

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Nathalia Rocha Quintino Souza

**INVESTIGAÇÃO DE DIVERSOS BIOMARCADORES EM UMA LINHAGEM
CELULAR DIFERENCIADA EM MACRÓFAGOS PARA O DESENVOLVIMENTO
DE UM ENSAIO DE POTÊNCIA ALTERNATIVA PARA VACINA ATENUADA
CONTRA DENGUE**

Rio de Janeiro

2018

Nathalia Rocha Quintino Souza

INVESTIGAÇÃO DE DIVERSOS BIOMARCADORES EM UMA LINHAGEM
CELULAR DIFERENCIADA EM MACRÓFAGOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE
UM ENSAIO DE POTÊNCIA ALTERNATIVA PARA VACINA ATENUADA CONTRA
DENGUE

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Souza, Nathalia

INVESTIGAÇÃO DE DIVERSOS BIOMARCADORES EM UMA LINHAGEM CELULAR DIFERENCIADA EM MACRÓFAGOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DE POTÊNCIA ALTERNATIVA PARA VACINA ATENUADA CONTRA DENGUE. / Nathalia Souza. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

91 f. : il. ; fig. ; graf. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadora: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Dengue. 2. Macrophages. 3. Vaccine. I. Título.

INVESTIGATION OF DIVERSE BIOMARCANTS IN A DIFFERENTIATED CELLULAR LINEAGE IN MACROPHAGES FOR THE DEVELOPMENT OF AN ALTERNATIVE POWER TEST FOR ATTENUATED VACCINE AGAINST DENGUE.

Nathalia Rocha Quintino Souza

**INVESTIGAÇÃO DE DIVERSOS BIOMARCADORES EM UMA LINHAGEM
CELULAR DIFERENCIADA EM MACRÓFAGOS PARA O DESENVOLVIMENTO
DE UM ENSAIO DE POTÊNCIA ALTERNATIVA PARA VACINA ATENUADA
CONTRA DENGUE**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rodrigo da Cunha Bisaggio (Doutor)

Instituto Federal do Rio de Janeiro – Campus Maracanã

Elzinandes Leal de Azeredo (Doutora)

Instituto Oswaldo Cruz

Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (Doutora) – Orientadora

Instituto Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por todas as bênçãos concedidas em minha vida.

A minha orientadora, Dr^a Ana Cristina Nogueira (Tininha), por todos os seus ensinamentos, não só contribuindo para minha formação profissional, mas também em minha formação pessoal. Obrigada por compartilhar suas experiências, por seus conselhos e por me mostrar os benefícios da meditação.

Agradeço ao Laboratório de Imunologia Viral, em especial a Dr^a. Elzinandes Azeredo, pela doação do vírus 0337.

Agradeço ao Dr. Fausto Ferraris, pela revisão deste trabalho, além da colaboração para realização dos experimentos com iNOS.

Agradeço ao Laboratório de Vacinas Virais, no Setor de Cultura de células do INCQS, em especial ao Marcelo, pela realização dos testes de micoplasmas nas células utilizadas.

Agradeço a Mariana Gandini, da plataforma de citometria de fluxo do Pavilhão Hanseníase, IOC, pela doação do anticorpo anti-TLR2.

Agradeço a Plataforma de citometria de fluxo do Pavilhão Leônidas Deahne, em especial a Thaize Quiroga.

Agradeço as alunas de doutorado, Renata Carvalho e Stephanie Cruz, por todo apoio e empréstimo de material durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, pois sem eles não teria chegado até aqui. Em especial ao meu pai, Hamilton Souza, por incentivar meu crescimento e fazer tudo que estava ao seu alcance para que eu realizasse meus sonhos e objetivos.

Aos meus irmãos, Leticia, Ronald, Hiago e Alice, que são minha inspiração e meus maiores fãs e incentivadores.

A toda minha família, por sempre acreditar em mim.

Agradeço ao meu namorado, Eduardo Fonseca, por todo apoio durante essa difícil fase profissional.

Aos meus queridos amigos, por compartilharem seu tempo, histórias e planos junto de mim.

A todos os meus professores que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e profissional.

A toda equipe do Laboratório de Imunologia Clínica, por terem me acolhido junto da equipe.

Muito obrigada!

Fazer, todos os dias, as mesmas coisas e esperar resultados diferentes é a maior prova de insanidade.

Albert Einstein

RESUMO

Neste presente trabalho buscamos investigar biomarcadores em uma linhagem celular diferenciada em macrófagos para um modelo *in vitro* de infecção pelo vírus Dengue 2 (DENV-2) com a finalidade de desenvolver um método alternativo para avaliar a potência de vacinas de vírus atenuados, como a vacina da dengue. Para tal, utilizamos a linhagem celular monocítica THP-1, diferenciada em macrófagos (moTHP-1), que foram infectados com DENV-2, além da vacina comercial atenuada Dengvaxia®, que contém os quatro sorotipos da Dengue. As moTHP-1 foram estimuladas com IFN- γ /LPS e IL-4/IL-13 para polarização nos perfis de macrófagos clássico (M1) e alternativo (M2), respectivamente. Além disso, moTHP-1 não estimuladas foram infectadas com diferentes diluições tanto com o DENV-2 quanto com a vacina comercial contra a Dengue. Para avaliar os perfis M1 e M2 usamos os marcadores de superfície CD86 e TLR2, além de medir a concentração de Óxido Nítrico (NO), através da dosagem de nitrito. Observamos que as células diferenciadas para o perfil M2 apresentaram uma menor mediana de intensidade de fluorescência (M.I.F.) de TLR2 quando comparadas com o perfil M1. As moTHP-1 infectadas com o vírus DENV-2 ou com a vacina apresentaram alteração nas moléculas de superfície (CD86 e TLR2) utilizadas, indicando que tanto o vírus quanto a vacina foram capazes de modular esses receptores, quando comparadas com as moTHP-1 estimuladas com IFN- γ /LPS ou IL-4/IL-13. Observamos que as moTHP-1 infectadas com o vírus DENV-2 ou com a vacina apresentaram diferenças na expressão dos efetores antivirais investigados neste trabalho (OAS1-3, RNase L, MxA e EIF2 α K2). Verificamos também a possibilidade dessas proteínas (OAS1-3, RNase L, MxA e EIF2 α K2) e dos receptores de superfície (TLR2 e CD86) serem usados como biomarcadores para um ensaio de potência alternativo para vacinas de vírus atenuados e apontamos o TLR2 como possível candidato, pois este apresentou o melhor padrão de linearidade.

Palavras-chave: THP-1. Macrófagos. Polarização. Dengue.

