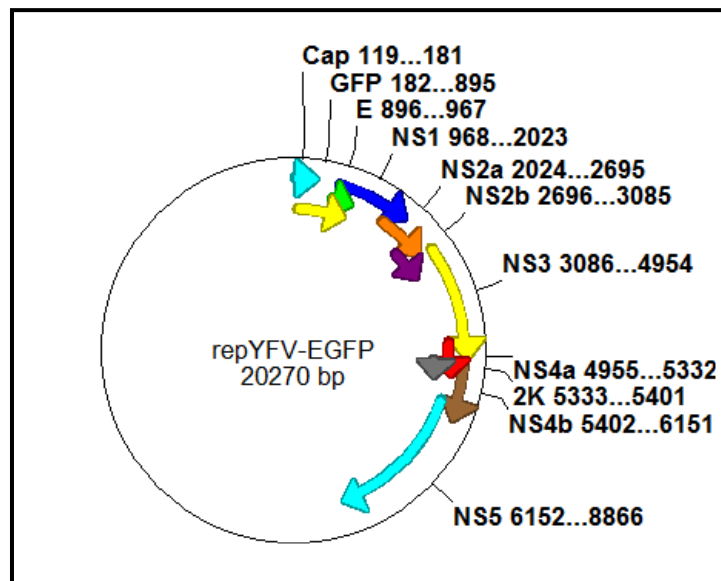


Figura 15- Mapa do plasmídeo construído para o replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.

Fonte: Dados da autora.

Nota: Cap-capsídeo; GFP-*Green Fluorescent Protein*; E- envelope; NS- proteínas não-estruturais.

6.2.2 Análise da expressão da proteína GFP do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP pela transfecção de células BHK-21

Uma vez confirmada a identidade dos construídos, a expressão do gene repórter GFP foi analisada *in vivo* através da fluorescência em microscopia confocal. Os resultados mostraram uma boa expressão do GFP, com 48 horas após transfecção, para os clones 2 e 4 de pBSC_rep_YFV_EGFP (Figura 16) e para o controle positivo do ensaio, que consistiu de células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo *Green Lantern* (Figura 17). No tempo de 72 horas após transfecção, também foi observada a expressão do gene repórter para os mesmos clones, mas em uma intensidade menor (fotos não mostradas). A eficiência de replicação do replicon também foi avaliada através de ensaio de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos que reconhecem as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da febre amarela, presentes neste construído, demonstrando que os replicons eram funcionais e poderiam ser utilizados para a clonagem de outros genes heterólogos (Figura 18).

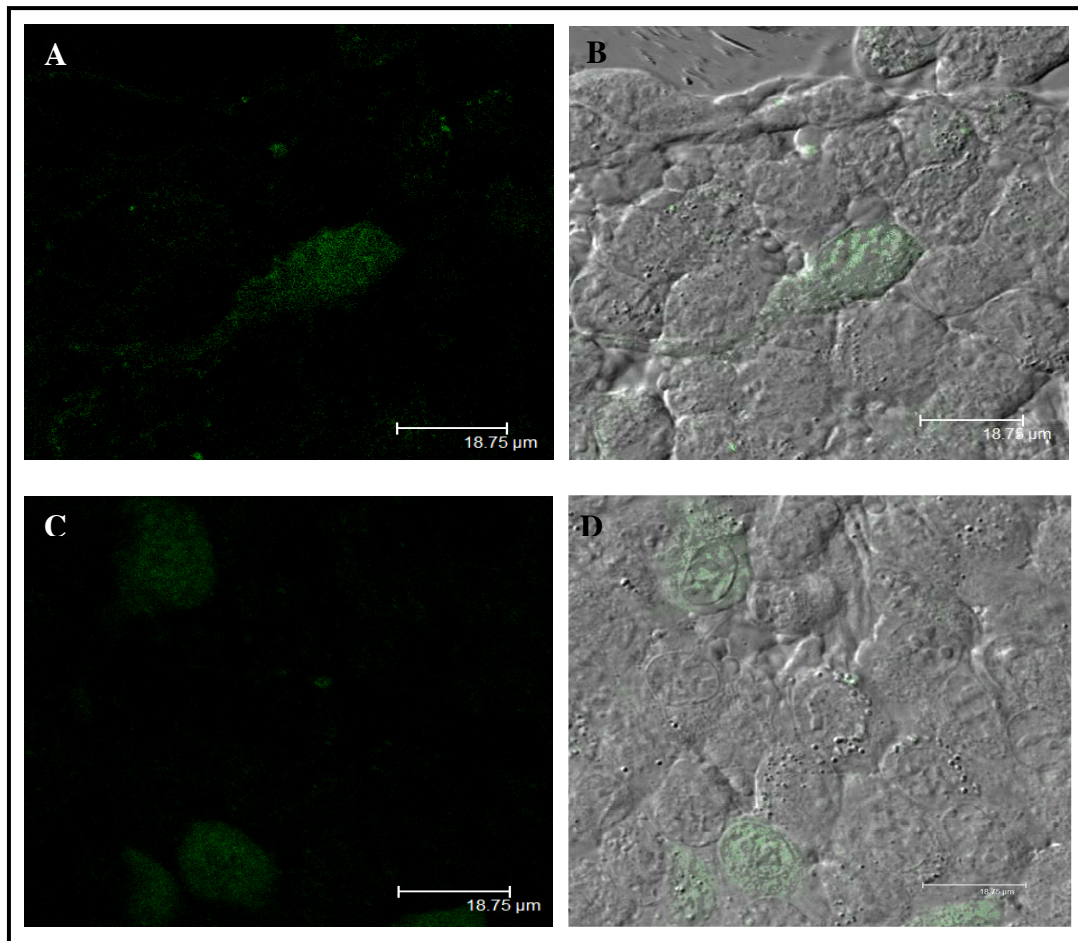


Figura 16- Expressão *in vivo* da proteína GFP do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A expressão do GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi observada por microscopia confocal, através da emissão de fluorescência por excitação com luz ultravioleta, 48 horas pós-transfecção de células BHK-21. **(A)** pBSC_rep_YFV_EGFP # 2, **(B)** pBSC_rep_YFV_EGFP # 2 com imagem de sobreposição sobre transducência, **(C)** pBSC_rep_YFV_EGFP # 4, **(D)** pBSC_rep_YFV_EGFP # 4 com imagem de sobreposição sobre transducência. Aumento: 630x.

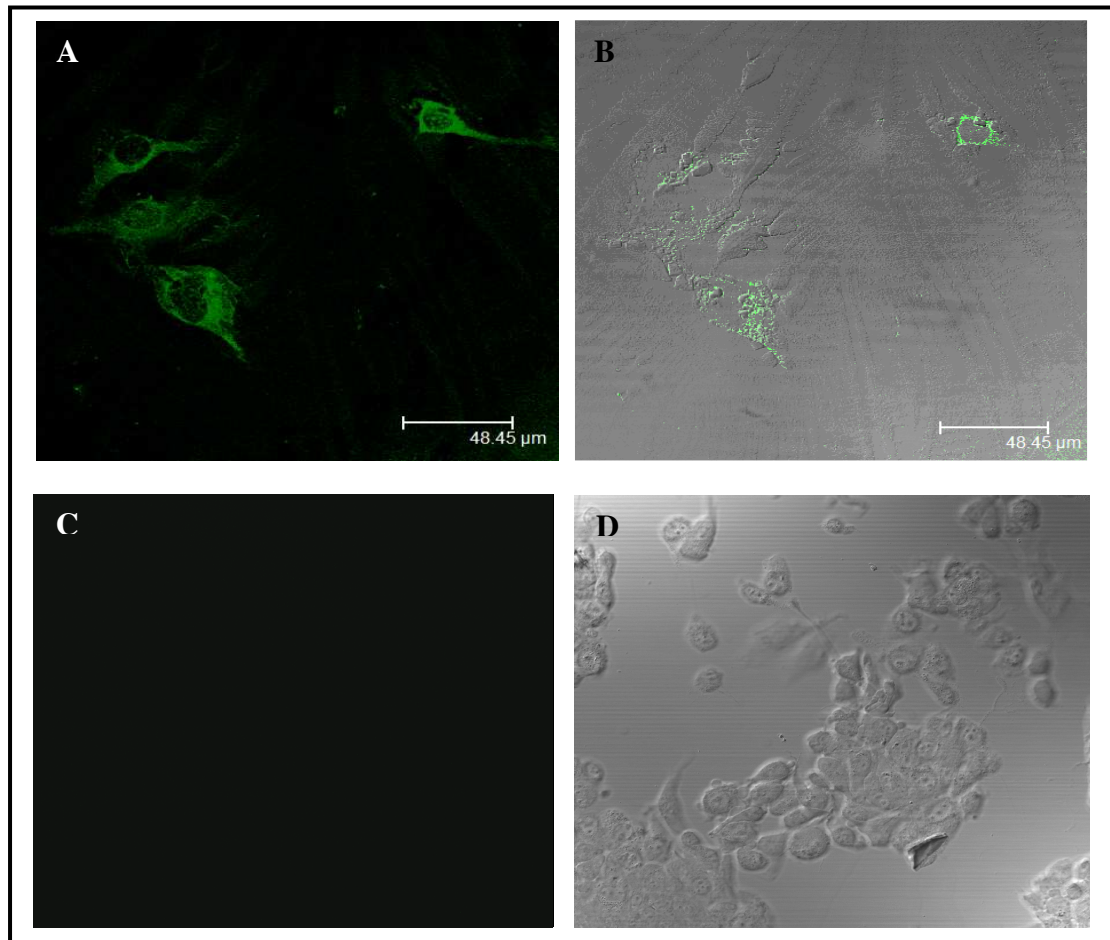


Figura 17- Expressão *in vivo* da proteína GFP do plasmídeo *Green Lantern*.

Fonte: Dados da autora.

Nota: Controle positivo para os testes de transfecção com os replicons pBSC_rep_YFV_EGFP # 2 e #4. A expressão do GFP (*Green Fluorescent Protein*) foi observada por microscopia confocal, através da emissão de fluorescência por excitação com luz ultravioleta, 48 horas pós-transfecção de células BHK-21. (A) plasmídeo *Green Lantern* (B) plasmídeo *Green Lantern* com imagem de sobreposição sobre transducência, (C) Controle negativo, células BHK-21 *mock* e (D) Controle negativo, células BHK-21 *mock* com imagem de transducência. Aumento: 630x.

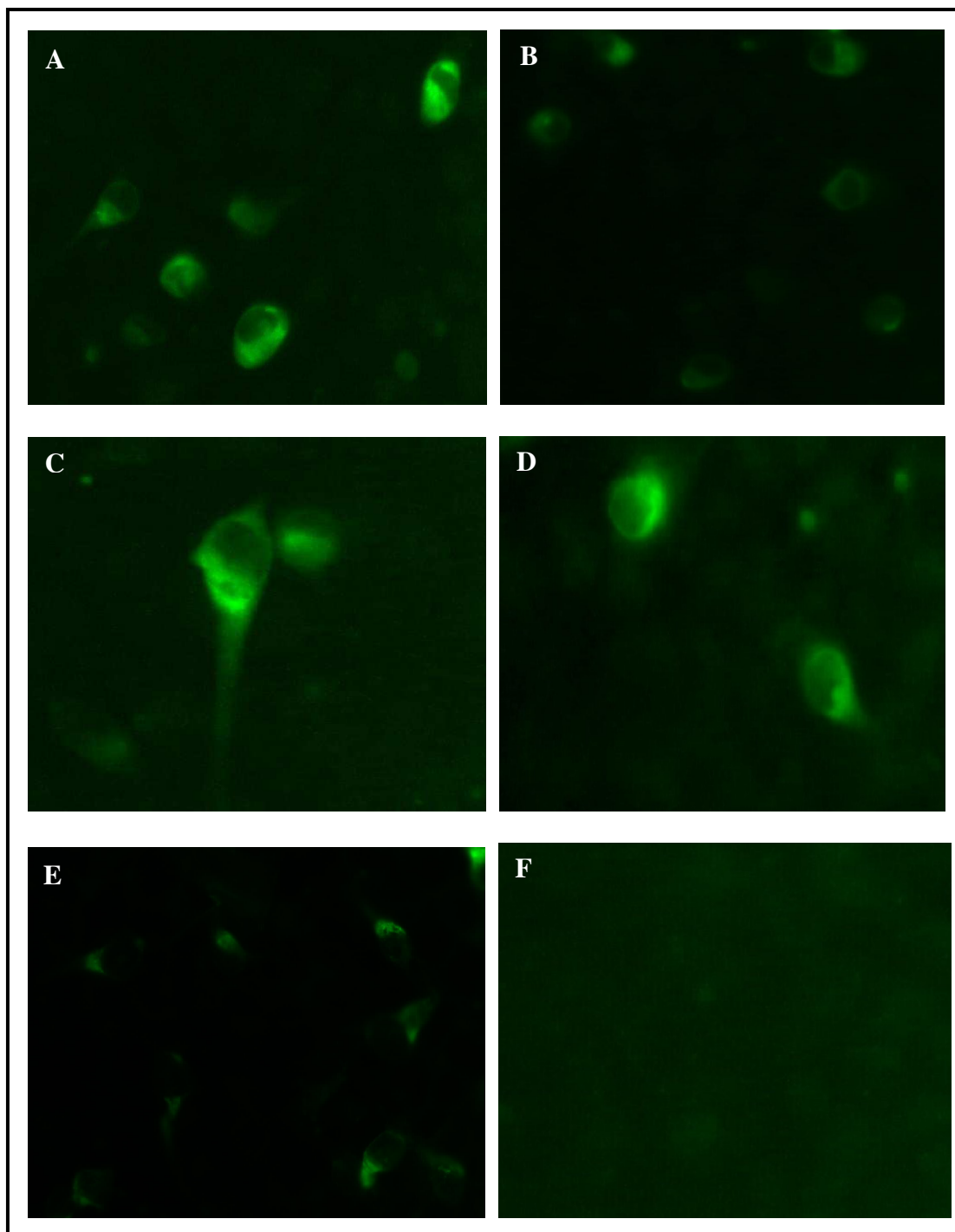


Figura 18- Expressão das proteínas não-estruturais do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A eficiência da replicação do replicon foi observada por microscopia de fluorescência utilizando anticorpos específicos para as proteínas não-estruturais do vírus da febre amarela, 48 horas pós-transfecção de células BHK-21. (A) e (B) pBSC_rep_YFV_EGFP # 2, (C) e (D) pBSC_rep_YFV_EGFP # 4, (E) controle positivo da transfecção: células transfectadas com o vírus T7_YFV_17D e (F) controle negativo, células *mock*. Aumento: 630x em óleo de imersão.

6.2.3 Construção do replicon do vírus da febre amarela pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D

Uma vez que a análise da eficiência do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP mostrou que era possível clonar um gene heterólogo no lugar das proteínas estruturais do vírus da febre amarela, partimos para a construção de um replicon que apresentasse a proteína total do capsídeo do vírus, como parte de uma estratégia vacinal que permitisse o *trans*-empacotamento do replicon e uma futura produção de VLPs (*Virus Like Particles*). Após a recombinação em levedura, quatro clones da construção pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D foram selecionados e a confirmação da clonagem foi realizada por PCR, utilizando diferentes fontes de DNA extraído de levedura (minipreps e midipreps). Como pode ser observado na Figura 19, dos quatro clones selecionados, apenas um clone, o pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D #2, apresentava banda na altura de 1.163 pb como esperado para o replicon construído utilizando primers específicos que amplificaram uma região compreendida entre o vetor pBSC e a proteína NS1 do replicon de febre amarela. O clone 3 do replicon pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D não foi amplificado por PCR como esperado e por isso foi descartado. Uma banda de altura menor (795 pb) foi encontrada para o replicon T7_rep_YFV #4 utilizado como controle na reação de PCR, que apresenta deleção quase que total das proteínas estruturais no replicon (Figura 19). Os demais clones (pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D #1 e #4) apresentaram uma banda semelhante ao que foi amplificado para os vírus da febre amarela (pBSC_T7_YFV-17D) que foi também utilizado como controle (Figura 19), cujo tamanho é de aproximadamente 3.038 pb, pois não apresenta nenhuma deleção.

Todos os DNAs testados para os clones 1 e 4 de pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D, mostraram que o vetor pBSC_T7_YFV-17D contendo o genoma completo do vírus da febre amarela não foi devidamente digerido e que por isso, a clonagem por recombinação e conseqüente construção dos replicons não funcionou para todos os clones testados (Figura 19).

O mapa gerado para a construção do replicon pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D, está ilustrado na Figura 20.

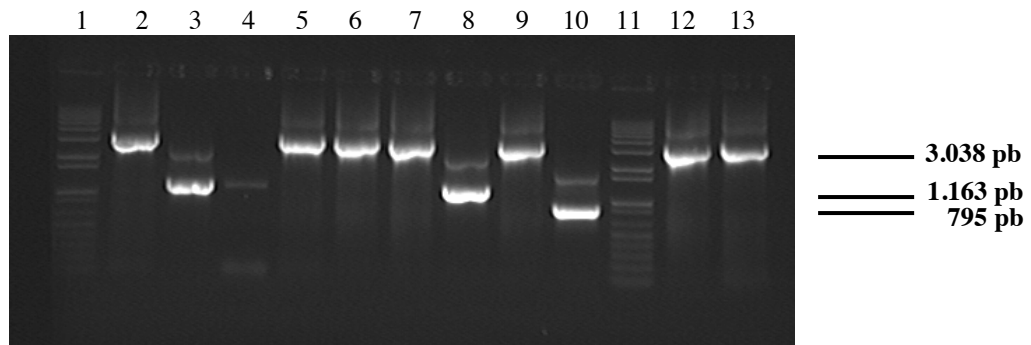


Figura 19- PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para confirmação da construção do replicon pBSC_repΔPrM-E_YFV_17D.