ABSTRACT

In this work, we aimed to investigate biomarkers in a macrophage differentiated cellular lineage as an in vitro model for dengue virus 2 infection (DENV-2). The final goal is to develop an alternative method for evaluating the potency of attenuated virus vaccines, such as the dengue vaccine. For this purpose, we used the monocytic THP-1 cellular lineage, differentiated in macrophages (mo THP-1), which were infected by DENV-2 and by a live attenuated commercially available Dengue vaccine. moTHP-1 were stimulated with IFN/LPS or IL4/13 attempting to polarize the cells to the classic macrophage M1 or to the alternative M2 profile respectively. Moreover, non-stimulated moTHP-1 were infected by different DENV-2 or vaccine dilutions. In order to determine the M1 or M2 profiles we used the surface markers CD86 and TLR2 and we measured indirectly the iNos concentration in the supernatant of cultures. We observed that the cells stimulated to the M2 profile showed less percentage of positivity to TLR2 when compared to the cells stimulated to a M1 profile. The DENV-2 or vaccine infected moTHP-1 showed an alteration in the pattern of expression of the surface markers (CD86 and TLR2), suggesting that both the virus and vaccine modulated the expression of these receptors in these cells, when compared to the stimulated moTHP-1 controls. We also observed that DENV-2 or vaccine infected moTHP-1 showed differences in the percentage of some of the here investigated antiviral effector proteins (OAS 2, OAS 3, MXa and EIF2aK2). Finally, we verified the possibility to use one or more of these proteins as an endpoint of an alternative potency assay and we figured the TLR2 receptor as a possible candidate.

Key-words: THP-1. Macrophage. Polarization. Dengue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de casos de dengue suspeitos ou confirmados por laboratório notificados à OMS, 1990–2015	24
Figura 2 - Número médio de casos suspeitos ou confirmados de dengue informados à OMS, 2010-2016	25
Figura 3 - Ciclo replicativo do vírus da Dengue.	27
Figura 4 - Estrutura e gnoma do DENV	28
Figura 5 - Via de ativação da OAS e RNaseL	33
Figura 6 - Mecanismo de ação da EIF2 α K2.....	34
Figura 7 - Mecanismo de ação da MxA	35
Figura 8 - Diferentes tipos de macrófagos e seus produtos secretados	36
Figura 9 - Gráficos originais de citometria de fluxo diferenciação de células THP-1 em macrófagos através do tratamento com PMA	52
Figura 10 - Expressão de TLR2, CD86 e iNOS em células moTHP-1 estimuladas com IFN- γ /LPS ou IL-4/IL-13	54
Figura 11 - OAS 1-3, EIF2 α K2, MxA e RNaseL em moTHP-1	55
Figura 12 - Box-plot mostrando a mediana geométrica da mediana de intensidade de fluorescência MIF da proteína NS-1 em moTHP-1 infectadas com DENV2 0337 ...	52
Figura 13 - Expressão de membrana de TLR2 X CD86 em moTHP-1 infectadas com DENV-2	58
Figura 14 - Perda na expressão de TLR2 em moTHP-1 infectadas com DENV-2 ..	59
Figura 15 - Histogramas representativos originais de citometria de fluxo mostrando a marcação intracelular de diversos efetores antivirais induzidos por interferon do tipo 1 em moTHP-1 infectadas com DENV-2	60
Figura 16 - Histograma representativo de citometria de fluxo mostrando a marcação intracelular de EIF2 α K2 em moTHP-1 infectadas com DENV-2	61
Figura 17 - Box plot das porcentagens de EIF2 α K2 em moTHP-1 infectada com DENV-2	62
Figura 18 - Anti-NS-1 DENV-2 em amostra de vacina comercial e vírus DENV-2....	63
Figura 19 - Box plot das porcentagens de TLR2 em moTHP-1 infectadas com a vacina comercial e com o vírus DENV-2	64
Figura 20 - Valores de OAS2, 3 e MxA em moTHP-1 infectadas com vacina X DENV-2	65

Figura 21 - EIF2 α K2 como biomarcador para ensaio de potência alternativo com DENV-2	66
Figura 22 - EIF2 α K2 como biomarcador para ensaio de potência alternativo com a vacina comercial	67
Figura 23 - TLR2 como biomarcador para ensaio de potência alternativo com DENV-2	68
Figura 24 - TLR2 como biomarcador para ensaio de potência alternativo com a vacina comercial contra Dengue	68

LISTA DE ESQUEMAS E FÓRMULA

Fórmula 1 - Contagem de células viáveis na Câmara de Neubauer	40
Esquema 1 - Preparação da diluição seriada em megaplacas	43
Esquema 2 - Distribuição das diluições virais para titulação em microplacas	44
Esquema 3 - Diluição do vírus 0337 e da vacina comercial contra Dengue	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vacinas tetravalentes contra a dengue	30
Tabela 2 - Lista de anticorpos utilizados	42
Tabela 3 - CCID _{50%} das amostras de vacina e vírus DENV-2. Resultados expressos em log ₁₀ CCID _{50%} /amostra em ensaio realizado em células VERO e analisado no programa CombiStat	50

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

Apêndice A - Produção de NO em THP-1 e macrófagos diferenciados de THP-1 ..	84
Apêndice B - Expressão de EIF2 α K2 em THP-1 não diferenciadas	85
Apêndice C - Tabela com os valores de significância relativos a Figura 16	86
Apêndice D - Tabela com as porcentagens das proteínas OAS1-3, MxA, RNase L e NS-1 em moTHP-1 infectadas com o vírus DENV-2	87
Anexo A - Contagem de células viáveis na Câmara de Neubauer	88
Anexo B - Preparação da diluição seriada em megaplaças	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE - “antibody dependent enhancement”
CCID_{50%} - Dose capaz de infectar 50% da cultura de células
CCR7 - receptor de quimiocina C-C do tipo 7
CD86 - Grupo de Diferenciação 86
CO₂ - Dióxido de Carbono
DENV - Vírus da Dengue
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EMCV - vírus da encefalomiocardite murina
EUA - Estados Unidos da América
FcγR - receptores Fcγ
FHD - Febre Hemorrágica do Dengue
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FRhL - células de pulmão de feto de macacos rhesus
FSC - Forward Scatter
GSK - GlaxoSmithKline
IFN - Interferon
IL-10 - Interleucina dez
IL-12 - Interleucina doze
IL-13 - Interleucina treze
IL-1β - Interleucina um beta
IL-4 - Interleucina quatro
IL-6 - Interleucina seis
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
iNOS - óxido nítrico sintase induzível
IOC - Instituto Oswaldo Cruz
ISG - Genes estimulados por Interferon
LPS - Lipopolissacarídeo
M0s - Macrófagos
MEM - Meio Essencial Mínimo
MoTHP-1 - THP-1 diferenciada em macrófagos
MS - Ministério da Saúde
NO - óxido nítrico