Fonte: Dados da autora.

Nota: Foram utilizadas para a PCR, diferentes fontes de DNA para a confirmação da clonagem. Miniprep de levedura de pBSC_repΔPrM-E_YFV_17D # 1 a 4 (colunas de 2 a 5, respectivamente), maxiprep de pBSC_repΔPrM-E_YFV_17D # 1 (coluna 6), midiprep de levedura de pBSC_repΔPrM-E_YFV_17D # 1, 2 e 4 (colunas de 7 a 9, respectivamente), miniprep de levedura T7_rep_YFV #4, replicon cedido pela Dra. Laura Gil (coluna 10) e controle positivo da reação em duplicata, vírus pBSC_T7_YFV-17D #2 (colunas 12 e 13). Peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (colunas 1 e 11).

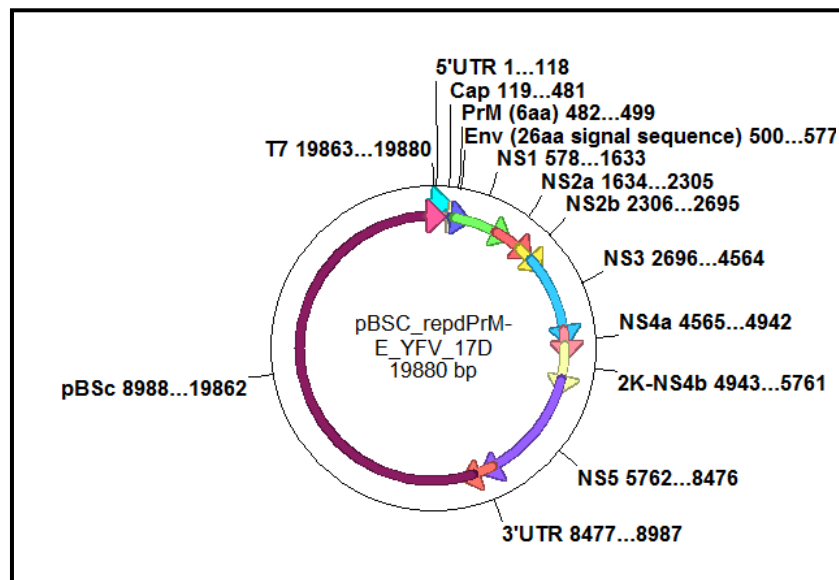


Figura 20- Mapa virtual para o replicon pBSC_repΔPrM-E_YFV_17D.

Fonte: Dados da autora.

Nota: Cap- sequência total da proteína do capsídeo; PrM- 6 aminoácidos da proteína de pré-membrana; Env- 26 aminoácidos da proteína do envelope; NS- proteínas não-estruturais.

6.2.4 Análise da eficiência de replicação do replicon pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D pela transfecção de células BHK-21

Uma vez confirmada a construção para o clone pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D #2, a eficiência de replicação do replicon foi avaliada através de ensaio de imunofluorescência indireta de células BHK-21 transfectadas com o RNA transcrito *in vitro*, demonstrando que o clone era funcional e poderia ser utilizado para a clonagem do domínio III do vírus dengue, neste vetor (Figura 21).

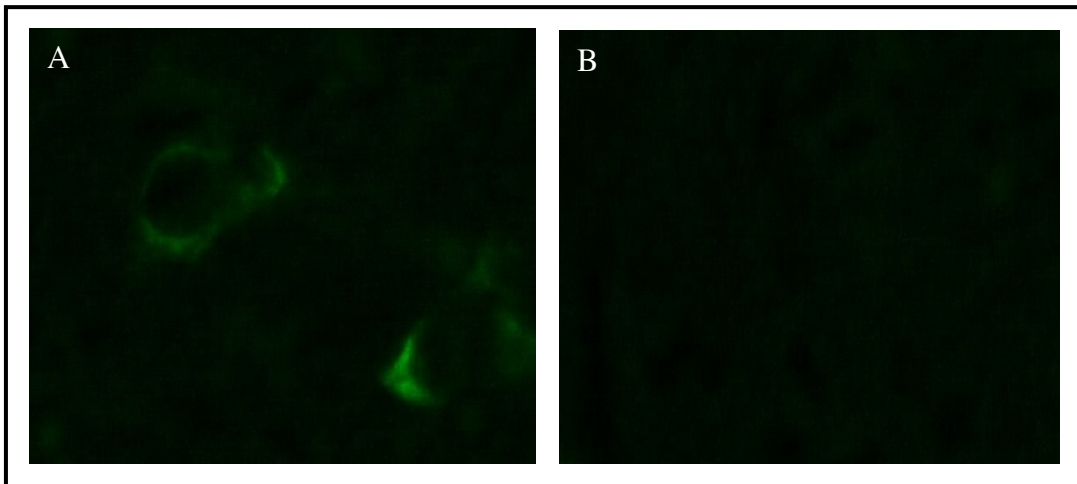


Figura 21- Replicação do replicon pBSC_rep Δ PrM-E_YFV_17D analisada através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos que reconhecem as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da febre amarela, presentes nesta construção.

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A) Células BHK-21 transfectadas com RNA transcrito do replicon rep Δ PrM-E_YFV_17D clone 2 (B) Células BHK-21 não transfectadas, controle negativo. Aumento: 630x em óleo de imersão.

6.2.5 Construção dos replicons tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D e monovalentes pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4)

Após a construção do replicon pBSC_rep Δ prM-E_YFV_17D, a idéia inicial era clonar o domínio III dos quatro sorotipos do vírus dengue neste vetor, utilizando para isto o sítio para a enzima de restrição NarI presente no mesmo. No entanto, devido às dificuldades encontradas na digestão deste vetor que expressava o replicon, não foi possível abrir uma janela para a clonagem do gene de interesse. Optamos então por construir o replicon que expressaria o domínio III do dengue (nas duas diferentes abordagens, monovalente e tetravalente), a partir do clone infeccioso pBSC_T7_YFV-17D #2, substituindo a região que codificava as proteínas estruturais do vírus da febre amarela pela porção N-terminal do replicon rep Δ prM-E_YFV_17D (promotor T7, região 5'UTR, capsídeo e os 18pb referentes ao começo da proteína prM), incluindo os fragmentos que codificavam as seqüências do DIII, como descrito na metodologia, item 5.3.4.

Uma vez realizada a recombinação em levedura, as clonagens foram confirmadas através da técnica de PCR. Para a construção tetravalente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D, três clones foram testados para a checagem da presença dos insertos recombinados, como mostra as Figuras 22 e 23 para os clones 1, 2 e 3 desta construção. Os resultados da PCR confirmaram a eficiência da clonagem, onde os 3 clones testados amplificaram uma região compreendida entre o vetor e a região da proteína NS1 do replicon, com uma banda de 3.518 pb, como esperado (Figura 22). A amplificação de cada inserto utilizado na clonagem (insertos 1 a 5) também foi observada (Figura 23) liberando bandas no tamanho esperado de aproximadamente 517 pb para o inserto 1, 646 pb para o inserto 2, 642 pb para o inserto 3, 636 pb para o inserto 4 e 1.151 pb para o inserto 5. A banda referente ao inserto 5 (DIII do DENV-4) é maior que as bandas amplificadas para os insertos 2 a 4 (DIII dos demais sorotipos) porque o *primer reverse* utilizado para a amplificação desta região anela *downstream* à região de interesse, na proteína NS1 flanqueante. Mesmo que para a construção pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D #1, não tenhamos observado por PCR a amplificação do produto referente ao inserto 1 (ver figura 23 A, coluna 2), a análise do seqüenciamento não mostrou qualquer deleção nesta região. Os resultados confirmam com sucesso a clonagem e a construção de pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D.

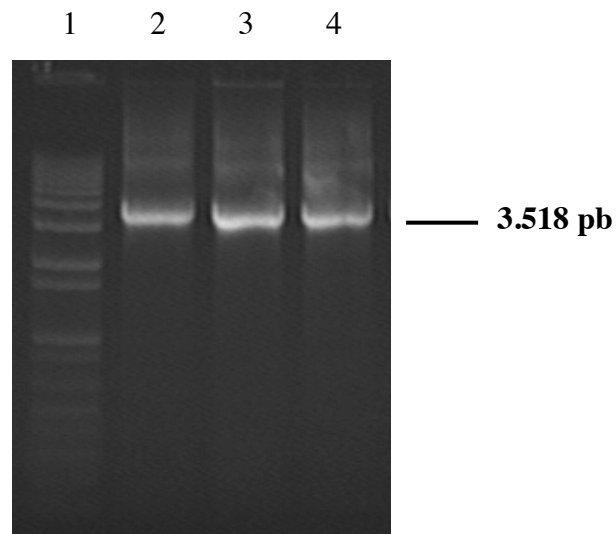


Figura 22- PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A PCR para confirmação da clonagem dos clones 1, 2 e 3 do replicon pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D (colunas 2, 3 e 4, respectivamente), mostrou banda esperada no tamanho de 3.518 pb para todas as construções. Peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (coluna 1).

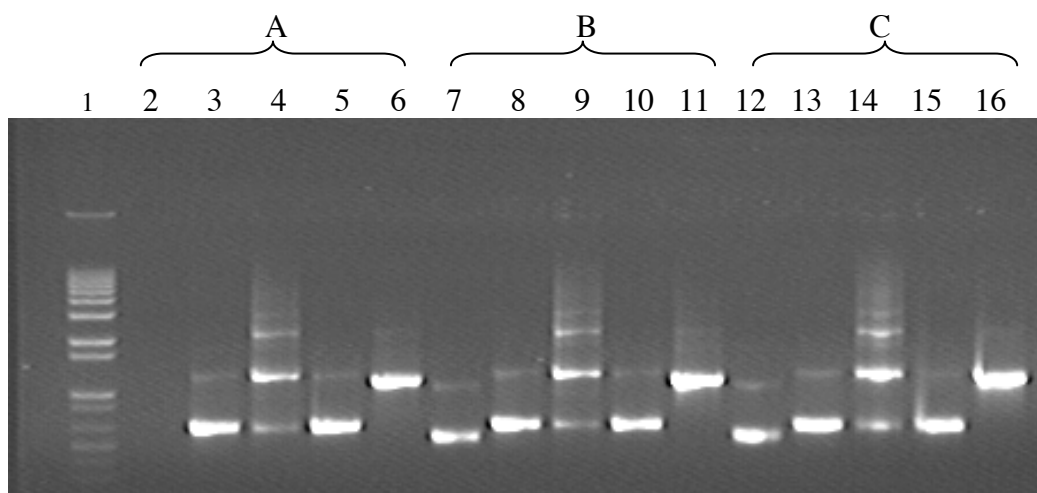


Figura 23- PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de cada fragmento da recombinação, para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A PCR para a confirmação de cada inserto foi realizada utilizando os pares de primers específicos para cada um dos mesmos. O tamanho de cada inserto amplificado correspondeu ao esperado, sendo de 517 pb para o inserto 1, 646 pb para o inserto 2, 642 pb para o inserto 3, 636 pb para o inserto 4 e 1.151 pb para o inserto 5. (A) pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D clone 1, insertos 1 a 5 (colunas 2 a 6, respectivamente), (B) pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D clone 2, insertos 1 a 5 (colunas 7 a 11, respectivamente), (C) pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D clone 3, insertos 1 a 5 (colunas 12 a 16, respectivamente). Peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (coluna 1).

Para as construções monovalentes, dois clones de cada uma das construções foram utilizados para a checagem da presença dos insertos. Para todas as construções foi avaliada a presença de cada inserto recombinado, como mostra a Figura 24 para os clones 1 e 2 de cada uma das construções pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D e a Figura 25 para os clones 1 e 2 da construção pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D.

Os resultados confirmam a eficiência da clonagem, com a amplificação de cada inserto utilizado na clonagem (insertos 1 e 2), para cada um dos dois clones testados (Figuras 24 e 25). As bandas liberadas apresentam o tamanho esperado, como descrito abaixo para cada construção:

- a) pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D: 517 pb para o inserto 1 e 646 pb para o inserto 2.
- b) pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D: 517 pb para o inserto 1 e 642 pb para o inserto 2.
- c) pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D: 517 pb para o inserto 1 e 636 pb para o inserto 2.
- d) pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D: 517 pb para o inserto 1 e 1.151 pb para o inserto 2.

A banda referente ao DIII do DENV-4 é maior que as bandas amplificadas para os DIII dos demais sorotipos porque o *primer reverse* utilizado para amplificação desta região anela *downstream* à região de interesse, na proteína NS1 flanqueante.

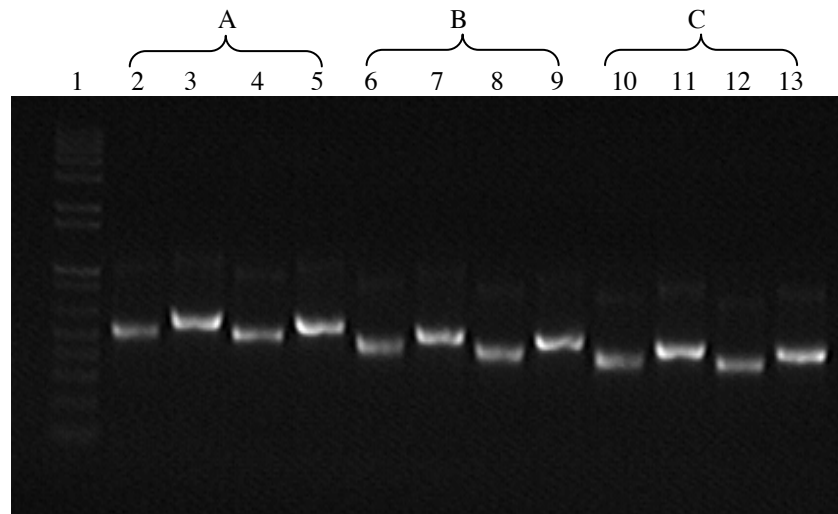


Figura 24- PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de cada fragmento da recombinação, para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D, pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A PCR para a confirmação de cada inserto foi realizada utilizando os pares de primers específicos para cada um dos mesmos. O tamanho de cada inserto amplificado correspondeu ao esperado, sendo de 517 pb para o inserto 1 de todas as construções e de 646 pb para o inserto 2 de pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D, de 642 pb para o inserto 2 de pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D e de 636 pb para o inserto 3 de pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D. (A) pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D clone 1, insertos 1 e 2 (colunas 2 e 3, respectivamente) e pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D clone 2, insertos 1 e 2 (colunas 4 e 5, respectivamente), (B) pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D clone 1, insertos 1 e 2 (colunas 6 e 7, respectivamente) e pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D clone 2, insertos 1 e 2 (colunas 8 e 9, respectivamente), (C) pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D clone 1, insertos 1 e 2 (colunas 10 e 11, respectivamente) e pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D clone 2, insertos 1 e 2 (colunas 12 e 13, respectivamente). Peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (coluna 1).

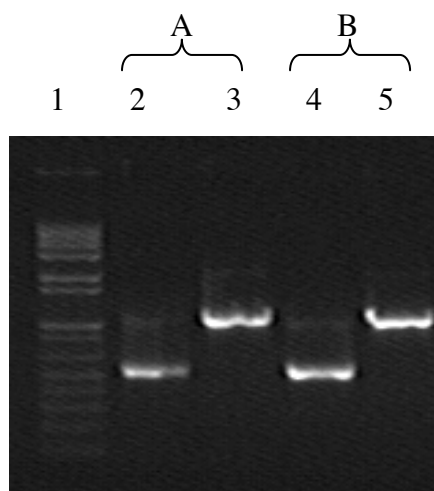


Figura 25- PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de cada fragmento da recombinação, para confirmação da construção do replicon pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D.

Fonte: Dados da autora.

Nota: A PCR para a confirmação de cada fragmento foi realizada utilizando os pares de primers específicos para cada um dos mesmos. O tamanho de cada fragmento amplificado correspondeu ao esperado, sendo de 517 pb para o inserto1 e de 1.151 pb para o inserto 2 de pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D. (A) pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D clone 1, insertos 1 e 2 (colunas 2 e 3, respectivamente) e pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D clone 2, insertos 1 e 2 (colunas 4 e 5, respectivamente). Peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (coluna 1).

6.2.6 Análise da replicação dos replicons pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4) pela transfecção de células BHK-21

Uma vez confirmadas as clonagens, o RNA de cada construção foi utilizado para transfectar células, afim de que a eficiência de replicação destes replicons fosse avaliada. A análise da expressão do replicon foi realizada através do ensaio de imunofluorescência indireta em células BHK-21 transfectadas com os RNAs transcritos *in vitro*, onde foi visto que, com 72h após a transfecção, as células apresentavam imunofluorescência positiva apenas para os clones 2 e 3 da construção tetravalente (pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D#2 e pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D#3), como mostra a Figura 26. Para as construções monovalentes pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-4), os 3 clones testados de cada uma das construções se mostrou eficiente na sua replicação, embora o clone 2 de cada uma destas construções tenha sido o que apresentou melhor expressão (Figura 27).