NRAs - Autoridades Reguladoras Nacionais
OAS - Oligoadenilato Sintetase
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PBMC - Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR - Reação da Cadeia da Polimerase
PDK - células renais de cães
PFA - Paraformaldeído
PMA - Forbol Miristato Acetato
PNI - Programa Nacional de Imunização
PROTEÍNA E - Proteína do envelope
PROTEÍNA NS - Proteína não estrutural
PROTEÍNA prM/M - Proteína pré-membrana/membrana
PRR - Receptores de Reconhecimento Padrão
RE - Retículo Endoplasmático
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
SCD - Síndrome do Choque do Dengue
SFB - Soro Fetal Bovino
SSC - Size SCatter
ssRNA - Ácido Ribonucleico simples fita
SUS - Sistema Único de Saúde
THP-1 - Linhagem celular monocítica humana
VERO - células renais de macacos
VISA - Vigilância Sanitária
WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 ASPECTOS GERAIS DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA	20
1.2 VACINAS	22
1.2.1 Controle de qualidade	22
1.2.2 Ensaio de potência	24
1.3 DENGUE	27
1.3.1 Epidemiologia da Dengue	27
1.3.2 O patógeno	30
1.3.3 Vacinas contra a Dengue	33
1.3.4 Patogênese e imunologia da Dengue	35
1.3.4.1 <i>Efetores antivirais</i>	36
1.4 MACRÓFAGOS	39
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 METODOLOGIA	44
4.1 CULTURA DE CÉLULAS	44
4.2 VÍRUS E VACINA	45
4.3 ANTICORPOS UTILIZADOS	46
4.4 PROPAGAÇÃO DO VÍRUS DENGUE 2	46
4.5 DETERMINAÇÃO DA CCID50% DO VÍRUS DENV-2 E DA VACINA PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA	47
4.6 DIFERENCIAÇÃO DA LINHAGEM MONOCÍTICA THP-1 EM MACRÓFAGOS	49
4.7 INFECÇÃO DAS CÉLULAS PELO VÍRUS DENV-2 E PELA VACINA	49
4.8 ESTIMULAÇÃO DOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DE THP-1 PARA OS DIFERENTES PERFIS DE POLARIZAÇÃO	50
4.9 OBSERVAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE EM MACRÓFAGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	50
4.10 ANÁLISE DE PROTEÍNAS INTRACELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO	51

4.11 DETECÇÃO DE NITRATO PELA TÉCNICA DE GRIESS	52
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5 RESULTADOS	54
5.1 CCDI _{50%} DOS VÍRUS E VACINA	54
5.2 DIFERENCIAÇÃO DA LINHAGEM THP-1 EM MACRÓFAGOS	55
5.3 ESTUDO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE DE MEMBRANA E EFETORES ANTIVIRAIS EM MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1	56
5.3.1 Expressão de TLR2, CD86 e iNOS em macrófagos	57
5.3.2 OAS 1-3, EIF2 α K2, MxA e RNase L em moTHP-1 M1/M2	59
5.4 ESTUDO DOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE DE MEMBRANA, ÓXIDO NÍTRICO E NS-1 EM CÉLULAS INFECTADAS COM DENV-2 CEPA 0337	60
5.4.1 Modulação da expressão de membrana de TLR2 pelo vírus DENV-2	60
5.5 ESTUDO DOS EFETORES ANTIVIRAIS EM CÉLULAS INFECTADAS COM DENV-2 CEPA 0337	63
5.6 AS moTHP-1 INFECTADAS COM A VACINA COMERCIAL CONTRA DENGUE	66
5.6.1 Expressão de membrana de TLR2 em moTHP-1 infectadas com vacina X DENV-2	67
5.6.2 Efeitos antivirais em moTHP-1 infectadas com vacina X DENV-2	68
5.7 BIOMARCADORES PARA ENSAIO DE POTÊNCIA ALTERNATIVO	69
5.7.1 EIF2 α K2 como biomarcador para o vírus ou vacina	70
5.7.2 TLR2 como biomarcador para o vírus ou vacina	71
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÕES	78
8 PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	86
ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho, buscamos elaborar um método alternativo para avaliar a potência de vacinas de vírus atenuados, como a vacina da dengue. Para tal, utilizamos a linhagem celular monocítica THP-1, diferenciada em macrófagos, que foram infectados com cepa brasileira do vírus dengue-2 e tiveram seus fenótipos e características avaliadas para determinar se haveria uma relação entre a infecção, a expressão de moléculas associadas à diferenciação de macrófagos e os efetores antivirais. Para um melhor entendimento deste tema segue-se uma introdução sucinta sobre a contextualização do presente trabalho no âmbito da Vigilância Sanitária, as vacinas que se encontram em desenvolvimento ou no mercado, a doença e o agente etiológico, a imunobiologia dos macrófagos e os efetores antivirais provavelmente envolvidos na resposta imunológica ao vírus ou vacina.

1.1 ASPECTOS GERAIS DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Foi a partir da Lei Orgânica da Saúde nº 8.080 de 1990, e da organização do Sistema Único de Saúde (SUS), que a Vigilância Sanitária (VISA) começou a adquirir o formato que conhecemos hoje, definindo-a como: "Entende-se por Vigilância Sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde". Essa definição amplia o seu campo de atuação, pois, ao ganhar a condição de prática capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos, torna-se uma prática com poder de interferir em todos os fatores determinantes do processo saúde–doença, ou seja, intervindo em todos os aspectos que possam afetar a saúde dos cidadãos (ROZENFELD, 2000). Além disso, entende-se que a capacidade de eliminar, diminuir ou prevenir riscos, nesse caso específico, está intimamente relacionada à adequação de metodologias científicas atualizadas. Sendo assim, abriu-se então uma frente de pesquisa na área da vigilância sanitária.

O vasto campo de abrangência da VISA pode ser subdividido em dois grandes grupos, a saber: os bens de serviço a saúde e meio-ambiente. Os bens de serviço a saúde são aqueles que interferem direta ou indiretamente na saúde do consumidor ou comunidade, como as tecnologias médicas, em alimentos, agrícolas,

entres outras. Com relação as tecnologias médicas, são todos os "métodos e técnicas de intervenção direta sobre o corpo humano visando a prevenção, cura ou alívio da doença, isto é, a busca de um determinado equilíbrio em saúde" (BERNADETE; EDUARDO, 1998). Compreendendo assim o campo dos medicamentos, soros, vacinas e outros insumos farmacêuticos, além de equipamentos e outros dispositivos médico-hospitalares; os cuidados médicos e cirúrgicos, e toda a organização de serviços de saúde. Entretanto, a literatura mostra que há uma desordem importante em todos os níveis da cadeia terapêutica, caracterizada, principalmente, por uma grande quantidade de produtos, muitos desprovidos de eficácia, segurança e fundamentação científica (BERNADETE; EDUARDO, 1998).

Assim, o propósito da Vigilância Sanitária nessa área é principalmente a proteção da população, controlando e garantindo a qualidade desses produtos a serem consumidos pela mesma, atuando na fiscalização dos estabelecimentos que fabricam, manipulam ou vendem, verificando todo o processo de produção, métodos e técnicas empregadas até o consumo final, se evitando então o consumo de substâncias ineficazes ou perigosas para a saúde (BERNADETE; EDUARDO, 1998).

Os produtos biológicos, o qual estão incluídas as vacinas, distinguem-se dos produtos farmacêuticos químicos por serem derivados de organismos vivos com uma composição molecular muito complexa para ser definida apenas por meios físicos ou químicos. Além disso, a inerente variabilidade de organismos vivos, o potencial de contaminação de materiais com agentes provenientes de materiais de partida (reagentes) ou do meio ambiente, exigem mecanismos especiais de controle de qualidade e garantia de qualidade (WHO, 2018).

Embora o fabricante tenha a principal responsabilidade legal pela segurança, qualidade e eficácia dos produtos que vende, as Autoridades Reguladoras Nacionais (NRAs), em particular nos países onde as vacinas são fabricadas, desempenham um papel fundamental na garantia da qualidade do produto. As NRAs são responsáveis pela revisão de aplicativos de licenciamento, lançamento de lotes e monitoramento do desempenho dos produtos em seu país. A competência científica e as práticas harmonizadas das NRAs tornaram-se componentes essenciais da garantia de qualidade dos produtos que circulam no comércio internacional (WHO, 2018). Desta forma, o desenvolvimento de metodologias que possam garantir a

qualidade de vacinas e a pesquisa de biomarcadores que possam contribuir com o conhecimento do desempenho de insumos de saúde são temas diretamente inseridos no contexto da Vigilância Sanitária.

1.2 VACINAS

Vacina é uma preparação biológica que melhora a imunidade em relação a uma doença específica tornando o indivíduo imune às doenças causadas pelo agente patológico. Ela tipicamente contém um agente que se assemelha a um micro-organismo causador de doenças e é frequentemente feita de formas atenuadas ou mortas do micro-organismo, suas toxinas ou uma de suas proteínas de superfície (WHO, 2018). As vacinas são, de modo geral, seguras e estimulam o sistema imunológico a proteger a pessoa contra doenças transmissíveis. Quando adotada como estratégia de saúde pública, elas são consideradas um dos melhores investimentos em saúde, considerando o custo-benefício (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Sendo comprovadamente uma das melhores formas de prevenção contra doenças, o controle de qualidade das vacinas tornou-se imprescindível para garantir a eficácia, pureza e estabilidade das mesmas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

1.2.1 Controle de qualidade

Em 1973, inicia-se a história do controle da qualidade oficial dos imunobiológicos utilizados no Brasil, por determinação do Ministério da Saúde com a institucionalização do Programa Nacional de Imunizações (PNI) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Essa iniciativa teve como objetivo principal estimular e expandir a utilização de agentes imunizantes, tanto de origem nacional quanto internacional, buscando a integridade e a uniformidade das ações referentes às imunizações realizadas no país (NETTO et al., 2010).

O PNI começou a enfrentar baixos índices de cobertura vacinal, deste modo, em maio de 1979, uma Comissão Interministerial analisou, a pedido do Ministério da Saúde, os problemas enfrentados pelo governo brasileiro e recomendou maior apoio ao desenvolvimento de vacinas nacionais, bem como a criação de estratégias para avaliação da qualidade destes produtos (PONTE, 2003). Segundo os membros

dessa comissão, o PNI precisava equacionar problemas relativos à produção e ao controle de qualidade dos imunobiológicos que utilizava, faltava-lhe também mecanismos de avaliação da qualidade e efetividade das vacinas por ele empregadas (PONTE, 2003).

Foi dada uma atenção especial à produção e ao controle de qualidade de imunizantes utilizados pelo programa. Assim, em relação à produção, a comissão recomendava o estímulo ao desenvolvimento de vacinas nacionais, a modernização e o aprimoramento dos laboratórios produtores e a implementação do controle de qualidade na produção (PONTE, 2003).

A Comissão Interministerial recomendou para o estabelecimento do controle de qualidade de vacinas a identificação e a capacitação de instituições nacionais com potencial para o exercício da atividade, o investimento constante e a definição de normas. Os consultores recomendavam ainda que se viabilizasse o mais rápido possível a montagem de mecanismos de análise, por laboratórios externos, das vacinas em uso, até que o país contasse com uma estrutura tecnicamente reconhecida e confiável que assumisse esta atribuição (PONTE, 2003).

A institucionalização do PNI, a progressiva implementação e dinamização de suas atividades e o sucesso alcançado pela adoção de estratégias de imunização em massa proporcionadas pelas campanhas aumentaram em muito a utilização de imunobiológicos e trouxeram consigo a necessidade de garantir a qualidade dos produtos empregados tanto pelo programa como pelas demais atividades de vacinação colocadas fora de sua esfera de atenção (PONTE, 2003).

Em 1981, o Ministério da Saúde começou a discutir a implantação de um sistema nacional de controle de qualidade de vacinas, definindo os laboratórios mais aptos para realizar esse tipo de análise, ficou-se então estabelecido que qualquer vacina importada pelo Brasil deveria passar por exames rigorosos no Centro Nacional de Referência para Enterovirose, da Fundação Oswaldo Cruz (PONTE, 2003). O país começava a perceber o grau de defasagem institucional e tecnológica que o separava dos países do primeiro mundo no que se relacionava ao controle de qualidade e à produção de vacinas e medicamentos. Iniciou-se a construção de novas instalações para a sede do centro responsável pelos registros de produtos de grande impacto para a saúde, denominado Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) (PONTE, 2003).

Nesse contexto, em 1983, o INCQS, integrante pleno da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), como órgão público federal que atende ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, assume a responsabilidade pelo controle oficial da qualidade de todos os lotes de imunobiológicos a serem utilizados pelo PNI. A partir desse momento, seguindo critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), passa a haver a obrigatoriedade de análise laboratorial (ensaios físicos, químicos e biológicos) e também documental (protocolo resumido de produção e controle de qualidade emitido pelo fabricante) pelo laboratório oficial de controle nacional, previamente à distribuição de tais produtos destinados ao consumo humano. Tal obrigatoriedade não se restringe unicamente aos produtos imunobiológicos de produção nacional; diz respeito também aos produtos importados (NETTO *et al.*, 2011).

1.2.2 Ensaio de potência

Potência é definida como “a habilidade específica ou capacidade do produto, como indicado pelo teste de laboratório apropriado ou pelos dados clínicos controlados de forma adequada, através da administração do produto da forma pretendida, de alcançar um dado resultado” (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011). A potência de um produto biológico refere-se à habilidade de exercer um efeito desejado em pacientes “*in vivo*”. Os regulamentos exigem que “testes para potência devem consistir em testes “*in vivo*”, “*in vitro*” ou ambos, especificamente recomendados para cada produto de modo a indicar sua potência de forma adequada para satisfazer a definição de potência” (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011).

A potência de um produto biológico é o equivalente à “força” de um produto farmacêutico. Para produtos farmacêuticos, força é tipicamente baseado na massa do ingrediente ativo. Desde que a massa apropriada do ingrediente ativo seja presente, a potência do produto é considerada aceitável. Usando uma combinação de testes de caracterização e potência, a consistência do lote é monitorada para garantir que novos lotes sejam semelhantes aos lotes usados durante os estudos clínicos principais (VERCH *et al.*, 2018).

Testes de potência, juntamente com uma série de outros testes, são realizados como parte do teste de conformidade do produto, estudos de comparabilidade e testes de estabilidade. Esses testes são usados para medir os atributos associados à qualidade do produto e aos controles de fabricação, e são realizados para garantir identidade, pureza, “força” (potência) e estabilidade dos produtos usados durante todas as fases do estudo clínico. Da mesma forma, as avaliações de potência são usadas para demonstrar que apenas lotes de produtos que atendem às especificações definidas ou critérios de aceitação são administrados durante todas as fases da investigação clínica e após a aprovação do mercado (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011).