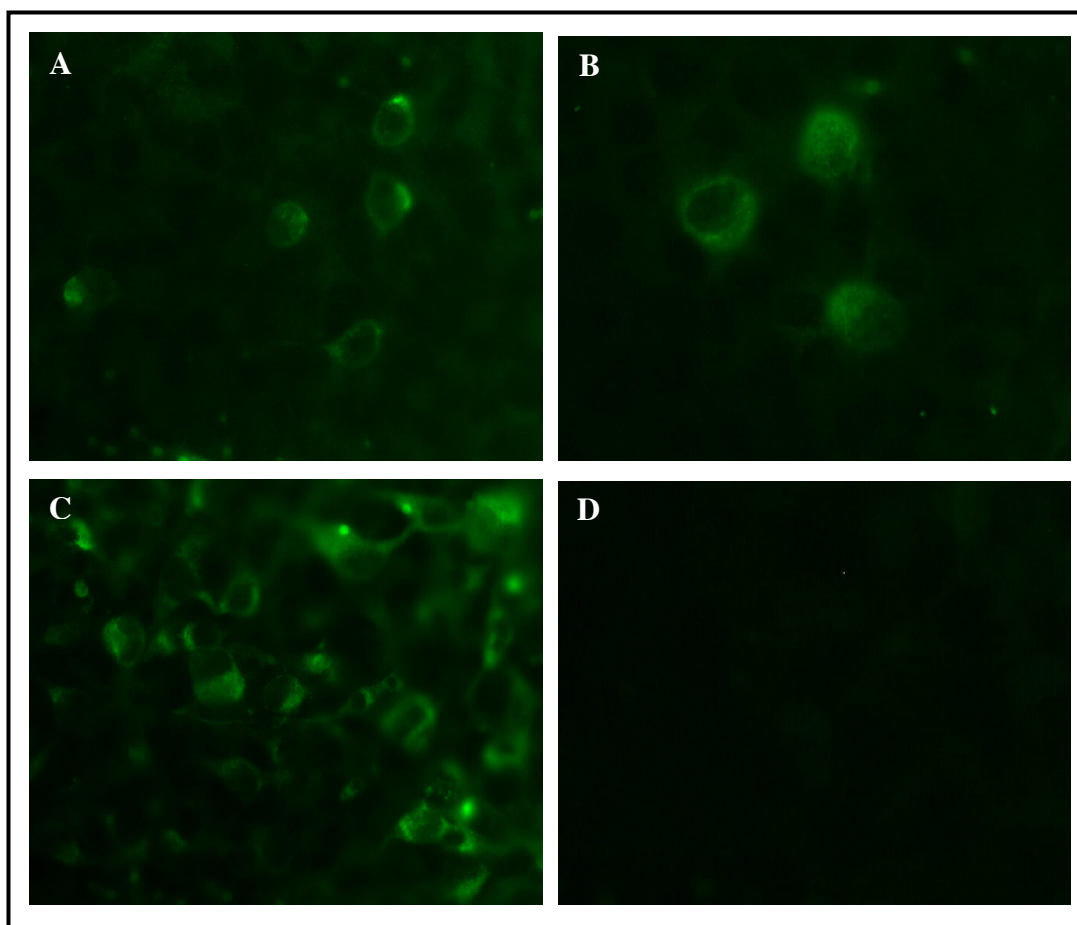


Figura 26- Replicação do replicon tetra-valente pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D, 72h pós-transfecção em células BHK-21, analisada através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos que reconhecem as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da febre amarela, presentes nesta construção.

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A) pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D clone 2, (B) pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D clone 3, (C) controle positivo da transfecção: células transfectadas com o vírus T7_YFV_17D e (D) controle negativo, células BHK-21 *mock*. Aumento 630x em óleo de imersão.

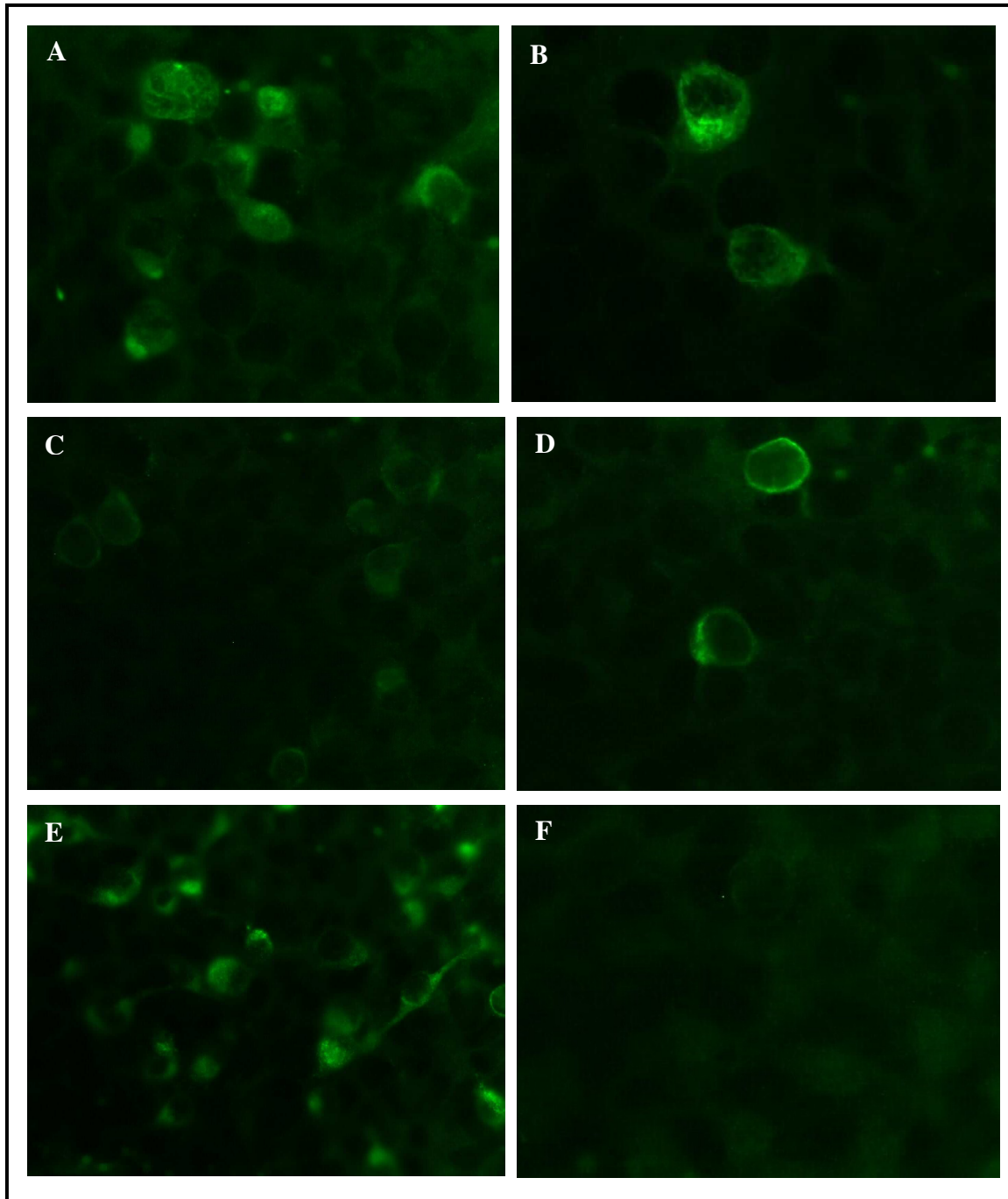


Figura 27- Replicação dos replicons monovalentes pBSC_rep_CMD_DIII_YFV17D (CMD1-D4), 72h pós-transfecção em células BHK-21, analisada através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos que reconhecem as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus da febre amarela, presentes nesta construção.

Fonte: Dados da autora.

Nota: (A) pBSC_rep_CMD1_DIII_YFV17D clone 2, (B) pBSC_rep_CMD2_DIII_YFV17D clone 2, (C) pBSC_rep_CMD3_DIII_YFV17D clone 2, (D) pBSC_rep_CMD4_DIII_YFV17D clone 2, (E) positivo da transfecção: células transfectadas com o vírus selvagem T7_YFV_17D e (F) controle negativo, células BHK-21 *mock*. Aumento 630x em óleo de imersão.

6.2.7 Sequenciamento

Devido ao tamanho do inserto clonado na construção tetravalente, os clones 1, 2 e 3 selecionados foram seqüenciados para análise quanto à presença de deleções ou mutações. A análise dos alinhamentos dos produtos seqüenciados mostrou que não houve nenhuma deleção ou mutação na proteína recombinante (DIII de cada um dos quatro sorotipos clonados *in tandem*).

6.2.8 Trans-complementação e produção de *Virus Like Particles* (VLPs)

Após demonstrar o bom funcionamento do replicon, partimos para os ensaios de trans-complementação, visando a produção de VLPs a partir de uma linhagem celular (293-YFV-PrM/E) que expressava de maneira constitutiva as proteínas de prM e E do vírus da febre amarela. De acordo com os resultados dos ensaios de trans-complementação, não conseguimos avaliar se houve empacotamento para os replicons testados: pBSC_rep Δ prM-E_YFV_17D, pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D ou pBSC_rep_CMD_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4). A análise por imunofluorescência, de células HEK-293 infectadas com o sobrenadante das células da linhagem (293-YFV-PrM/E) transfectadas com cada um destes construídos, foi negativa para todos os replicons. No entanto, este mesmo resultado foi observado para o controle positivo do ensaio, o vírus pBSC_T7_YFV-17D cujo RNA foi transfectado e o sobrenadante testado em paralelo aos ensaios com os replicons construídos. Isto mostra que houve uma baixa eficiência de transfecção no teste. O controle utilizado para a técnica de imunofluorescência, células 293 infectadas com o vírus da febre amarela cepa vacinal 17D, funcionou com a observação da expressão das proteínas estruturais do vírus, mostrando que não houve problemas nesta técnica.

7 DISCUSSÃO

A dengue representa uma das mais importantes doenças virais em termos de morbidade e mortalidade, com mais de 100 milhões de pessoas sendo infectadas a cada ano (DE PAULA *et al.*, 2008). Embora o desenvolvimento de uma vacina tenha se tornado uma prioridade incontestável para a Saúde Pública, ela continua sendo um desafio científico pelo fato da doença ser causada por quatro sorotipos antigenicamente distintos, tendo a hipótese da infecção sequencial heterotípica como um fator de risco para os quadros de FHD e SCD (HOMBACH, 2007).

Muitos grupos envolvidos no desenvolvimento de uma vacina para dengue têm focado na produção de vacinas atenuadas para cada um dos sorotipos, que são administradas como uma mistura tetravalente (APT *et al.*, 2006). No entanto, a competição entre os sorotipos leva a geração de uma resposta imune diferente para cada um deles, acentuando o risco do desenvolvimento das formas graves da doença (SABCHAREON *et al.*, 2002). Outro problema associado com o uso de vacinas vivas é a possibilidade de recombinação entre a cepa vacinal e o vírus selvagem, resultando em um novo vírus com propriedades desconhecidas. Por isso, importantes avanços têm sido realizados no desenvolvimento de vacinas não-vivas para os flavivírus, como as vacinas de DNA (SELIGMAN; GOULD, 2004).

Nesse sentido, o presente estudo teve como um de seus objetivos desenvolver uma vacina de DNA que expressa epítomos de célula B e T mapeados na glicoproteína do envelope, assim como nas proteínas não-estruturais NS1 e NS3, do vírus DENV-3, otimizados e fusionados à proteína LAMP. Devemos salientar que a otimização genética foi realizada com o objetivo de melhorar a expressão das proteínas em células eucarióticas e gerar uma resposta imune mais robusta. Além disso, para remediar o inconveniente da fraca resposta imune humoral por anticorpos neutralizantes induzida pelas vacinas de DNA convencionais (LU *et al.*, 2003), os epítomos mapeados foram fusionados ao gene da proteína LAMP através da clonagem dos mesmos entre as porções N-e C-terminal desta proteína. Outra estratégia utilizada em nossas construções para aumentar a eficiência de apresentação do antígeno, consistiu na adição de 5 aminoácidos originais da sequência selvagem de cada proteína (E, NS1 e NS3), nas regiões N- e C-terminal que flanqueavam cada um dos epítomos mapeados, após as análises de sobreposição. Já foi reportado que a imunogenicidade de diferentes peptídeos que abrigam um determinante antigênico particular, pode ser

significativamente modulada pelas regiões que flanqueiam estes determinantes e que, aminoácidos removidos de regiões antigênicas podem afetar a ativação de clones de células T. (BERGMANN *et al.*, 1996; MOUDGIL; SERCARZ; GREWAL, 1998).

Todos os plasmídeos construídos foram confirmados por digestão enzimática e seqüenciamento antes dos ensaios de expressão, onde foi confirmada a eficiência da clonagem e a ausência de qualquer mutação nos plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP #1 e p43_DENV3_epit #1. Como observado nos resultados da imunofluorescência realizada 48 horas após a transfecção de células BHK-21 e COS-1 com os construídos, vimos a expressão do LAMP-1 humano fusionado aos epítomos, no construído p43_DENV3_epit_LAMP #1. As células utilizadas para a transfecção não apresentam LAMP-1 humano endógeno e como os anticorpos utilizados (H4A3 e E-5) não reagem com o LAMP de outras espécies, conseguimos detectar a expressão do LAMP-1 humano tanto no nosso construído p43_DENV3_epit_LAMP #1, como no controle, o vetor p43-HIVhumanLAMP/Gag. Embora não tenhamos avaliado a resposta da expressão dos epítomos clonados, pela falta de anticorpos específicos contra os mesmos, pelo fato de termos observado a expressão de LAMP humano fusionados a estes epítomos, é esperada uma expressão direta deste epítomos uma vez que estes foram clonados *in frame* com o LAMP.

Apesar da expressão do LAMP-1 humano fusionado aos epítomos ter sido comprovada com sucesso em nosso construído, foi identificado que poucas células expressavam esta proteína. Provavelmente isto tenha ocorrido devido a uma baixa eficiência de transfecção para os construídos vacinais testados. Mesmo que células BHK-21 e COS-1 transfectadas com o plasmídeo pCMV- β gal (utilizado como controle para medir a eficiência da técnica), tenham apresentado uma eficiência de transfecção de cerca de 70%, quando avaliada a expressão do gene repórter β -galactosidase, acreditamos que a qualidade dos DNAs dos nossos construídos, utilizados para a transfecção das células BHK-21 e COS-1, possa ter prejudicado a eficiência da técnica. É importante ressaltar que não conseguimos detectar a proteína LAMP-1 humana em células BHK-21 e COS-1 transfectadas com o construído p43_DENV3_epit_LAMP #1 pela técnica de *Western Blot*, o que também pode ser explicado pela baixa eficiência de transfecção e conseqüentemente baixa concentração da proteína LAMP-1 humana. Embora tenhamos utilizado os anticorpos monoclonais H4A3 e E-5, específicos para o LAMP-1 humano, não conseguimos detectar a expressão desta proteína em células transfectadas com os plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP #1 ou p43-HIVhumanLAMP/Gag. Células HEK-293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*) e HeLa (*Henrietta's Lacks cells*), ambas células de origem humana e que expressam o LAMP-1 endógeno, foram utilizadas como controle

positivo durante a técnica, no entanto, a proteína também não foi detectada, chamando atenção para uma possível inespecificidade dos anticorpos utilizados (dados não mostrados). Por isso, devido à falta de um anticorpo específico que detectasse os epítomos clonados em células transfectadas e pela inespecificidade do anticorpo que marcava o LAMP-1 humano no *Western Blot*, não foi possível avaliar a eficiência de expressão dos genes otimizados quantitativamente, uma vez que os ensaios de imunofluorescência são apenas qualitativos.

Quando se trata da vacina contra a febre amarela, os estudos mostram que a presença de anticorpos neutralizantes antivirais são necessários e suficientes para uma resposta protetora contra este vírus (AMANNA; SLIFKA, 2009). Estudos laboratoriais com o vírus dengue ou outros flavivírus têm indicado que a proteção de pequenos animais à infecção viral está correlacionada a níveis de anticorpos neutralizantes (HUANG *et al.*, 2003; JOHNSON; ROEHRIG, 1999). Estudos similares com o vírus dengue em modelos primatas não-humanos confirmaram estas observações (WHITEHEAD *et al.*, 2003; GUIRAKHOO *et al.*, 2004; BLANEY *et al.*, 2005; PUTNAK *et al.*, 2005).

Assim, o desenvolvimento de uma vacina eficaz para os demais flavivírus, como o dengue, deve elicitar resposta humoral por anticorpos neutralizantes. Quando imunizamos camundongos Balb/C com os diferentes plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP #1 e p43_DENV3_epit #1, observamos que os construídos não foram capazes de elicitar resposta humoral por anticorpos neutralizantes, mesmo tendo sido testadas diferentes concentrações do soro e estes terem sido coletados em diferentes períodos após a dose reforço. A resposta pareceu ser a mesma quando comparada com as dos animais controles, imunizados com PBS. No entanto, os epítomos de célula B, quando testados em camundongos Balb/c, foram capazes de elicitar uma resposta humoral por anticorpos do tipo IgG. Este resultado era esperado, corroborando com dados da literatura de que vacinas de subunidades poderiam ser altamente imunogênicas (FRANCIS *et al.*, 1996). Provavelmente, no contexto da imunização com subunidades, não há a problemática relacionada ao processamento de epítomos justapostos, como realizado em nossa abordagem vacinal.