Não há um único teste que possa medir adequadamente as características do produto que predizem a eficácia clínica. Os fabricantes demonstram eficácia clínica por “evidência substancial”, isto é, evidência de que o produto terá o efeito que ele pretende ou é representado sob as condições de uso prescritas, recomendadas ou sugeridas na rotulagem. De modo geral, evidências substanciais de eficácia clínica são obtidas a partir de investigações adequadas e bem controladas conduzidas com um produto fabricado de forma consistente. As avaliações de potência são uma parte necessária dos testes de caracterização do produto, estudos de comparabilidade e protocolos de estabilidade, que são usados para estabelecer que um produto consistentemente fabricado é administrado durante todas as fases da investigação clínica (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011).

Dados de eficácia de investigações clínicas controladas podem fornecer evidências de que um produto tem atividade biológica e, portanto, é potente. Os dados clínicos podem ser usados para estabelecer uma correlação entre a atividade biológica e uma medida de potência mais prática que pode ser usada para estudos de liberação, estabilidade e/ou comparabilidade do lote (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011).

A abordagem tradicional para avaliar a potência dos produtos biológicos é desenvolver um ensaio biológico quantitativo (bioensaio) que meça a atividade do produto em relação à sua capacidade específica de efetuar um determinado resultado. Os bioensaios podem fornecer uma medida de potência, avaliando os ingredientes ativos de um produto dentro de um sistema biológico vivo. Os

bioensaios podem incluir estudos “*in vivo*” com animais, sistemas “*in vitro*” de órgãos, tecidos ou culturas celulares, ou qualquer combinação destes, (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2011).

Em um estado ideal, o mecanismo de ação da vacina é conhecido, um ensaio de potência que é preditivo da resposta clínica está disponível, e um "correlato clínico de proteção" é estabelecido. O correlato de proteção é a resposta imunológica mínima que demonstrou fornecer proteção contra a doença. Um correlato de proteção só pode ser estabelecido quando as seguintes condições forem atendidas: o mecanismo de ação da vacina é conhecido; está disponível um ensaio clínico que pode quantificar a resposta imunitária necessária; está disponível uma base de dados clínicos que pode ser utilizada para estabelecer uma correlação entre os níveis da resposta imunitária e a frequência da ocorrência da doença. Quando um correlato de proteção é conhecido, pode ser simples estabelecer especificações de potência para assegurar que a vacina apresente a resposta clínica necessária. Sem um correlato de proteção, as especificações de potência geralmente baseiam-se em capacidade analítica e de processo, estudos de segurança ou comparabilidade clínica (VERCH; TRAUSCH; SHANK-RETZLAFF, 2018).

No contexto de vacinas virais, bem como vacinas heterólogas (vírus atenuado) o que é preconizado como ensaio de potência é avaliação da capacidade infectiva em cultura de células (WHO, 2005). Em outras palavras, o fabricante determina uma faixa de potência para um determinado lote vacinal e esta é verificada nos órgãos de controle. A atualmente comercializada vacina contra Dengue segue esta norma para o controle de sua potência.

1.3 DENGUE

Embora a dengue seja uma doença antiga no Brasil, a primeira ocorrência do vírus da dengue (DENV 1 e DENV 4) documentada laboratorialmente no país, segundo o Ministério da Saúde, aconteceu em Boa Vista, no Paraná, entre 1981 e 1982 (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Quatro anos depois, algumas capitais do Nordeste e o Rio de Janeiro sofreram epidemias da doença (WHO, 2012).

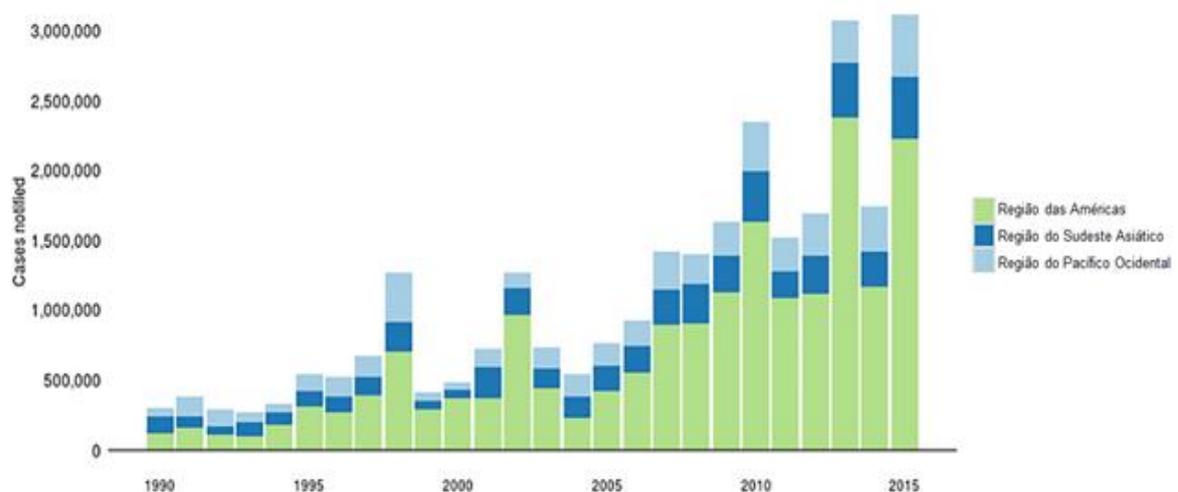
Em 2015, a dengue bateu recorde em número de casos no Brasil. O Ministério da Saúde (MS) registrou mais de um milhão e seiscentas mil pessoas com infecção pelo vírus (Boletim Epidemiológico, MS, 2016).

1.3.1 Epidemiologia da Dengue

A Dengue é uma doença viral sistêmica aguda que representa um crescente problema de saúde pública. É uma doença endêmica de zonas tropicais e subtropicais causada pelo vírus Dengue (4 sorotipos), transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. Esta doença se alastra com muita rapidez, sendo descrito um aumento de 30 vezes na incidência global nos últimos 50 anos (WHO, 2012). A OMS estima que 50-100 milhões de infecções por dengue ocorrem a cada ano e que quase metade da população mundial vive em países onde a dengue é endêmica (SIMMONS; FARRAR; CHAU, 2012).

Antes de 1970, apenas nove países apresentaram epidemias graves de dengue (WHO, 2018). Hoje, a doença é endêmica em mais de 100 países nas regiões da África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental; as regiões das Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental são as mais seriamente afetadas (WHO, 2018). A Figura 1 mostra o número de casos de dengue (suspeitos ou confirmados) notificados por ano à OMS desde 1990 até 2015.

Figura 1 - Número de casos de dengue suspeitos ou confirmados por laboratório notificados à OMS, 1990–2015

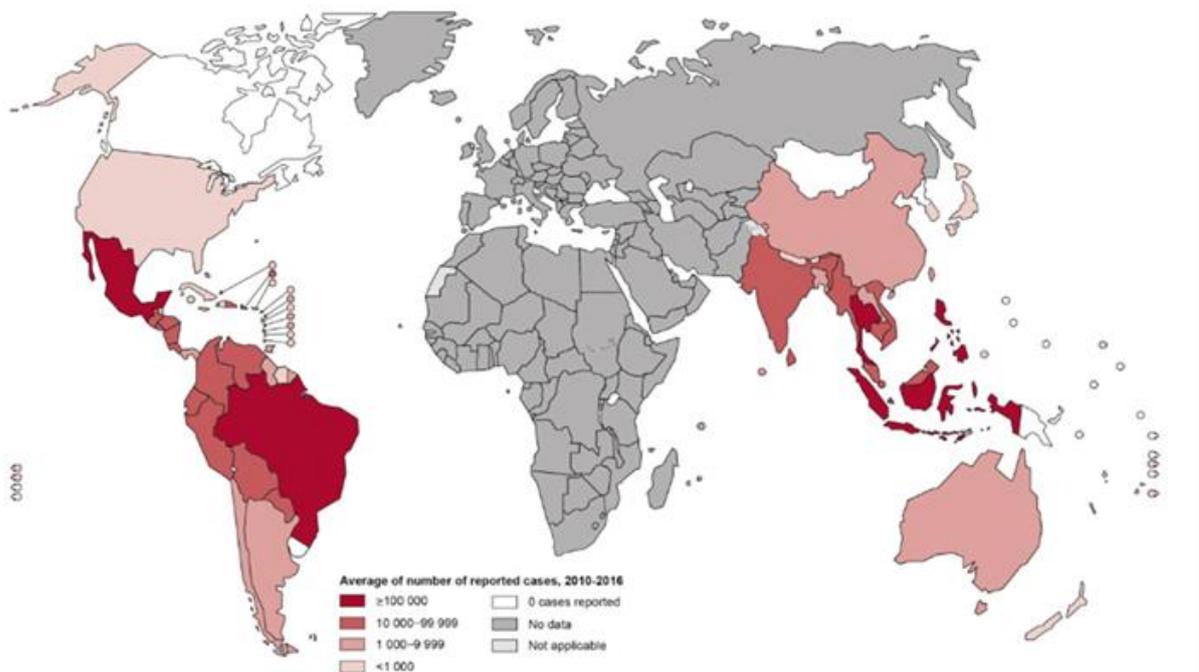


Fonte: (WHO, 2018).

O número real de casos de dengue é subnotificado e muitos casos são classificados erroneamente (BHATT *et al.*, 2013). Uma estimativa recente indica que 390 milhões de infecções por dengue ocorrem a cada ano, das quais 96 milhões se manifestam clinicamente (com qualquer gravidade da doença) (BHATT *et al.*, 2013). Outro estudo, da prevalência da dengue, estima que 3,9 bilhões de pessoas em 128 países estejam em risco de infecção pelo vírus da dengue (BRADY *et al.*, 2012).

Embora esses números sejam estimativas, eles destacam a enorme carga epidemiológica e econômica que os países endêmicos enfrentam. Existe uma grande discrepância entre a quantidade de dengue estimada pelos grupos de pesquisa e o número de notificações registradas pela OMS. As razões para isso incluem falta de recursos e capacidade de pesquisar a dengue de forma eficaz e o fato de que muitos países relatam apenas casos confirmados por laboratório, que representam apenas uma pequena parcela do número total de casos suspeitos de dengue registrados e relatados (Figura 2; WHO, 2018).

Figura 2 - Número médio de casos suspeitos ou confirmados de dengue informados à OMS, 2010-2016



Fonte: (WHO, 2018).

Em 1986, ocorreu uma epidemia de DENV-1 no Rio de Janeiro, seguida da introdução do DENV-2 (1990) e DENV-3 (2000), resultando na circulação endêmica e epidêmica do vírus por todo o país. Entre 1995 e 2010, o número de municípios infestados pelo mosquito mais que dobrou, passando de 1.753 para 4.007 (MOURA, 2011). A circulação dos quatro sorotipos ao longo dos anos contribuiu para uma mudança do panorama atual da dengue. Antes de 2007, a maioria dos casos de dengue grave no Brasil ocorria em adultos entre 20 e 40 anos de idade, em 2008 uma mudança na distribuição da idade foi relatada, 53% dos casos ocorreram em crianças menores de 15 anos (RODRIGUEZ-BARRAQUER *et.al.*, 2011). Isto se deve ao fato dos indivíduos mais velhos acumularem imunidade contra os sorotipos circulantes, e conseqüentemente a infecção afeta principalmente os mais jovens que ainda não entraram em contato com os vírus (RODRIGUEZ-BARRAQUER *et al.*, 2011).