Provavelmente, a falta de uma resposta por anticorpos neutralizantes para os nossos construídos deva ser decorrente de uma ineficiente apresentação dos antígenos clonados. Não se sabe como se dá o processo de apresentação de antígenos nos casos das vacinas de DNA que expressam epítomos. Parte da literatura observa que a presença dos espaçadores (*spacers*), que são seqüências pré-definidas de aminoácidos, quando adicionados entre cada epítomo específico, desempenha um papel importante na produção de anticorpos específicos contra estes epítomos. Um epítomo *junctional* é definido como um novo epítomo, criado pela

justaposição de dois ou mais autênticos epítomos. A presença deste epítomo *junctional* pode criar efeitos de imunodominância indesejáveis, redirecionando a resposta imune para epítomos irrelevantes e em alguns casos, suprimindo a indução da resposta aos epítomos desejados (LIU; WANG; CHEN, 2005). No entanto, a necessidade de adicionar espaçadores entre epítomos é ambígua, visto que, a construção de um gene codificando nove epítomos de células T CD8⁺, sem o uso de espaçadores, mostrou que cada epítomo foi processado e apresentado aos clones de célula T apropriados (THOMSON *et al.*, 1995). Por isto, neste estudo, acrescentado a uma questão de custo, optamos em não utilizar estes espaçadores.

Acredita-se que as vacinas que induzem resposta por célula T em adição a resposta por célula B, podem produzir uma resposta imune protetora duradoura (WELSH; FUJINAMI, 2007). No entanto, embora tenha sido encontrada no nosso trabalho uma resposta imune de células TCD4+, em camundongos imunizados com os peptídeos de célula B isoladamente, não foi possível avaliar a resposta imune celular dos nossos construídos vacinais, que apresentam epítomos mapeados de células T para as proteínas E, NS1 e NS3. Para isto, seria necessário o uso de camundongos transgênicos, que apresentassem a restrição de HLA específica para cada peptídeo. Estudos quanto à restrição de HLA para os epítomos de célula T mapeados previamente e incorporados na nossa vacina, ainda estão sendo realizados por outros pesquisadores em nosso laboratório. Provavelmente, nosso estudo terá que ser finalizado em colaboração com laboratórios de outros centros de pesquisas no Brasil ou no exterior, visto que nosso biotério não possui os animais transgênicos necessários nem possui as instalações adequadas para mantê-los em ambiente SPF (*Specific Pathogen Free*).

As variações nos epítomos codificados pelos vírus que são alvos de anticorpos neutralizantes complicam as estratégias de vacina, principalmente se lembrarmos que o vírus dengue apresenta quatro sorotipos que são antigenicamente distintos (WELSH; FUJINAMI, 2007). Sabe-se que a resposta celular por células T às infecções virais apresenta alguns fatores complicadores no que diz respeito às vacinas que utilizam epítomos. Primeiro, embora muitos peptídeos possam ser processados e apresentados pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), a resposta de células T é direcionada apenas contra um pequeno número de epítomos imunodominantes. O que causa esta imunodominância, ainda não está bem elucidado, mas sabe-se que é preciso que a célula processe enzimaticamente a proteína em um peptídeo particular e que o peptídeo tenha uma seqüência apropriada de aminoácidos para ligar com alta afinidade na fenda apresentadora de antígeno, na molécula MHC (WELSH; FUJINAMI, 2007). Outro ponto importante diz respeito à disponibilidade do repertório de células T que podem reconhecer o epítomo. Estudos mostram que 1 a cada

50.000-100.000 células *T naives* reconhecem um epítopo específico, além do mais, este número pode ainda variar de acordo com o epítopo em questão (BLATTMAN *et al.*, 2002).

Nossos resultados para o desenvolvimento de uma vacina de DNA que expressa epítomos de célula B e T, mostraram que é necessário voltar na construção dos plasmídeos p43_DENV3_epit_LAMP e p43_DENV3_epit, estabelecendo novas estratégias para a construção de uma vacina de DNA baseada em epítomos, visando um melhor processamento e expressão destes antígenos.

Em relação ao processamento dos antígenos, nos chama atenção de que são primariamente anticorpos anti-glicoproteína E que são medidos nos ensaios de neutralização por redução de placa (CALVERT *et al.*, 2006; COSTA; FREIRE; ALVES, 2006). Por isso, os epítomos mapeados na glicoproteína E do envelope e utilizados para a construção de nossa abordagem vacinal, não devem estar sendo corretamente processados em nosso construído. Faz-se necessário também, testar a resposta imune em camundongos transgênicos, dos epítomos de célula T mapeados em nosso laboratório e utilizados na nossa abordagem vacinal, com o intuito de avaliar se estes determinantes antigênicos são realmente capazes de elicitar resposta imune, assim como encontrado para os epítomos de célula B mapeados. Já foi relatado na literatura que anticorpos específicos para as proteínas não-estruturais (anti-NS1 por exemplo), também apresentam efeito protetor contra o vírus em modelos animais pequenos, no entanto, estes efeitos não são mediados pelas interações vírus-anticorpo como a resposta humoral por anticorpos neutralizantes (CALVERT *et al.*, 2006; COSTA; FREIRE; ALVES, 2006). De posse destes resultados, poderemos entender melhor se o problema está nos epítomos escolhidos para a montagem da nossa abordagem vacinal ou no processamento dos mesmos quando colocados em justaposição em uma vacina de DNA.

No diz que diz respeito à expressão de antígenos, também podemos considerar o uso de outros vetores vacinais, que não plasmídeos, como os vetores auto-replicativos, para as vacinas de epítomos baseadas em replicons. A utilização de imunoestimuladores e adjuvantes, que aumentam a resposta imune direcionada a estes genes também devem ser considerados.

O uso de DNAs plasmídeos que codificam RNAs auto-replicativos (replicons) permitem uma redução substancial do número de doses das vacinas de DNA, além de aumentar a expressão dos genes heterólogos alvos (HALL; KHROMYKH, 2004). Estes replicons podem ser utilizados como vacina, além da forma de DNA plasmídeo, nas formas de RNAs *naked* e partículas pseudo-infecciosas-VLPs (CHANG *et al.*, 2008).

Pelo fato dos replicons não gerarem partículas virais, pois as proteínas de empacotamento dos vírus não estão presentes neste sistema, esta tecnologia é bem mais

segura que o sistema tradicional de atenuação viral, onde fenômenos de mutação e reversão gênica podem converter as vacinas para formas mais virulentas dos vírus (YOSHII *et al.*, 2005). Além disto, a utilização de um replicon baseado no clone infeccioso da vacina 17 D contra a Febre Amarela, como carreador de genes heterólogos, apresenta ainda a vantagem de a vacina ser amplamente utilizada em todo o mundo e considerada bastante segura e eficaz no desenvolvimento de resposta duradoura (JONES; PATKAR; KUHN, 2005).

Assim, nossos estudos começaram na análise da eficiência de replicação do clone infeccioso da febre amarela, pBSC_SP6_YFV-17D, que serviu com base para a construção de todos os demais replicons presentes neste trabalho. Com este propósito, foi construído inicialmente um replicon do vírus da febre amarela, que apresentava a seqüência codificante do gene repórter GFP-*Green Fluorescent Protein* (pBSC_rep_YFV_EGFP), no lugar das proteínas estruturais do capsídeo (C), pré-membrana (PrM) e envelope (E) deletadas do replicon. A expressão do GFP é dependente da amplificação do RNA do replicon e por isso pode ser utilizado como uma medida direta da eficiência de replicação do replicon.

Foi demonstrado neste trabalho, a expressão do GFP *in vivo* e a capacidade de replicação do replicon pBSC_rep_YFV_EGFP, 48 horas após a transfecção de células BHK-21. Estes resultados mostraram que era possível expressar genes heterólogos clonados no lugar das proteínas estruturais do vírus e utilizar estes replicons como vetores vacinais. Diante disto, partimos para a construção de um segundo replicon do vírus da febre amarela, que apresentava deleção apenas das proteínas de pré-membrana e envelope, mas que continha toda a seqüência codificante do capsídeo, o qual seria importante para os testes de trans-complementação. Dentro desta abordagem, as proteínas estruturais de pré-membrana e do envelope foram substituídas, *in tandem*, pelo domínio III da glicoproteína do envelope dos quatro sorotipos do vírus dengue (construção tetravalente), assim como pelo domínio III de cada sorotipo do vírus individualmente (construções monovalentes). Foi demonstrado que vacinas candidatas baseadas no DIII são capazes de elicitar resposta imune por anticorpos neutralizantes (KHANAM *et al.*, 2009). Os flavivírus com mutação no DIII da proteína do envelope apresentaram tanto uma virulência atenuada, como habilidade em escapar dos mecanismos de neutralização (RAMANATHAN *et al.*, 2009). Proteínas de fusão contendo o DIII da proteína do envelope do DENV-2 induziram anticorpos neutralizantes e proteção em camundongos e macacos (VALDÉS *et al.*, 2011). Por isso, o domínio III da glicoproteína do envelope desempenha um papel crucial na patogênese e na imunidade do dengue e tem sido escolhida como alvo para o desenvolvimento de vacinas.

Quanto à construção dos replicons tetravalente e monovalentes, nossa preocupação inicial era quanto à eficiência de recombinação utilizando um número grande de fragmentos (1 vetor + 5 insertos), que eram necessários à construção do replicon tetravalente. No entanto, esta dificuldade foi superada, visto que, os resultados dos produtos amplificados pela PCR mostraram que foi possível recombinar com sucesso estes seis fragmentos e construir o replicon pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D. A avaliação através da imunofluorescência indireta, realizada 48 horas após a transfecção de células BHK-21 com a construção tetravalente, mostrou a eficiente replicação destes replicons, assim como para os replicons monovalentes.

Uma vez tendo construído os replicons pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D e pBSC_rep_CM_DIII_YFV17D (CMD1-4) e demonstrado a boa eficiência de replicação dos mesmos, indagamos qual seria a melhor maneira de utilizar esta abordagem como vacina. Como já descrito na introdução deste trabalho, a entrega (*delivery*) dos RNAs dos replicons às células hospedeiras pode ser feita de três maneiras: (a) transfecção com o RNA do replicon transcrito *in vitro*; (b) transfecção com o DNA plasmídeo que codifica as seqüências do replicon sob o controle do promotor para a RNA polimerase do tipo II celular e (c) infecção com VLPs (*Virus-Like Particles*) geradas pelo empacotamento do RNA do replicon com proteínas estruturais do vírus fornecidas *in trans* (GEHRKE *et al.*, 2003). No entanto, existem muitos obstáculos para a produção de uma vacina candidata baseada em RNA devido à síntese, estabilidade e mecanismos de imunização (MASON; SHUSTOV; FLOLOV, 2006). As VLPs apresentam um ciclo único de infecção, entregando o replicon nas células alvo e, quando utilizados em células de linhagem que expressam *in trans* as proteínas ausentes no replicon, estes podem ser repetidamente re-empacotados (GEHRKE *et al.*, 2003).

A disponibilidade de linhagens celulares para empacotamento pode facilitar e aumentar a produção de VLPs de flavivírus (GEHRKE *et al.*, 2003). As proteínas de pré-membrana e envelope podem ser expressas separadamente a partir de plasmídeos. O processamento das proteínas estruturais virais expressas pelo plasmídeo acontece como para o vírus selvagem, seguido pelos eventos seqüenciais de empacotamento do genoma do replicon e formação da partícula VLP (YOSHII *et al.*, 2005). Diante disto, com o intuito de realizar o trans-empacotamento dos replicons construídos, foi desenvolvida em nosso laboratório uma linhagem celular (293-YFV-PrM/E), a qual demonstrou uma eficiente expressão constitutiva das proteínas de prM e E do vírus da febre amarela (ALMEIDA *et al.*, dados não publicados).

De acordo com os resultados dos ensaios de trans-complementação, não conseguimos avaliar se houve empacotamento para os replicons testados: pBSC_rep Δ prM-E_YFV_17D, pBSC_rep_CT_DIII_YFV17D ou pBSC_rep_CMD_DIII_YFV17D (CMD1-CMD4). Visto

que, também não foi observada a expressão das proteínas do vírus pBSC_T7_YFV-17D utilizado como controle positivo no teste, associamos mais uma vez, a baixa eficiência de transfecção como um problema para o empacotamento dos nossos replicons. Associado a isto, como já relatado na literatura, os títulos de VLPs coletadas nos sistemas de empacotamento são muito baixos, o que complica a produção em larga escala destas partículas (HARVEY *et al.*, 2004).

Nossos resultados para o desenvolvimento de uma vacina baseada no replicon do vírus da febre amarela que expressam o domínio III do DENV mostraram que é possível utilizar com sucesso, os replicons como vetores vacinais e que estes permitem a expressão de genes heterólogos alvos. No entanto, para conseguirmos avaliar melhor a expressão do domínio III do DENV nos nossos construídos, é preciso desenvolver anticorpos específicos para o DIII de cada sorotipo do vírus dengue, assim como para uma combinação tetravalente destes domínios *in tandem*. Além disto, a produção de VLPs pelo trans-empacotamento em células 293-YFV-PrM/E requer uma maior eficiência de transfecção. Por isso, faz-se necessário aperfeiçoar a técnica utilizada (*Polyfect*) para o uso de RNAs na transfecção de células de mamíferos ou outra técnica de transfecção deve ser considerada, como por exemplo, a eletroporação.

8 CONCLUSÕES

- a) A vacina de DNA baseada em epítomos otimizados de células B e T para o vírus da dengue sorotipo 3 foi construída com sucesso;
- b) A ausência de resposta imune humoral por anticorpos neutralizantes para os construídos deve estar relacionada com um incorreto processamento e ineficiente apresentação dos antígenos clonados;
- c) Foi possível expressar com sucesso, o DIII dos quatro sorotipos do DENV, em conjunto (construção tetravalente) ou isoladamente (construções monovalentes), utilizando os vetores auto-replicativos (replicons), como uma nova tecnologia para o desenvolvimento de vacinas para dengue;
- d) As estratégias para trans-complementação devem ser avaliadas quanto à eficiência de empacotamento para aumentar a produção de VLPs e utilizá-las como vetores vacinais.

9 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar a resposta celular frente ao epítomos de células T mapeados, utilizando camundongos transgênicos que apresentem HLA específico para os epítomos mapeados;

- b) Produzir anticorpos anti-DIII visando avaliar a expressão dos genes alvos expressos pelo replicon, pelas técnicas de Imunofluorescência e *Western Blot*;

- c) Avaliar a resposta humoral das VLPs em camundongos.

REFERÊNCIAS

ABERLE, J. H. *et al.* Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 24, p. 15107-15113, 2005.

ALCON, S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.

AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K. Wanted, dead or alive: new viral vaccines. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 84, p. 119-130, 2009.

ANANDARAO, R.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides. **Virus Research**, Amsterdam, v. 112, n. 1/2, p. 60-68, sept. 2005.

ANRAKU, I. *et al.* Kunjin virus replicon vaccine vectors induce protective CD8+ T-cell immunity. **Journal of Virology**, Washington, 76, n. 8, p. 3791-3799, 2002.

ANSARI, I. H. *et al.* Involvement of a bovine viral diarrhea virus NS5B locus in virion assembly. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 18, p. 9612-23, 2004.

ANWAR, A. *et al.* West Nile pre-membrane-envelope genetic vaccine encoded as a chimera containing the transmembrane and cytoplasmic domains of a lysosome associated membrane protein: increased cellular concentration of the transgene product, targeting to the MHC II compartment, and enhanced neutralizing antibody response. **Virology**, New York, v. 332, n. 1, p. 66-77, 2005.

APT, D. *et al.* Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a single chimeric dengue envelope antigen. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, p. 335-344, 2006.

BADU, J. P. *et al.* Immunogenicity of a recombinant envelope domain III protein of dengue virus type-4 with various adjuvants in mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, n. 36, p. 4655-4663, jul. 2008.

BEASLEY, D. W. C.; AASKOV, J. G. Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies. **Virology**, New York, v. 279, n. 2, p. 447-458, jan. 2001.

BEHRENS, S. E. *et al.*, Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 2364-72, 1998.

BERGMANN, C. C. *et al.* Flanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 8, p. 3242-3249, oct. 1996.

BERNARDO, L. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 80, p. 194-199, 2008.

BHATTACHARYA, D. *et al.* Protein kinase G phosphorylates mosquito-borne flavivirus NS5. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 18, p. 9195-9205, 2009.

BIELEFELDT-OHMANN, H. *et al.* Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. **Journal of General Virology**, London, v. 78, pt. 11, p. 2723-2733, nov. 1997.

BLATTMAN, J. N. *et al.* Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 195, p. 657-664, 2002.

BLANEY, J. E. *et al.* Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. **Viral Immunology**, New York, v. 19, p. 10-32, 2006.

BLANEY, J. E. *et al.* Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 9, p. 5516-5528, 2005.

BLIGHT, K. J.; MCKEATING, J. A.; RICE, C. M. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 24, p. 13001-13014, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de dengue: vigilância epidemiológica e atenção ao doente**. 2. ed. Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima/Brasil**. Brasília, DF, 2010. (Nova técnica, n. 110).

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Isolamento do sorotipo DENV 4 em Manaus/AM**. Brasília, DF, 2011. (Nova técnica, n. 3).

BRAVO, J. R.; GUZMAN, M. G.; KOURI, G. P. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 81, n. 5, p. 816-20, 1987.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A (Ed.). **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 10, p. 107-129.

CALVERT, A. E. *et al.* Non-structural proteins of dengue 2 virus offer limited protection to interferon-deficient mice after dengue 2 virus challenge. **Journal of General Virology**, London, v. 87 (Pt 2), p. 339-346, 2006.

CAPOZZO, A. V. *et al.* Neonatal immunization with a Sindbis virus-DNA measles vaccine induces adult-like neutralizing antibodies and cell-mediated immunity in the presence of maternal antibodies. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, n. 9, p. 5671-5681, 2006.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 3095-3101, 1999.

CHANG, D. C. *et al.* Single-round infectious particles enhance immunogenicity of a DNA vaccine against West Nile virus. **Nature Cell Biology**, London, v. 26, n. 5, p. 571-577, may. 2008.

CHEN, S. *et al.* Induction os Tetravalent Protective Immunity Against Four Dengue Serotypes by Tandem Domain III of the Envelope Protein. **DNA and Cell Biology**, New York, v.26, n. 6, p. 361-367, 2007.

CHIKHILIKAR, P. *et al.* Inverted terminal repeat sequences of adeno-associated virus enhance the antibody and CD8 (+) responses to a HIV-1 p55Gag/LAMP DNA vaccine chimera. **Virology**, New York, v. 323, n. 2, p. 220-232, 2004.

CORDEIRO, M. T. *et al.* Dengue e febre hemorrágica da dengue: um problema global de saúde pública. In: CORDEIRO, M. T. *et al.* **Vinte anos de evolução da dengue no estado de Pernambuco**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2008a. cap.1, p. 13-46.

CORDEIRO, M. T. *et al.* Origem e evolução da dengue em Pernambuco, 1987-1994. In: CORDEIRO, M. T. *et al.* **Vinte anos de evolução da dengue no estado de Pernambuco**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2008b. cap.2, p. 47-60.

CORDEIRO, M. T. *et al.* A dengue em Pernambuco, 1995-2006. In: CORDEIRO, M. T. *et al.* **Vinte anos de evolução da dengue no estado de Pernambuco**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2008c. cap.3, p. 61-108.

COSTA, S. M.; FREIRE, M. S.; ALVES, A. M. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, n 6, p. 1128-1134, 2006.

CRILL, D. W.; CHANG, G. J. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 78, n. 24, p. 13975-13986, dec. 2004.

CHUNG, K. M. *et al.* West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 50, p. 19111-19116, 2006.

DE PAULA, S. O. *et al.* A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. **Archives of Virology**, Wien, v. 153, n. 12, p. 2215-2223, nov. 2008.

DHALIA, R. *et al.* Membrane and envelope virus proteins co-expressed as lysosome associated membrane protein (LAMP) fused antigens: a potential tool to develop DNA vaccines against flaviviruses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 663-669, 2009.

DIEBOLD, S. S. *et al.* Role of TLR3 in the immunogenicity of replicon plasmid-based vaccines. **Gene Therapy**, London, v. 16, p. 359-366, dec. 2009.

DONG, H.; ZHANG, B.; SHI, P. Y. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 1-10, 2008.

DOS SANTOS, F. B. *et al.* Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 71, n. 2, p. 144-152, 2004.

DRAKE, J. R. *et al.* Involvement of MIIC-like late endosomes in B cell receptor mediated antigen processing in murine B cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 162, n. 2, p. 1150-1155, 1999.

EDELMAN, R. *et al.* Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.69, p.48-60, 2003.

FALCONAR, A. K. I. Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. **Archives of Virology**, Wien, v. 144, n. 12, p. 2313-2230, dec. 1999.

FAYZULIN, R. *et al.* Evaluation of replicative capacity and genetic stability of West Nile vírus replicons using highly efficient packaging cell lines. **Virology**, New York, v. 351, p. 196-209, may. 2006.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue: aspectos virológicos, históricos, fisiopatológicos e do controle de epidemias. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 2, p. 111-112, abr./jun. 1991.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil: history, epidemiology and research. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 1, p. 9-16, 1996.

FINLEY, R. L.; BRENT, R. Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 26, p. 12980-12984, 1994.

FRANCIS, M. J. Synthetic Peptides. In: ROBISON, A.; FARRAR, G.; WIBLIN, C. **Methods in Molecular Medicine: Vaccine Protocols**. New Jersey: Human Press, 1996. cap. 6, p. 75-90.

FRANCIS, D.; DOUGLAS, D.; MAHONEY, R. The manufacture and supply of dengue vaccine. **Occasional paper 5**, Seoul, jul.2010.

GEHRKE, R. *et al.* Incorporation of tick-borne encephalitis virus replicons into Virus-Like Particles by a packaging cell line. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 16, p. 8924-8933, may. 2003.

GENEART. **Mapa do plasmídeo sintético pGA15_DENV3_epit_opt**. Regensburg, 2008.

GOLDBERG, S. M. *et al.* Comparison of two cancer vaccines targeting tyrosinase: plasmid DNA and recombinant alphavirus replicon particles. **Journal of Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 11, n. 22, p. 8114-8121, 2005.

GROMOWSKI, G. D.; BARRET, A. D. T. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. **Virology**, New York, v. 366, p. 349-360, 2007.

GUARNIERI, F. G. *et al.* The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 3, p. 1941-6, 1993.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 11, n. 3, p. 480-496, July. 1998.

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

GUIRAKHOO, F. *et al.* Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n.9, p. 4761-4775, 2004.

GUIRAKHOO, F. *et al.* Live attenuated chimeric yellow fever type 2 (ChimeriVax DEN-2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effects of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. **Human Vaccine**, Austin, v.2, p. 60-67, 2006.

GUY, B.; ALMOND, J. W. Towards a dengue vaccine: Progress to date and remaining challenges. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Maryland Heights, v. 31, n. 2-3, p. 239-252, Mar. 2008.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Disease**, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 69-80, Mar. 2004.

HALL, R. A.; KHROMYKH, A. A. West Nile vaccines. **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, v. 4, p. 1295-1305, 2004.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypothesis and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, Yale, v. 42, p. 350, 1970.

HARVEY, T.J. *et al.* Kunjin virus replicon vectors for human immunodeficiency virus vaccine development. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 14, p. 7796-7803, 2003.

HARVEY, T.J., *et al.*, Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles. **Journal of Virology**, Washington, v. 8, n. 1, p. 531-538, 2004.

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

HERD, K. A. *et al.* Recombinant Kunjin virus replicon vaccines induce protective T-cell immunity against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour. **Virology**, New York, v. 319, n. 2, p. 237-248, 2004.

HEVEY, M. *et al.* Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. **Virology**, New York, v. 251, n. 1, p. 28-37, 1998.

HEWER, R.; MEYER, D. Peptide immunogens based on the envelope region of HIV-1 are recognized by HIV/AIDS patient polyclonal antibodies and induce strong humoral immune responses in mice and rabbits. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 327-335, oct. 2003.

HOMBACH, J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. **Pan American Journal of Public Health**, Washington, v. 21, n. 4, p. 254-260, april. 2007.

HUANG, J. H. *et al.* Identification of immunodominant, group-specific and subcomplex-specific, continuous epitopes in the core regions of Japanese encephalitis virus using synthetic peptides. **Virus Research**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 43-53, mar. 1996.

HUANG, J. H. *et al.* Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-8, jan. 1999.

HUANG, C. Y. *et al.* Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 21, p. 11436-11447, 2003.

INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE. Brasília, DF: Ministério da Saúde, semana epidemiológica 1 a 52, 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>>. Acesso em: 5 jan. 2010.

INFORME EPIDEMIOLÓGICO DA DENGUE. Brasília, DF: Ministério da Saúde, semana epidemiológica 52, 2010. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm>>. Acesso em: 5 jan. 2010.

ISSUR, M. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. **Rna**, New York, v. 15, n. 3, p. 2340-2350, 2009.

JANEWAY, C. A. *et al.* Apresentação de antígeno para os Linfócitos T. In: _____. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. Porto Alegre : Artmed, 2002. cap 5, p. 117-206.

JANSEN, E. M. *et al.* CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. **Nature**, London, v. 421, n. 6925, p. 852-856, 2003.

JOHNSON, A. J.; ROEHRIG, J. T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, n. 1, p. 783-786, 1999.

JONES, C. T.; PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Construction and applications of yellow fever virus replicons. **Virology**, New York, v. 331, n. 2, p. 247-259, 2005.

JONES, M. *et al.* Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 9, p. 5414-5420, 2005.

KAO, C. L. *et al.* Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taiwan, v. 38, n. 1, p. 5-16, feb. 2005.

KAPLAN, G.; RACANIELLO, V. R. Construction and characterization of poliovirus subgenomic replicons. **Journal of Virology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1687-1696, 1998.

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

KHANAM, S. *et al.* Induction of neutralizing antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 74, n.2, p. 266-277, 2006.

KHANAM, S. *et al.* An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. **BioMed Central Biotechnology**, London, v. 7, n.10, feb. 2007.

KHANAM, S. *et al.* An adenovirus type 5 (AdV5) vector encoding an envelope domain III-based tetravalent antigen elicits immune responses against all four dengue viruses in the presence of prior AdV5 immunity. **Vaccine**, Amsterdam, v. 27, p. 6011-6021, aug. 2009.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 1497-505, 1997.

KHROMYKH, A. A.; VARNAVSKI, A. N.; WESTAWAY, E. G. Encapsulation of the flavivirus kunjin replicon RNA by using a complementation system providing kunjin virus structural proteins in trans. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, p. 5967-5977, 1998.

KHROMYKH, A. A., Replicon-based vectors of positive strand RNA viruses. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, London, v. 2, n. 5, p. 555-569, 2000.

KIRMAN, J. R. *et al.* Enhanced immunogenicity to Mycobacterium tuberculosis by vaccination with an alphavirus plasmid replicon expressing antigen 85A. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 1, p. 575-579, 2003.

KITCHENER, S. *et al.* Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, p. 1238-1241, 2006.

KLEIJMEER, M. J., *et al.*, Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblast represent conventional endocytic compartments. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 139, n. 3, p.639-649, 1997.

KOCHEL, T. *et al.* Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 547-552, apr. 1997.

KOFLER, R. M. *et al.* Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 101, n. 7, p.1951-1956, 2004.

KORBER, B.; LABUTE, M.; YUSIM, K. Immunoinformatics comes of age. **PLoS Computational Biology**, San Francisco, v. 2, n. 6, p. 71-78, june. 2006.

LANE, R. S. Competence of ticks as vectors of microbial agents with an emphasis on *Borrelia burgdorferi*. In: SONENSHINE, D. E.; MATHER, T. N. (Ed.) **Ecological dynamics of tick-borne zoonoses**. Oxford: Oxford University, 1994. p. 45-67.

LAURENT-ROLLE, M. *et al.* The NS5 protein of the virulent West Nile virus NY99 strain is a potent antagonist of type I interferon-mediated JAK-STAT signaling. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, n. 7, p. 3503-3515, 2010.

LEE, J. S.; HADJIPANAYIS, A. G.; WELKOS, S. L. Venezuelan equine encephalitis virus-vectored vaccines protect mice against anthrax spore challenge. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1491-6, 2003.

LEITMEYER, K. C. *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, june. 1999.

LENG, C. -H. *et al.* A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. **Microbes and Infection**, Paris, p. 1-8, 2009.

LESCAR, J. *et al.* Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case of the multifunctional NS3 protein from dengue virus as a target. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 94-101, 2008.

LEUNG, J. Y. *et al.* Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 10, p. 4731-4741, 2008.

LIN, K.Y. *et al.* Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 56, n. 1, p. 21-26, 1996.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H-J.; RICE, C. M. Flaviviruses: the virus and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1, p. 1102-1152.

LIU, I. J. *et al.* Disease-specific B cell epitopes for serum antibodies from patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) and serologic detection of SARS antibodies by epitope-based peptide antigens. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 190, n. 4, p. 797-809, aug. 2004.

LIU, S. J. *et al.* Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, n. 16, p. 3100-3108, apr. 2006.

LIU, Z.; WANG, Z.; CHEN, Y-H. Predefined apcers between epitopes on a recombinant epitope-peptide impacted epitope-specific antibody response. **Immunology Letters**, Rome, v. 97, p. 41-45, 2005.

LOHMANN, V. *et al.* Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. **Science**, New York, v. 285, n. 5424, p. 110-113, 1999.

LOWENBERG-NETO, P.; NAVARRO-SILVA, M. First report of *Aedes albopictus* in the state of Santa Catarina, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 246-247, apr. 2002.

LU, Y. *et al.* Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, n. 17- 8, p. 2178-89, 2003.

MAECKER, H.T. *et al.* Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via class II MHC. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 161, n. 12, p. 6532-6536, 1998.

MAHONEY, R. Dengue vaccine adoption in developing countries: some cost and financing issues. **Occasional paper 1**, Seoul, jul.2010.

MARTINA, B. E. *et al.* Immunization with West Nile virus envelope domain III protects mice against lethal infection with homologous and heterologous virus. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, p. 153-157, 2008.

MASON, P, W.; SHUSTOV, A. V.; FROLOV, I. Production and characterization of vaccines based on flaviviruses defective in replication. **Virology**, New York, v. 351, p. 432-443, may. 2006.

MASSÉ, N. *et al.* Dengue virus replicons: production of an interserotypic chimera and cell lines from different species, and establishment of a cell-based fluorescent assay to screen inhibitors, validated by the evaluation of ribavirin's activity. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 296-305, jun. 2010.

MATHEWS, J. H. *et al.* A synthetic peptide to the E glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus defines multiple virus-reactive T- and B-cell epitopes. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 66, n. 11, p. 6555-6562, nov. 1992.

MATHEW, A. *et al.* Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 98, n. 7, p. 1684-1691, oct. 1996.

MATHEW, A. *et al.* Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 72, n. 5, p. 3999-4004, may. 1998.

MAURER, R. *et al.* Oronasal vaccination with classical swine fever virus (CSFV) replicon particles with either partial or complete deletion of the E2 gene induces partial protection against lethal challenge with highly virulent CSFV. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, n. 25, p. 3318-3328, 2005.

MCKNIGHT, K. L.; LEMON, S. L. Capsid coding sequence is required for efficient replication of human rhinovirus 14 RNA. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1941-1952, 1996.

MEGEDE, J. Z. *et al.* Evaluation of human immunodeficiency virus type 1 subtype C gag, pol, and gagpol DNA and alphavirus replicon vaccines. **Vaccine**, Amsterdam, v. 24, n. 15, p. 2755-2763, 2006.

MIAGOSTOVICH, M. P. *et al.* Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirao Preto, v. 35, n. 8, p. 869-872, aug. 2002.

MILLER, S. *et al.* The non-structural protein 4a of dengue virus is an integral membrane protein during inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 12, p. 8873-8882, 2007.

MODIS, Y. *et al.* Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 79, n. 2, p. 1223-1231, jan. 2005.

MONATH, T. P. Dengue and Yellow Fever-Challenges for the Development and Use of Vaccines. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, p. 2222-2225, nov. 2007.

MOTA, J. *et al.* Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, n. 26, p. 3469-3476, 2005.

MOSIMANN, A. L. P. *et al.* Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 163, p. 147-152, sep. 2010.

MOUDGIL, K. D. *et al.* Modulation of the immunogenicity of antigenic determinants by their flanking residues. **Immunology Today**, v. 19, n. 5, p. 217-220, may. 1998.

MUNOZ-JORDAN, J. L. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flavivirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 13, p. 8004-8013, 2005.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 1, p. 13-22, jan. 2005.

MURPHY; CHANOCK. The Immune Response to Viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fundamental Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 11, p. 285-320.

NORDSTROM, E. K. *et al.* Enhanced immunogenicity using an alphavirus replicon DNA vaccine against human immunodeficiency virus type 1. **Journal of General Virology**, London, v. 86, n. Pt 2, p. 349-354, 2005.

OBERMULLER, S. *et al.*, The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. **Journal of Cell Science**, Washington, 115, Pt 1, p. 185-194, 2002.

OLINGER, G. G. *et al.* Protective cytotoxic T-cell responses induced by venezuelan equine encephalitis virus replicons expressing Ebola virus proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 22, p. 14189-96, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle**. Genebra, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue**: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, 2009.

PANG, X.; ZHANG, M.; DAYTON, A. I. Development of dengue virus replicons expressing HIV-1 gp120 and other heterologous genes: a potential future tool for dual vaccination against dengue virus and HIV. **BMC Microbiology**, London, v. 1, p. 28, 2001a.

PANG, X.; ZHANG, M.; DAYTON, A. I. Development of Dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. **BMC Microbiology**, London, v. 1, p. 18, 2001b.

PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Yellow fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 7, p. 3342-3352, 2008.

PORTER, K. R. *et al.* Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. **Archives of Virology**, Wien, v. 143, n. 5, p. 997-1003, apr. 1998.