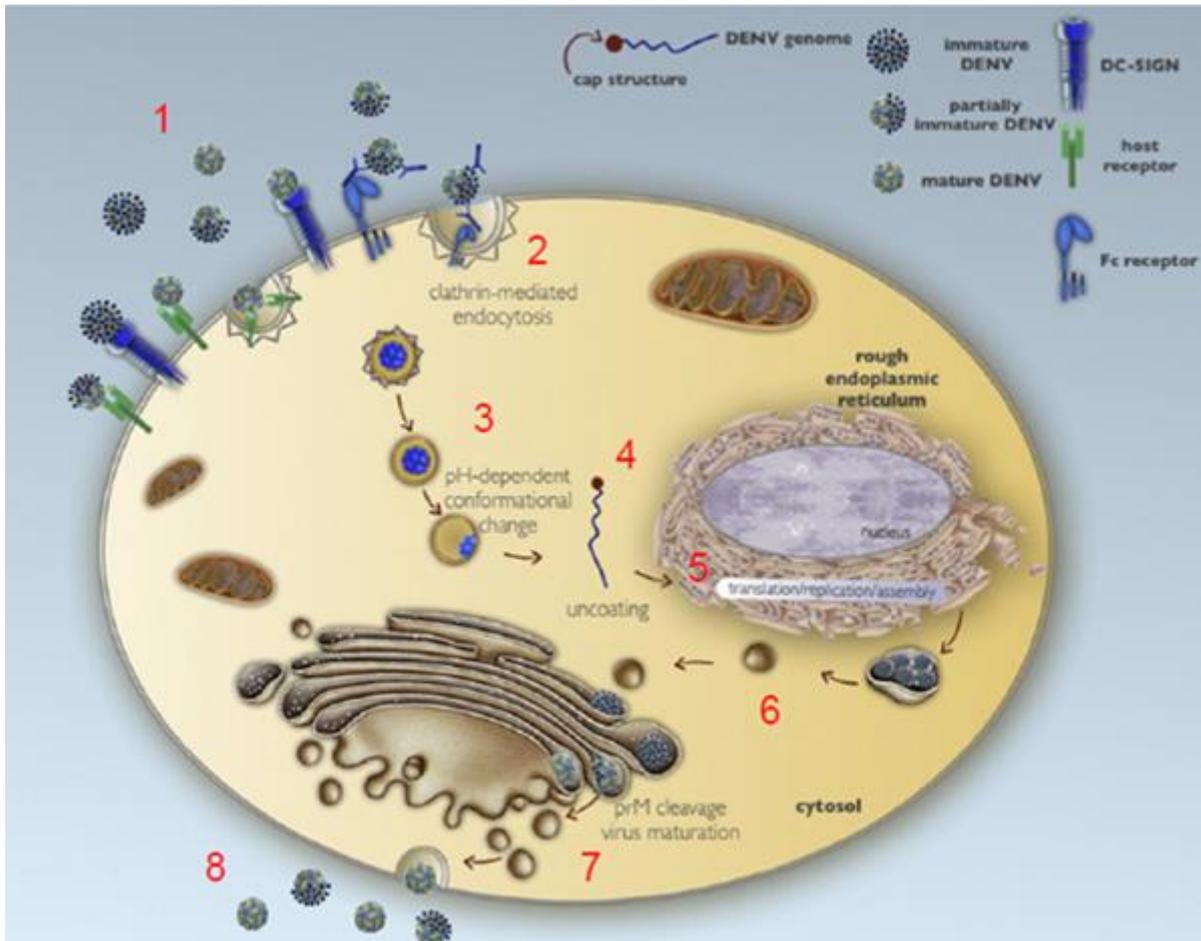
1.3.2 O patógeno

O DENV é uma partícula envelopada contendo um genoma que é composto de RNA positivo de fita simples (ssRNA), do gênero *Flavivirus* e pertencente à família Flaviridae. O vírus é transmitido pela picada de mosquito do gênero *Aedes* e consiste de 4 subtipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUZMAN; HARRIS, 2015). Essa classificação em sorotipos é tradicionalmente baseada em suas características antigênicas, analisadas por testes como neutralização viral, imunofluorescência em cultura de células, por fixação de complemento e estudos de painéis de anticorpos monoclonais (LINDENBACH; RICE, 2007).

Em humanos, as células da linhagem fagocítica mononuclear (monócitos, macrófagos e células dendríticas) são alvos primários, assim como os hepatócitos (GREEN *et al.*, 2014). A infecção inicial é mediada por endocitose através de um receptor dependente de clatrina (VAN DER SCHAAR *et al.*, 2008), e, em teoria, em uma infecção secundária, as partículas virais complexadas com anticorpos de uma infecção primária de DENV pode entrar nas células via receptores Fcγ (FcγR) (Figura 3). Após a entrada na célula, a vesícula torna-se acidificada, e o vírus sofre mudanças conformacionais que permitem a fusão com a membrana endossomal, liberando o ssRNA (ZAITSEVA *et al.*, 2010) O ssRNA do DENV é então traduzido e

replicado no retículo endoplasmático (RE), ocorrendo a montagem de novas partículas virais. Posteriormente os vírus formados são direcionados para o Complexo de Golgi, onde as partículas virais serão exocitadas podendo infectar outras células (Figura 3; GREEN *et al.*, 2014).

Figura 3 - Ciclo replicativo do vírus da Dengue.



Fonte: (GREEN *et al.*, 2014). Esquema representativo do ciclo de replicação do DENV em uma célula susceptível. (1) O vírus DENV interage diretamente com receptores presentes na superfície da célula alvo ou indiretamente com os receptores Fc γ quando complexado com anticorpos de infecções anteriores. (2) A partícula é internalizada em uma vesícula mediante um mecanismo envolvendo clatrina, (3) dentro da qual ocorre alteração de pH levando a fusão das membranas viral e celular e a (4) consequente liberação do genoma viral para o citosol. (5) O processo de replicação do genoma viral e a montagem de novas partículas ocorrem no retículo endoplasmático e (6) posteriormente as partículas virais formadas são direcionadas para o Complexo de Golgi, (7) as quais são exocitadas podendo infectar outras células.

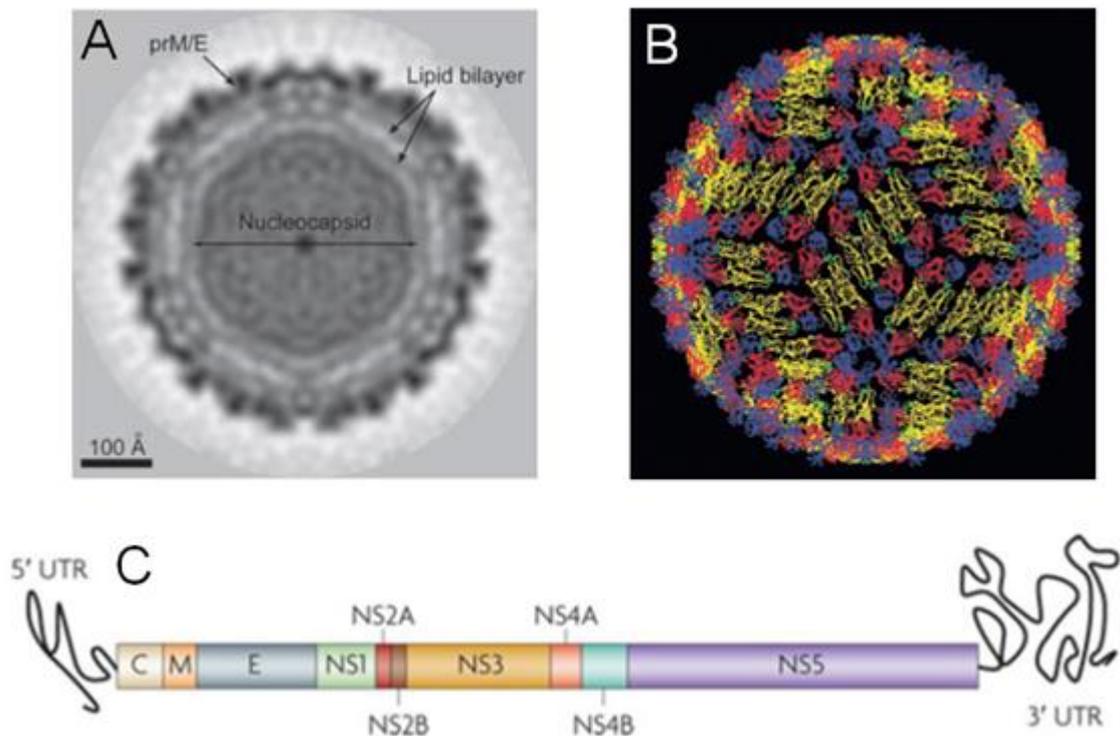
O genoma do DENV codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana/membrana (prM/M) e envelope (E), e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 4).