PUSHKO, P. *et al.* Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. **Virology**, New York, v. 239, n. 2, p. 389-401, 1997.

PUTNAK, R. *et al.* An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, Amsterdam, n. 23, p. 4442-4452, 2005.

RAMANATHAN, M. P. *et al.* Development of a novel DNA SynCon tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. **Vaccine**, Amsterdam, v. 27, n. 46, p. 6444-6453, oct. 2009.

RANDOLPH, V. B., WINKLER, G.; STOLLAR, V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. **Virology**, New York, v. 174, n. 2, p. 450-458, feb. 1990.

RAVIPRAKASH, K. *et al.* Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. **Virology**, New York, v. 290, n. 1, p. 74-82, nov. 2001.

RAY, D. *et al.* West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. **Journal of Virology**, Washington, v. 80, n. 17, p. 8362-8370, 2006.

REY, F. A. *et al.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, London, v. 375, n. 6529, p. 291-298, may 1995.

ROEHRIG, J. T.; BOLIN, R. A.; KELLY, R. B. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**, New York, v. 246, n. 2, p. 317-328, july 1998.

ROEHRIG, J. T. *et al.* Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. **Virology**, New York, v. 177, n. 2, p. 668-675, aug. 1990.

ROEHRIG J. T. Immunochemistry of dengue viruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.) **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. London: CABI Publishing, 1997. chap. 10, p. 199-219.

ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 26, n. 3, p. 337-343, may 1977.

ROHRER, J. *et al.* The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 132, n.4, p. 565-76, 1996.

ROWELL, J.F. *et al.*, Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 155, n. 4, p. 1818-28, 1995.

RUFF, A. L. *et al.* The enhanced immune response to the HIV gp160/LAMP chimeric gene product targeted to the lysosome membrane protein trafficking pathway. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n.13, p. 8671-8678, 1997.

RUSSEL, P. K. *et al.* A plaque reduction test for dengue virus neutralization antibodies. **Jornal of Immunology**, Bethesda, v. 99, n. 2, p. 285-290. 1967.

- SABCHAREON, A. *et al.* Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.66, n.3, p.264-272, 2002.
- SAHA, S.; BHASIN, M.; RAGHAVA, G. P. S. Bcipep: A database of B-cell epitopes. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 79, p. 1471-2164, may 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SEGURA, M. N. O. *et al.* Encontro de *Aedes albopictus* no Estado do Pará, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 388-389, jun. 2003.
- SELIGMAN, S. J.; GOULD, E. A. Live flavivirus vaccines: reasons for caution. **TheLancet**, London, v. 363, p. 2073-2075, 2004.
- SERAFIN, I. L.; AASKOV, J. G. Identification of epitopes on the envelope (E) protein of dengue 2 and dengue 3 viruses using monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, Wien, v. 146, n. 12, p. 2469-2479, dec. 2001.
- SE-THOE, S. Y.; NG, M. M.; LING, A. E. Retrospective study of Western blot profiles in immune sera of natural dengue virus infections. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 57, n. 3, p. 322-30, mar. 1999.
- SHI, P.Y.; TILGNER, M.; LO, M. K. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. **Virology**, New York, v. 296, n. 2, p. 219-233, 2002.
- SILVA, A. N. M. R. *et al.* Identification os continuous human B-cell epitopes in the envelope glycoprotein of dengue virus type 3 (DENV-3). **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 10, oct. 2009. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0007425>>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- SIMMONS, M. *et al.* Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 58, n. 5, p.655-662, 1998.

SIMMONS, M.; MURPHY, G.S.; HAYES, C. G. *et al.* Short report: Antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 65, n. 2, p. 159-161, 2001.

SONESHINE, D. E.; MATHER, T. N. **Ecological dynamics of tick-borne zoonoses**. Oxford: Oxford University, 1994.

SIMMONS, C. P. *et al.* Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 79, n. 9, p. 5665-5675, may 2005.

SU, Z. *et al.*, Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 62, n. 17, p. 5041-8, 2002.

TAKAHASHI, I. *et al.* Epitope analysis of antibodies in Japanese to human cytomegalovirus phosphoprotein 150 with synthetic peptides. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, n. 11, p. 2402-2405, nov. 2002.

TANNIS, L. L., *et al.*, Semliki forest virus and Kunjin virus RNA replicons elicit comparable cellular immunity but distinct humoral immunity. **Vaccine**, Amsterdam, p. 23, n. 33, p. 4189-4194, 2005.

THOMAS, C. E. *et al.* Vaccination of mice with gonococcal TbpB expressed in vivo from Venezuelan equine encephalitis viral replicon particles. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 3, p. 1612-1620, 2006.

THOMSON, S. A. *et al.* Minimal epitopes expressed in a recombinant polyepitope protein are processed and presented to CD8+ cytotoxic T cells: implications for vaccine design. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 92, p. 5845-5849. 1995.

THULLIER, P. *et al.* Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 8, p. 1885-1892, aug. 2001.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. T. *et al.* Dengue. In: LEÃO, R. N. Q. (Ed.) **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: Cejup, 1997. p. 227-241.

TURLEY, S. J. *et al.* Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. **Science**, New York, v. 288, n. 5465, p. 522-527, 2000.

TZENG, W. P. *et al.* Rubella virus DI RNAs and replicons: requirement for nonstructural proteins acting in cis for amplification by helper virus. **Virology**, New York, v. 289, n. 1, p. 63-73, 2001.

UMAREEDY, I. *et al.* Dengue virus NS4b interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **The Journal of General Virology**, London, v. 87, n. Pt 9, p. 2605-2614, 2006.

VALDES, K. *et al.* Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Bethesda, v. 7, p. 856-857, 2000.

VALDÉS, I. *et al.* The chimeric protein domain III-capsid of DEN-2 successfully boosts neutralizing antibodies generated in monkeys upon infection with DEN-2 virus. **Clinical and vaccine immunology**, Washington. Article in Press. 2011.

VÁZQUEZ, S. *et al.* Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. **Vaccine**, Amsterdam, v. 20, n. 13/14, p. 1823-1830, mar. 2002.

WANG, X. *et al.* Alphavirus replicon particles containing the gene for HER2/neu inhibit breast cancer growth and tumorigenesis. **Breast Cancer Research**, London, v. 7, n. 1, p. R145-155, 2005.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understand the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, London, v. 9, p. 523-540, 2009.

WEBSTER, D. P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. **The Lancet**, London, v. 9, p. 678-687, nov. 2009.

WELSH, R. M.; FUJINAMI, R. S. Pathogenic epitopes, heterologous immunity and vaccine design. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 555-563, jul. 2007.

WILLIAMS, C. R. *et al.* The extinction of dengue through natural vulnerability of its vectors. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, issue 2, dec. 2010.

WISSEMAN, C. L. Prophylaxis of dengue, with special reference to live virus vaccine. **Proceedings of the Japanese Society for Tropical Medicine**, Nagasaki, v. 7, p. 51-56, 1996.

WHITE, L. J. *et al.* An immunogenic and protective alphavirus replicon particle-based dengue vaccine overcomes maternal antibody interference in weanling mice. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 19, p. 10329-10339, jul. 2007.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews-Microbiology**, London, v. 5, p. 518-528, 2007.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, n. 27-30, p. 4307-4316, 2003.

WU, H. C. *et al.* Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. **Journal of General Virology**, London, v. 84, n. 10, p. 2771-2779, oct. 2003.

WU, H. C. *et al.* Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 39, n. 3, p. 977-982, mar. 2001.

XIONG, C. *et al.* Sindbis virus: an efficient, broad host range vector for gene expression in animal cells. **Science**, New York, p. 243, n. 4895, p. 1188-1191, 1989.

YAMADA, K. I. *et al.* Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 203-209, apr. 2002.

YOSHII, K. *et al.* Packaging the replicon RNA of the Far-Eastern subtype of tickborne encephalitis virus into single-round infectious particles: development of a heterologous gene delivery system. **Vaccine**, Amsterdam, v. 23, n. 30, p. 3946-3956, 2005.

ZABEREZHNYI, A. D. The technology of recombinant infectious genomes in studies of RNA-containing viruses. **Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologia, I Virusologia**, Moskva, n. 4, p. 13-19, 2004.

ZHANG, Z.-S. *et al.* High-level expression of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein and induction of neutralizing antibodies in BALB/C mice. **Journal of Virological Methods**, London, v.143, p. 125-131. 2007.

ZIVNY, J. *et al.* Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 5, p. 2754-2760, sept. 1999.

ANEXO A- Otimização genética dos epítomos selecionados utilizando o software Leto 1.0.



Sequence comparison

Created with Leto 1.0

1 General Information:

Gene: Compare III RS_without
 Optimization requested by:
 Date: Mar 12, 2008
 Operator: Sabrina Almeida
 Target organism: Homo sapiens 50%
 Optimization iteration: 1
 Length: 2298 bp

1.1 Sequence

Below the original sequence and optimized sequence are listed, labelled with 'Org:' and 'Opt:' respectively. Where both are identical, the original sequence contains dots instead of nucleotides ('.'). Where the original sequence was locked against editing, it contains underscores ('_'). The names of the restriction enzymes start at the first nucleotide after the restriction cut in the forward strand.

```

      5    10    15    20    25    30    35    40    45    50
ORF:                M  V  S  I  I  N  K  R  K  K  T  S
Org: .....  ....  ....  ... ..G ... ..A ...  ...  ... C.. ..A ... ..A ..G
Opt: GTCGA CGCTA GCACC ATG GTT AGC ATC ATC AAC AAA AGG AAG AAG ACC TCA
      SalI  NheI
  
```

```

      55    60    65    70    75    80    85    90    95
ORF:  L  C  L  M  M  I  L  P  A  A  L  A  L  E  Q  K
Org: C.C ... ..C ...  ... ..A T.. ..A ..A ..A ..T ..T ...  ... ..G ...
Opt: TTG TGT CTG ATG ATG ATT CTG CCT GCC GCT CTG GCC CTC GAG CAA AAG
                        XhoI
  
```

```

     100   105   110   115   120   125   130   135   140   145
ORF:  T  E  A  T  Q  L  A  T  L  R  K  L  C  I  E  G
Org:  ...  ... ..C ...  ... ..A T.. ..G ...  ... ..A ...  ... ..T ..G ..G
Opt:  ACC GAG GCA ACC CAG CTG GCC ACC CTG AGG AAG CTG TGC ATA GAA GGC
  
```


580 585 590 595 600 605 610 615 620 625
 ORF: G A L K C R L K M D K L E L K G
 Org: ..A ..C T.. ..A ..T A.A ..TC ..A T.. ..A ..C ..G ..G
 Opt: GGG GCA CTG AAG TGC CGT CTG AAG ATG GAT AAG CTG GAG CTG AAA GGC

630 635 640 645 650 655 660 665 670 675
 ORF: M S Y A M C T N T F V L K K E V
 Org:T ..AGT ... T..A ..A ..C
 Opt: ATG AGC TAC GCC ATG TGC ACC AAT ACC TTC GTG CTG AAG AAG GAG GTG

680 685 690 695 700 705 710 715 720
 ORF: S E T Q H T A N P V V T K K E E
 Org: TCAGTC ..CTG
 Opt: AGT GAA ACC CAG CAC ACA GCT AAT CCA GTG GTG ACC AAG AAA GAG GAG

725 730 735 740 745 750 755 760 765 770
 ORF: P V N I E A E P P F G E S N W V
 Org:C ..TT ..A ..T ..TA ..T ..TA
 Opt: CCT GTG AAC ATT GAG GCC GAG CCG CCC TTT GGG GAG AGC AAC TGG GTG

775 780 785 790 795 800 805 810 815
 ORF: M K I G I G V L L T W I G L N S
 Org:A ..C ..A ..AT ..C T.. ..TG T.. ..T ..A
 Opt: ATG AAG ATT GGG ATC GGA GTC CTG CTG ACC TGG ATA GGA CTG AAC TCT

820 825 830 835 840 845 850 855 860 865
 ORF: K N T S M S F S C I A I G I I T
 Org: ..A ..CC ... TCA ... TCATT ..A
 Opt: AAG AAT ACA TCA ATG AGC TTT AGC TGC ATA GCG ATA GGA ATC ATC ACG

870 875 880 885 890 895 900 905 910 915
 ORF: L Y L G A V V Q A D M G C V A D
 Org: ..C ..T ..G ..A ..TT ..CATC
 Opt: CTG TAC CTT GGC GCA GTG GTG CAA GCC GAT ATG GGT TGT GTG GCA GAT

920 925 930 935 940 945 950 955 960
 ORF: S P K R L A T A I A G A W E N G
 Org: ..C ..A ..A A.. T.. ..G ..A ..C ..T ..A ..CG ..T ..A
 Opt: TCT CCG AAG CGA CTG GCC ACG GCA ATC GCT GGA GCT TGG GAA AAC GGC

965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010
 ORF: V C G I R S T T R M E N L L W K
 Org:CT A.. TCA ..AAG ..T ..CG
 Opt: GTG TGT GGA ATA CGG AGC ACC ACC AGG ATG GAA AAC CTT CTG TGG AAA

1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055
 ORF: Q I A N E L N Y I L W E N N I K
 Org: ..A ..AT ..AA T..TA
 Opt: CAG ATT GCC AAC GAG CTG AAC TAC ATC CTG TGG GAA AAC AAC ATC AAG

1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105
 ORF: L T V V V G D I I G V L E Q G K
 Org: T.A ..G ..AGA ..T ..G ..C T.AA ..A ...
 Opt: CTG ACT GTG GTT GTT GGC GAT ATC ATA GGC GTG CTT GAG CAG GGG AAA

1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155
 ORF: R T L T P Q P M E L K Y S W K T
 Org:A C.A ..A ..AG ..A ..A ... TCAG
 Opt: AGA ACT TTG ACT CCT CAA CCC ATG GAA CTG AAG TAC AGC TGG AAA ACA

1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200
 ORF: W G K A K I V T A E T Q N S S F
 Org:G ..A ..A ..A ..GTA ..A ..T TC.
 Opt: TGG GGA AAA GCG AAG ATC GTT ACA GCG GAA ACC CAG AAC AGC TCT TTC

1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250
 ORF: I I D G P N T W L K L R E V Y T
 Org: ..A ..AG ..GAGC C.AC ..C
 Opt: ATC ATC GAC GGC CCT AAC ACG TGG CTC AAA CTG AGG GAG GTG TAT ACG

1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295
 ORF: Q L C D H R L M S A A V K D E R
 Org: ..A ..A ..TA ... TCG ..A ..T ..CT
 Opt: CAG CTG TGC GAC CAT AGG CTG ATG AGC GCT GCC GTG AAG GAC GAG AGG

1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345
 ORF: A V H A D M G Y W I E S W S N G
 Org:A ..TCA ..A ..CT ..T ..T
 Opt: GCC GTG CAC GCC GAT ATG GGC TAT TGG ATT GAG AGT TGG AGC AAC GGG

1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395
 ORF: V L E S D M I I P K S L A G P I
 Org: ..G ..A ... AGTAAT ..T ...
 Opt: GTT CTG GAG TCC GAT ATG ATC ATC CCT AAG AGT CTC GCT GGA CCC ATT

1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440
 ORF: S Q H N H R P G Y H T Q T A G P
 Org: TCG ..ACC ..GC ..G ..G ..G
 Opt: AGC CAG CAC AAT CAC AGG CCT GGC TAC CAC ACG CAA ACA GCC GGA CCC

1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490
 ORF: W H L G K C E G T T V V I T E N
 Org:T T.A ..A ..A ..TAA ..T ..CA
 Opt: TGG CAC CTG GGC AAG TGC GAA GGG ACA ACC GTG GTG ATC ACC GAA AAC

1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535
 ORF: C G T R G P S L R T T T V S G K
 Org: ..T ..G ..AA ... T.. A.. ..A ..A ..A ... TCA ..G ...
 Opt: TGC GGA ACG AGA GGC CCC TCA CTG CGA ACC ACC ACC GTG AGC GGA AAG

1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585
 ORF: L I H E W C C R S C T L P P L R
 Org: T.A ..A ..C ..AT ..C ..T TCGA ..T ..T ... T.. C..
 Opt: CTG ATT CAT GAG TGG TGC TGT CGA AGC TGC ACG CTG CCC CCC CTG AGA

1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635
 ORF: Y M G E D G C W Y G M E I R P I
 Org:A ..CCCA
 Opt: TAC ATG GGA GAG GAT GGT TGT TGG TAT GGA ATG GAA ATC AGG CCC ATC

1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680
 ORF: S E R L S A Q W Q K G E E V Q V
 Org: AG.A T..A ..AA ..G ..GGT
 Opt: TCT GAG AGG CTG AGC GCT CAG TGG CAG AAA GGA GAG GAA GTG CAG GTG

1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730
 ORF: I A V E P G K N P K N P D G P T
 Org: ..T ..C ..AGC ..AC ..A ..TG ..A
 Opt: ATC GCG GTG GAG CCT GGC AAG AAT CCT AAG AAT CCC GAC GGA CCA ACG

1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775
 ORF: P E L E E E M F K K R N L T I M
 Org: ..A ..A T.. ..A ..AAAA ..C ..A ...
 Opt: CCT GAG CTG GAG GAG GAG ATG TTC AAG AAG CGC AAT CTT ACT ATC ATG

1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825
 ORF: D L H P G S G K T R K Y S P V R
 Org: ... C.TT ..G TCA ..A ..G ..A C.. ..A ... TCAT ...
 Opt: GAT TTG CAT CCC GGT AGC GGC AAA ACT AGG AAG TAC AGC CCA GTG AGG

1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875
 ORF: V P N Y N L I I M D E A H F T D
 Org: ..T ..AT ..C T.G ..A ..AT ..A ..C ..TA ..C
 Opt: GTG CCG AAC TAC AAT CTT ATC ATC ATG GAC GAG GCT CAC TTC ACC GAT

1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920
 ORF: P A S I A A R G Y I S T R L R K
 Org:T ..A ..G ..T ..A ..GA ..G ... C.T T.. C.A ..A
 Opt: CCA GCC AGC ATT GCT GCC AGG GGC TAC ATC TCC ACT AGG CTG AGG AAG

1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970
 ORF: N G K K V I Q L S R K T F D T E
 Org:AC ..TT ..TG ..T ..T ..CA
 Opt: AAC GGG AAG AAG GTG ATA CAA CTG AGC AGG AAA ACA TTC GAT ACA GAG

1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015
 ORF: Y Q K T K L N D W D F V V T T D
 Org: ..T ..G ..A ..TT ..TCA ..T ...
 Opt: TAC CAA AAG ACC AAA CTG AAC GAC TGG GAC TTT GTG GTG ACC ACA GAC

2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065
 ORF: I S E M G A N F K A D R V I D P
 Org: ..T ..AG ..C ..TA ..T ..AC ..A
 Opt: ATA TCC GAA ATG GGT GCA AAC TTC AAA GCC GAC AGG GTG ATC GAT CCC

2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115
 ORF: R R C L K P L N N D E D H A H W
 Org: ..A ..A ..T ..C ..ACT ..T ..AT
 Opt: AGG AGG TGC CTG AAG CCA CTG AAC AAC GAC GAG GAC CAC GCT CAC TGG

2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160
 ORF: T E A K M L L D N I N T P E G I
 Org: ..AA ..AG ..CTA ..AG ...
 Opt: ACT GAA GCT AAG ATG CTG CTT GAT AAC ATC AAT ACT CCC GAA GGA ATC

2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210
 ORF: I P A L F E P E R E K S A A I D
 Org: ..A ..A ..T ..CG ..A ..A ..G ..G ... TCA ..CA ...
 Opt: ATC CCG GCA CTG TTT GAA CCC GAG AGA GAA AAG AGT GCA GCC ATT GAC

2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255
 ORF: G E Y R L K G E S R K T F V E L
 Org:G ..T C.C T..T ..GCA ..C
 Opt: GGT GAA TAC AGG CTG AAA GGC GAA TCC AGG AAG ACT TTT GTG GAG CTG

```

2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295
ORF:  M   R   R   G   D   L   P   E   F   !
Org:  ... ..G ..G ..T ... ..T ..A ... ..
Opt:  ATG AGA AGA GGC GAC CTG CCT GAA TTC TGA TAAGG TACC
                                     EcoRI           KpnI
    
```

1.1.1 Restriction table

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
EcoRI	g'aatt_c	1	2280
KpnI	g_gtac'c	1	2292
NheI	g'ctag_c	1	6
Sall	g'tcga_c	1	0
XhoI	c'tcga_g	1	87

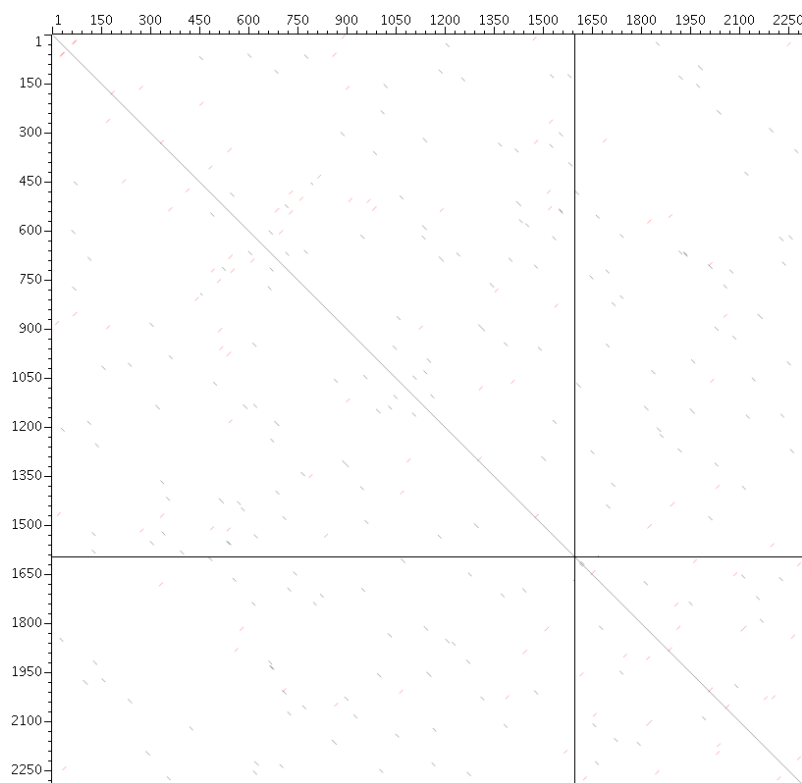
1.1.2 Enzymes that cut five or fewer times

Enzyme	Recognition	Frequency	Positions
EcoRI	g'aatt_c	1	2280
KpnI	g_gtac'c	1	2292
NheI	g'ctag_c	1	6
Sall	g'tcga_c	1	0
XhoI	c'tcga_g	1	87

1.1.3 Enzymes that do not cut

None.

1.2 Dotplot



1.3 ORFs

The gene was optimized using the following ORF(s). Please note that sequence positions are given relative to the continuous DNA sequence defined by all ORFs:

ORF: 16-2289

2 Optimized parameters

2.1 Codon tandem repeats

Number of codon tandem repeats:

Original sequence: 23

Optimized sequence: 31

Position	Number of repeats
[9]	2
[24]	2
[45]	2
[192]	2
[282]	2
[315]	2
[438]	2
[516]	3

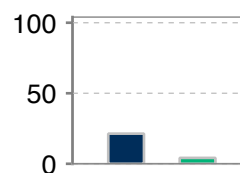
[648]	2
[687]	2
[702]	2
[777]	2
[843]	2
[867]	2
[966]	2
[1032]	2
[1053]	2
[1188]	2
[1350]	2
[1458]	2
[1503]	3
[1560]	2
[1725]	3
[1740]	2
[1830]	2
[1914]	2
[1989]	2
[2052]	2
[2073]	2
[2145]	2
[2247]	2

2.2 Codon Usage

This is a comparison of the codon frequency of the original sequence vs. the optimized sequence. As a reference, the codon usage of the target organism is included. The charts indicate the sum of the deviation from the target codon usage, for the original and the optimized sequence. Lower bars indicate a better match with the target codon usage.

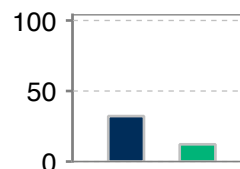
2.2.1 A - Alanine:

Codon	Original	Target	Optimized
GCU	25.5 %	26.0 %	27.7 %
GCC	29.8 %	40.0 %	40.4 %
GCA	29.8 %	22.0 %	21.3 %
GCG	14.9 %	12.0 %	10.6 %



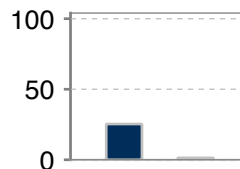
2.2.2 C - Cysteine:

Codon	Original	Target	Optimized
UGU	61.1 %	45.0 %	38.9 %
UGC	38.9 %	55.0 %	61.1 %



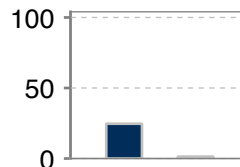
2.2.3 D - Aspartic acid:

Codon	Original	Target	Optimized
GAU	33.3 %	46.0 %	46.7 %
GAC	66.7 %	54.0 %	53.3 %



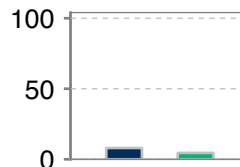
2.2.4 E - Glutamic acid:

Codon	Original	Target	Optimized
GAA	53.3 %	41.0 %	41.7 %
GAG	46.7 %	59.0 %	58.3 %



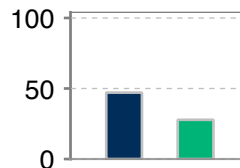
2.2.5 F - Phenylalanine:

Codon	Original	Target	Optimized
UUU	50.0 %	46.0 %	43.8 %
UUC	50.0 %	54.0 %	56.2 %



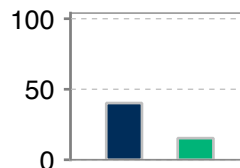
2.2.6 G - Glycine:

Codon	Original	Target	Optimized
GGU	12.7 %	16.0 %	14.5 %
GGC	12.7 %	33.0 %	38.2 %
GGA	41.8 %	24.0 %	32.7 %
GGG	32.7 %	27.0 %	14.5 %



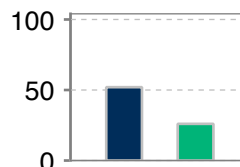
2.2.7 H - Histidine:

Codon	Original	Target	Optimized
CAU	61.1 %	41.0 %	33.3 %
CAC	38.9 %	59.0 %	66.7 %



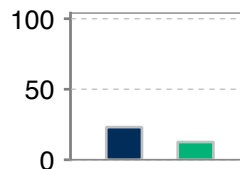
2.2.8 I - Isoleucine:

Codon	Original	Target	Optimized
AUU	26.0 %	35.0 %	22.0 %
AUC	30.0 %	47.0 %	58.0 %
AUA	44.0 %	18.0 %	20.0 %



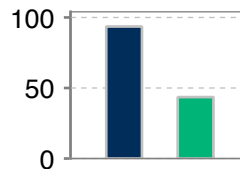
2.2.9 K - Lysine:

Codon	Original	Target	Optimized
AAA	53.6 %	42.0 %	35.7 %
AAG	46.4 %	58.0 %	64.3 %



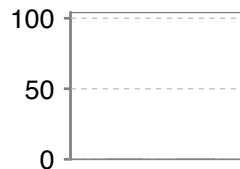
2.2.10 L - Leucine:

Codon	Original	Target	Optimized
UUA	6.3 %	0.0 %	0.0 %
UUG	33.3 %	12.0 %	4.8 %
CUU	11.1 %	13.0 %	9.5 %
CUC	20.6 %	19.0 %	7.9 %
CUA	17.5 %	0.0 %	0.0 %
CUG	11.1 %	56.0 %	77.8 %



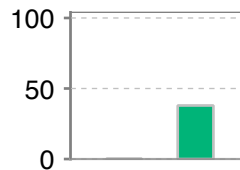
2.2.11 M - Methionine:

Codon	Original	Target	Optimized
AUG	100.0 %	100.0 %	100.0 %



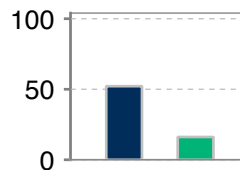
2.2.12 N - Asparagine:

Codon	Original	Target	Optimized
AAU	45.9 %	46.0 %	27.0 %
AAC	54.1 %	54.0 %	73.0 %



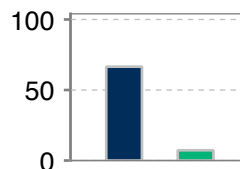
2.2.13 P - Proline:

Codon	Original	Target	Optimized
CCU	32.4 %	28.0 %	29.7 %
CCC	13.5 %	32.0 %	37.8 %
CCA	48.6 %	27.0 %	18.9 %
CCG	5.4 %	13.0 %	13.5 %



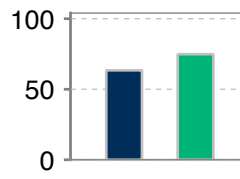
2.2.14 Q - Glutamine:

Codon	Original	Target	Optimized
CAA	59.3 %	26.0 %	29.6 %
CAG	40.7 %	74.0 %	70.4 %



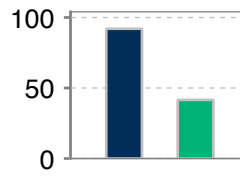
2.2.15 R - Arginine:

Codon	Original	Target	Optimized
CGU	5.7 %	8.0 %	2.9 %
CGC	2.9 %	18.0 %	2.9 %
CGA	11.4 %	10.0 %	11.4 %
CGG	5.7 %	20.0 %	2.9 %
AGA	42.9 %	20.0 %	20.0 %
AGG	31.4 %	24.0 %	60.0 %



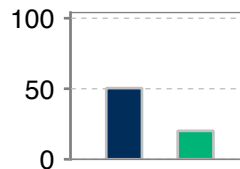
2.2.16 S - Serine:

Codon	Original	Target	Optimized
UCU	2.8 %	18.0 %	11.1 %
UCC	11.1 %	21.0 %	13.9 %
UCA	38.9 %	15.0 %	11.1 %
UCG	16.7 %	0.0 %	0.0 %
AGU	19.4 %	14.0 %	11.1 %
AGC	11.1 %	32.0 %	52.8 %



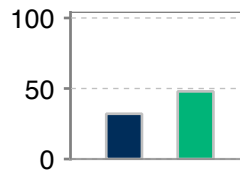
2.2.17 T - Threonine:

Codon	Original	Target	Optimized
ACU	14.5 %	24.0 %	19.4 %
ACC	21.0 %	35.0 %	43.5 %
ACA	53.2 %	28.0 %	22.6 %
ACG	11.3 %	13.0 %	14.5 %



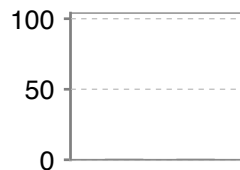
2.2.18 V - Valine:

Codon	Original	Target	Optimized
GUU	19.1 %	18.0 %	12.8 %
GUC	19.1 %	23.0 %	4.3 %
GUA	14.9 %	0.0 %	0.0 %
GUG	46.8 %	59.0 %	83.0 %



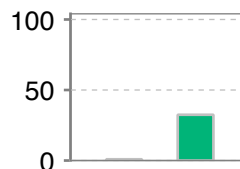
2.2.19 W - Tryptophan:

Codon	Original	Target	Optimized
UGG	100.0 %	100.0 %	100.0 %



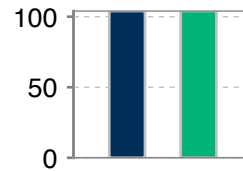
2.2.20 Y - Tyrosine:

Codon	Original	Target	Optimized
UAU	44.4 %	44.0 %	27.8 %
UAC	55.6 %	56.0 %	72.2 %



2.2.21 ! - Stop:

Codon	Original	Target	Optimized
UAA	0.0 %	28.0 %	0.0 %
UGA	100.0 %	48.0 %	100.0 %
UAG	0.0 %	24.0 %	0.0 %

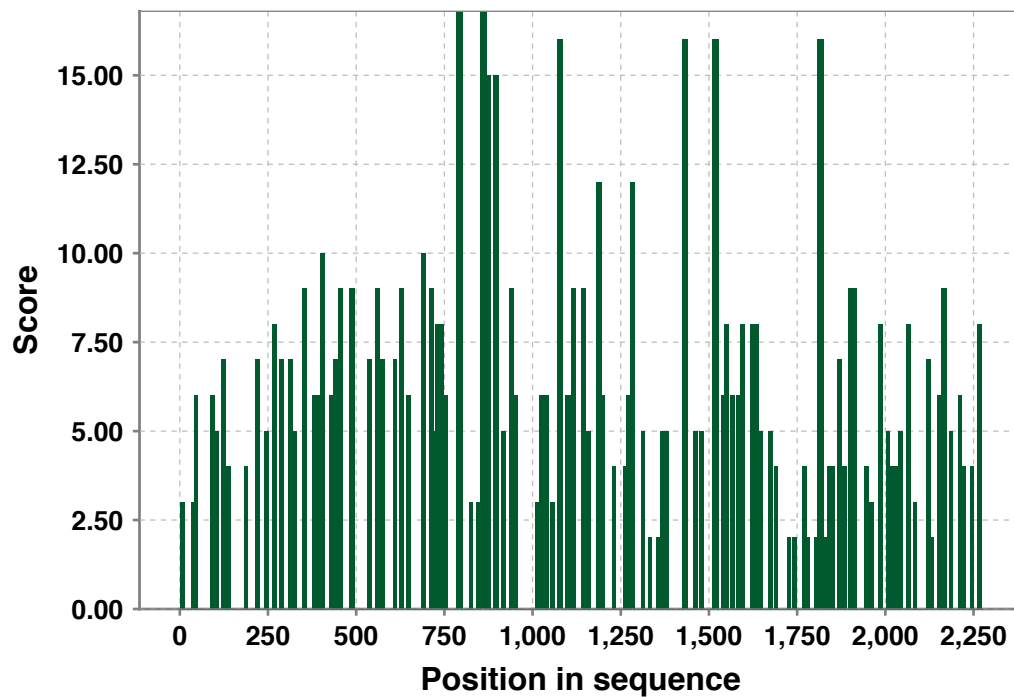


2.3 Secondary structure

In general, an extended secondary structure of the mRNA can interfere with the translation process. Therefore, the gene optimization tries to reduce the number and length of potential hairpin loops.

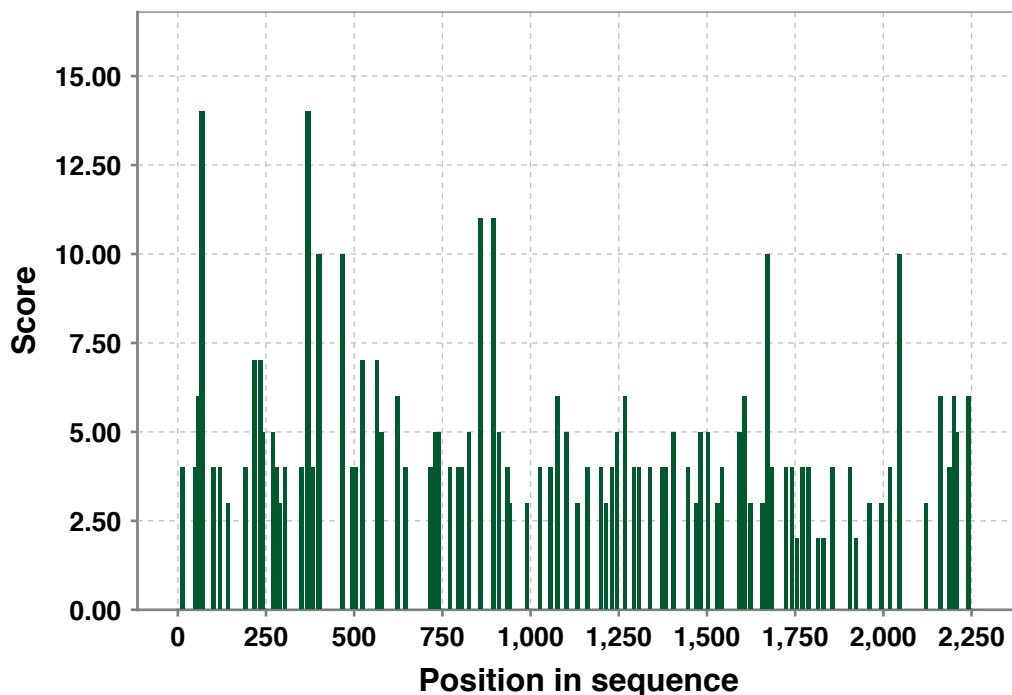
2.3.1 Original sequence

Number of helices	54
Average helix length	6.35
Maximum helix length	12
Average helix score	6.61



2.3.2 Optimized sequence

Number of helices	45
Average helix length	5.40
Maximum helix length	8
Average helix score	4.87



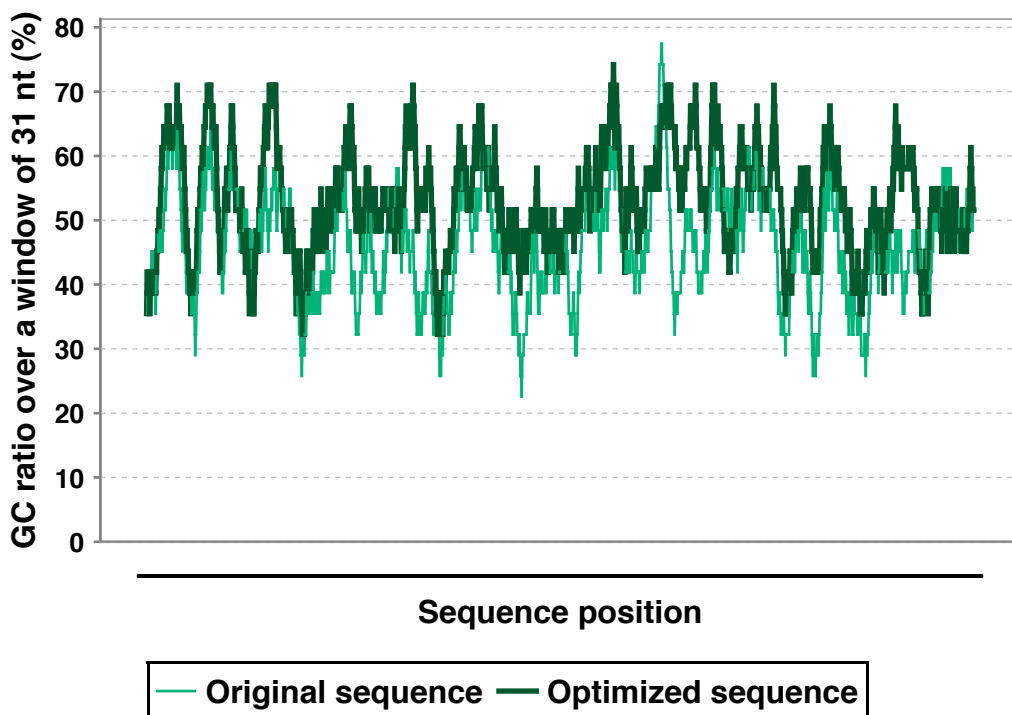
2.4 GC distribution

GC ratio over a window of 31 nt:

Original sequence: 46.09% (22.58% - 77.42%)

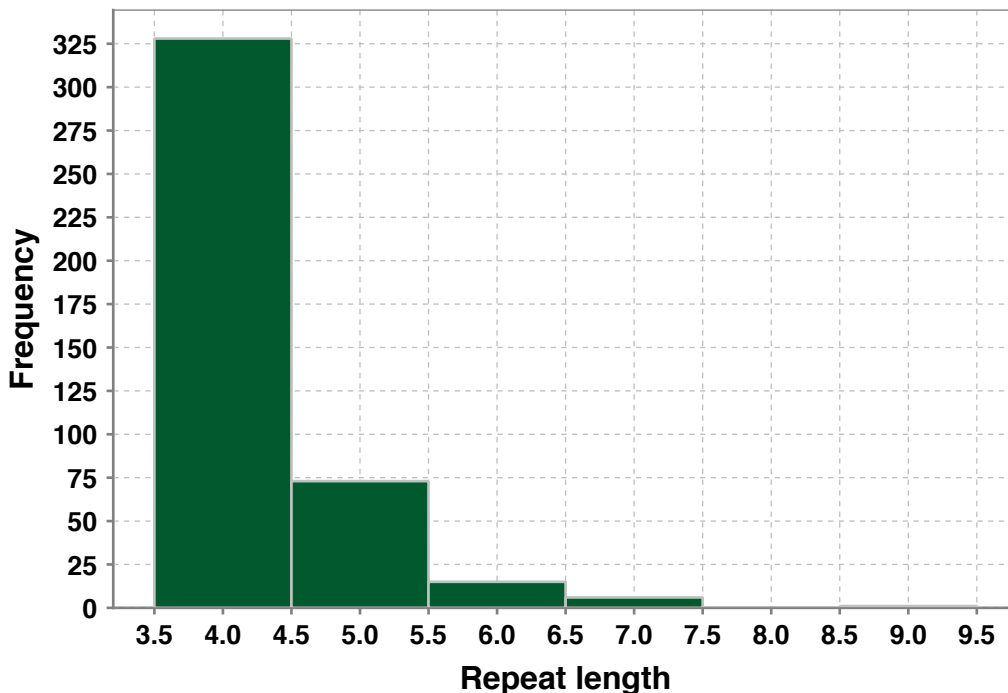
Optimized sequence: 52.90% (32.26% - 74.19%)

The number indicate the average GC content. The values in brackets indicate the interval containing 95% of all nucleotides if the GC content is averaged over a window of 11 nucleotides.



2.5 Long range repeats

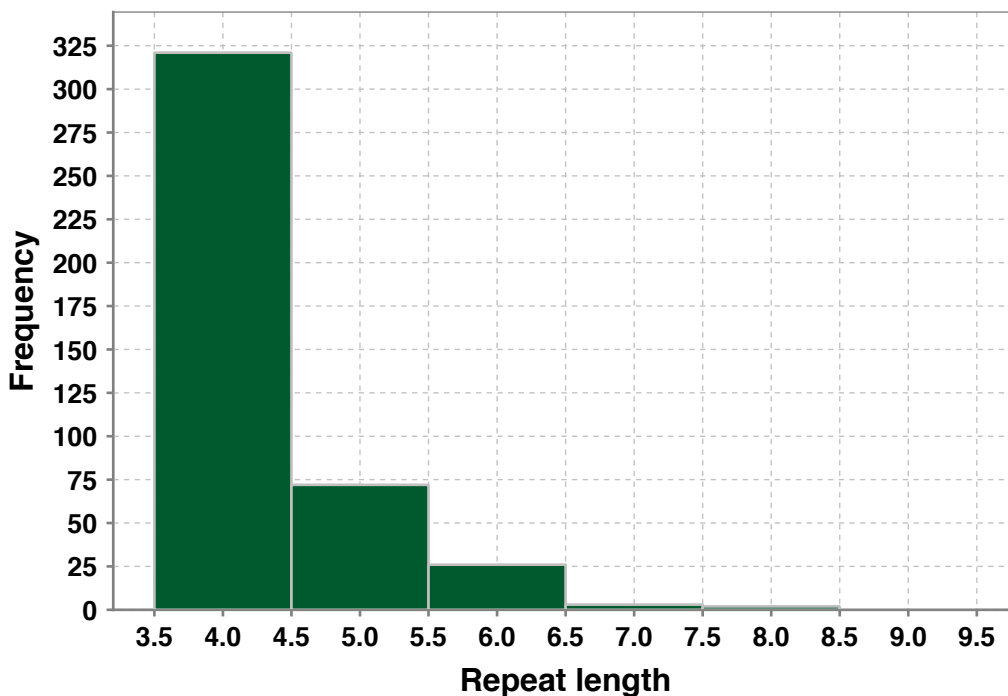
2.5.1 Original sequence



Number of repeats: 423

Longest repetitive sequence: 9 bases

2.5.2 Optimized sequence



Number of repeats: 424

Longest repetitive sequence: 8 bases

2.6 Secondary ORFs

During the optimization, secondary ORFs were removed. These are ORFs in the second or third frame or on the opposite strand. The removal was done by inserting stop codons by silent mutagenesis, or by changing start codons. The optimization tries to avoid secondary ORFs with more than 50 nucleotides.

2.6.1 Original sequence:

Number of secondary ORFs: 84
 Total length of sec. ORFs: 2232
 Number of ORFs with >50nt: 12

2.6.2 Optimized sequence:

Number of secondary ORFs: 46
 Total length of sec. ORFs: 1281
 Number of ORFs with >50nt: 6

2.7 Restriction sites

The table lists the unwanted restriction sites contained in the sequence, as well as their positions.

Enzyme	Positions in original sequence	Positions in optimized sequence
EcoRI	3	1
KpnI	1	0
NheI	0	0
Sall	0	0
XhoI	1	1

2.8 Cryptic splice sites

The following table shows possible splice sites in the specified sequence. The score is relative to the range between the best-scoring and worst-scoring splice sites in the training set.

2.8.1 Splice sites in original sequence

Type	Position	Relevance
Acceptor	346	Possible
Acceptor	896	Possible
Acceptor	972	Possible
Acceptor	1193	Possible
Acceptor	1718	Possible
Acceptor	1781	Likely
Acceptor	1786	Possible
Donor	1595	Likely
Donor	1778	Likely

Donor	1883	Likely
Donor	2180	Likely
Donor	2197	Likely
Donor	2201	Likely

2.8.2 Splice sites in optimized sequence

Type	Position	Relevance
Donor	1806	Possible

2.9 AT/GC stretch restrictor

2.9.1 Original sequence

Number of stretches longer than 4 nt: 52

Average AT/GC stretch length: 5.67

2.9.2 Optimized sequence

Number of stretches longer than 4 nt: 23

Average AT/GC stretch length: 5.48

3 Optimized sequence

This is the optimized sequence, ready for copying and pasting into other applications.

```
GTCGA CGCTA GCACC ATGGT TAGCA TCATC AACAA AAGGA AGAAG ACCTC
ATTGT GTCTG ATGAT GATTG TGCCT GCCGC TCTGG CCCTC GAGCA AAAGA
CCGAG GCAAC CCAGC TGGCC ACCCT GAGGA AGCTG TGCAT AGAAG GCAAG
ATTAC CAACA TTACA ACCGA TAGCA GGTGT CCGAC ACAGG GAGAA GCCGT
CCTGC CCGAG GAGCA GGACC AGAAC TACGT GTGCA AACAT ACTTA CGTGG
ACCGA GGGTG GGGTA ACGGT TGTGG CCTGT TTGGA AAAGA GGGCA AAGTG
GTGCA GTATG AAAAC CTGAA GTATA CCGTG ATCAT CACCG TGCAT ACTGG
CGACC AGCAC CAGGT GGGCA ACGAG ACCCA GGGCG TGACC GCTGA GATAA
CACCT CAAGC ATCCA CTACG GAAGC TATAC TGCCA GAGTT CAATG AAATG
ATCCT GCTGA CAATG AAAAA CAAAG CGTGG ATGGT TCACA GACAG TGTTT
CTTTG ATCTC CCACA CGCCA AGAAA CAAGA AGTGG TGGTG CTGGG TTCAC
AGGAA GGAGC AATGC ATACA GCCCT CACCG GGGCA CTGAA GTGCC GTCTG
AAGAT GGATA AGCTG GAGCT GAAAG GCATG AGCTA CGCCA TGTGC ACCAA
TACCT TCGTG CTGAA GAAGG AGGTG AGTGA AACCC AGCAC ACAGC TAATC
CAGTG GTGAC CAAGA AAGAG GAGCC TGTGA ACATT GAGGC CGAGC CGCCC
TTTGG GGAGA GCAAC TGGGT GATGA AGATT GGGAT CGGAG TCCTG CTGAC
CTGGA TAGGA CTGAA CTCTA AGAAT ACATC AATGA GCTTT AGCTG CATAG
CGATA GGAAT CATCA CGCTG TACCT TGGCG CAGTG GTGCA AGCCG ATATG
GGTTG TGTGG CAGAT TCTCC GAAGC GACTG GCCAC GGCAA TCGCT GGAGC
```

TTGGG AAAAC GCGGT GTGTG GAATA CGGAG CACCA CCAGG ATGGA AAACC
TTCTG TGGAA ACAGA TTGCC AACGA GCTGA ACTAC ATCCT GTGGG AAAAC
AACAT CAAGC TGA CT GTGGT TGTTG GCGAT ATCAT AGGCG TGCTT GAGCA
GGGGA AAAGA ACTTT GACTC CTCAA CCCAT GGAAC TGAAG TACAG CTGGA
AAACA TGGGG AAAAG CGAAG ATCGT TACAG CGGAA ACCCA GAACA GCTCT
TTCAT CATCG ACGGC CCTAA CACGT GGCTC AA ACT GAGGG AGGTG TATAC
GCAGC TGTGC GACCA TAGGC TGATG AGCGC TGCCG TGAAG GACGA GAGGG
CCGTG CACGC CGATA TGGGC TATTG GATTG AGAGT TGGAG CAACG GGGTT
CTGGA GTCCG ATATG ATCAT CCCTA AGAGT CTCGC TGGAC CCATT AGCCA
GCACA ATCAC AGGCC TGGCT ACCAC ACGCA AACAG CCGGA CCCTG GCACC
TGGGC AAGTG CGAAG GGACA ACCGT GGTGA TCACC GAAAA CTGCG GAACG
AGAGG CCCCT CACTG CGAAC CACCA CCGTG AGCGG AAAGC TGATT CATGA
GTGGT GCTGT CGAAG CTGCA CGCTG CCCCC CCTGA GATAC ATGGG AGAGG
ATGGT TGTTG GTATG GAATG GAAAT CAGGC CCATC TCTGA GAGGC TGAGC
GCTCA GTGGC AGAAA GGAGA GGAAG TGCAG GTGAT CGCGG TGGAG CCTGG
CAAGA ATCCT AAGAA TCCCG ACGGA CCAAC GCCTG AGCTG GAGGA GGAGA
TGTTT AAGAA GCGCA ATCTT ACTAT CATGG ATTTG CATCC CGGTA GCGGC
AAAAC TAGGA AGTAC AGCCC AGTGA GGGTG CCGAA CTACA ATCTT ATCAT
CATGG ACGAG GCTCA CTTCA CCGAT CCAGC CAGCA TTGCT GCCAG GGGCT
ACATC TCCAC TAGGC TGAGG AAGAA CGGGA AGAAG GTGAT ACAAC TGAGC
AGGAA AACAT TCGAT ACAGA GTACC AAAAG ACCAA ACTGA ACGAC TGGGA
CTTTG TGGTG ACCAC AGACA TATCC GAAAT GGGTG CAAAC TTCAA AGCCG
ACAGG GTGAT CGATC CCAGG AGGTG CCTGA AGCCA CTGAA CAACG ACGAG
GACCA CGCTC ACTGG ACTGA AGCTA AGATG CTGCT TGATA ACATC AATAC
TCCCG AAGGA ATCAT CCGG CACTG TTTGA ACCCG AGAGA GAAAA GAGTG
CAGCC ATTGA CGGTG AATAC AGGCT GAAAG GCGAA TCCAG GAAGA CTTTT
GTGGA GCTGA TGAGA AGAGG CGACC TGCCT GAATT CTGAT AAGGT ACC