As proteínas estruturais formam a partícula viral icosaédrica, coberta por um envelope lipídico contendo proteínas do E e da prM/M. As proteínas não-estruturais participam da replicação do RNA genômico, da montagem do vírion e da evasão da resposta imune inata do hospedeiro (NOBLE et al., 2010). As proteínas E e NS1 são consideradas alvos dominantes da imunidade humoral e podem desempenhar um papel importante na patogênese da doença (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Proteínas E do DENV são diferencialmente glicosiladas de acordo com o sorotipo e a célula na qual o vírus está sendo propagado, e a glicosilação da proteína E tem sido implicada na ligação ao receptor (LOZACH et al., 2005) e fusão endossomal (LEE; WEIR; DALGARNO, 1997).

A proteína NS1 é expressa em três formas: uma forma residente no retículo endoplasmático (RE) que co-localiza com o complexo de replicação viral, uma forma ancorada na membrana e uma forma secretada (sNS1) (LINDENBACH, B.; RICE, 2003).

Figura 4 - Estrutura e genoma do DENV



Fonte: (GUZMAN *et al.*, 2010; SCREATON *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2008). (A) Imagem de microscopia crioeletrônica evidenciando a estrutura do DENV imaturo composta por um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope de bicamada lipídica onde são inseridas as proteínas E e prM. (B) Vírus da dengue maduro mostra o arranjo das proteínas E em uma partícula lisa. (C) Representação do genoma viral exibindo as proteínas virais estruturais e não-estruturais.

1.3.3 Vacinas contra a Dengue

Uma vacina que garanta eficácia e segurança contra a Dengue deve ser capaz de induzir respostas imunes com níveis de proteção homogêneos e simultâneos contra os quatro sorotipos da DENV, uma vez que evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que os quadros mais graves da dengue estão relacionados à infecção secundária (VAUGHN *et al.*, 2000). Portanto, uma vacina tetravalente contra a Dengue deve promover proteção total, pois uma proteção parcial contra um dos sorotipos da dengue poderia tornar os indivíduos vacinados mais suscetíveis à dengue grave (THISYAKORN; THISYAKORN, 2014).

A primeira vacina tetravalente anti-dengue avaliada em ensaios clínicos foi baseada na abordagem vacinal clássica de vírus atenuado. Dois protótipos vacinais foram desenvolvidos com esta abordagem clássica, o primeiro produzido na Tailândia, na Universidade de Mahidol, licenciada à Aventis Pasteur, atual Sanofi Pasteur. O protótipo era composto de cepas virais atenuadas, dos quatro sorotipos da Dengue, por passagens sequenciais em células renais de cães (PDK, do inglês: primary dog kidney cells) ou em células renais de macacos (VERO) (SABCHAREON *et al.*, 2002). O outro foi desenvolvido nos EUA e licenciado à GlaxoSmithKline (GSK) na Inglaterra. Este protótipo vacinal da GSK é composto de cepas virais, dos quatro sorotipos da Dengue, obtidas por atenuação em passagens sequenciais em células PDK e células de pulmão de feto de macacos rhesus (células FRhL, do inglês: fetal rhesus lung cells) (SUN *et al.*, 2009).

Quando os protótipos acima citados foram testados como vacinas monovalentes, contendo apenas um dos quatro sorotipos da Dengue, eles foram capazes de induzir altas taxas de soroconversão. Entretanto, em uma formulação tetravalente, uma interferência entre os quatro sorotipos virais atenuados constituiu um grande obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina (SABCHAREON *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2009). Além desta interferência viral, foi observado também que um grande número de participantes do ensaio desenvolveu sintomas semelhantes aos da dengue, o que acarretou na interrupção dos testes com este protótipo vacinal (KITCHENER *et al.*, 2006; SABCHAREON *et al.*, 2002).

Abordagens com vacinas de DNA também são utilizadas na busca de uma ferramenta preventiva anti-dengue. Essa tecnologia compreende a inoculação de um vetor plasmidial de expressão em células eucarióticas contendo o antígeno de interesse, o qual tem por finalidade induzir resposta imune nos indivíduos vacinados (LIU, M. A., 2011; TANG, D. C.; DEVIT, M.; JOHNSTON, 1992).

Com o uso da tecnologia de engenharia genética foi possível desenvolver novas vacinas quiméricas, e foi com esta abordagem vacinal que foi produzida a vacina contra a dengue atualmente liberada em alguns países. Produzida pela Sanofi Pasteur, a vacina tetravalente, CYD-TDV, batizada como Dengvaxia®, é composta por vírus quiméricos que contém os genes prM/E derivados de cada sorotipo do DENV carregados em um “esqueleto” representado pelo vírus vacinal contra a febre amarela (YFV-17D) (Tabela 1) (GUY *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Vacinas tetravalentes contra a dengue

Tipo	Fabricante	Estratégia	Fase do estudo	Status
Vacina clássica de vírus atenuado	UM, Sanofi Pasteur	Atenuada em culturas celulares	Fase II	Suspensão
	WRAIR, GSK	Atenuada em culturas celulares	Fase II	Suspensão
Vacina de vírus quimérico atenuado	Sanofi Pasteur	Genes prM/E de DENV 1-4 substituídos no YFV-17D	Concluída	Liberada
	CDC, Inviragen, Takeda	Genes prM/E de DENV 1-4 substituídos no DENV-2	Fase II	Em progresso
	NIAID, NIH	Atenuada por deleção 3'-UTR	Fase II	Em progresso
Vacina protéica	MERK	Vacina de subunidades contendo 80% da proteína E de DENV 1-4	Fase I	Em progresso
	WRAIR, GSK	Vacina inativada purificada	Fase I	Em progresso
Vacina DNA	NMRC, Vical	DNA plasmidial que contém os genes prM/E de cada sorotipo do DENV	Fase I	Em progresso

Fonte: (Do autor, 2016).

Várias estratégias vacinais vêm sendo desenvolvidas e testadas. Vacinas de vírus atenuados, quiméricas de vírus atenuados, vacinas proteicas e vacinas de DNA (PRECIOSO *et al.*, 2015; AZEVEDO *et al.*, 2011; COLLER *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2007; DURBIN *et al.*, 2012; GUY *et al.*, 2010; KITCHENER *et al.*, 2006; OSORIO *et al.*, 2015; SABCHAREON *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2002). As vacinas que se encontram suspensas, em ensaios clínicos ou já liberadas estão compiladas na tabela 1.

Todas as vacinas mencionadas (Tabela 1) devem ativar mecanismos imunológicos que envolvem a apresentação antigênica, visto que este fenômeno é crucial na formação de memória imunológica.

1.3.4 Patogênese e imunologia da Dengue

A doença pode ser oligossintomática ou apresentar-se como uma leve gripe denominada como febre da dengue. As formas letais da dengue são classificadas de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e Síndrome do Choque do Dengue (SCD), que ocorrem na minoria dos casos de febre da dengue (CHUANSUMRIT; CHAIYARATANA, 2014; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). A infecção com um dos quatro sorotipos confere imunidade protetora apenas no caso de uma infecção com o mesmo sorotipo. Além disso, há uma forte correlação do aumento da gravidade da doença após uma infecção sequencial com diferentes sorotipos virais (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; ROTHMAN; ENNIS, 1999). Algumas hipóteses tentam explicar este fenômeno. Uma das mais discutidas, denominada de “antibody dependent enhancement” (ADE), refere-se ao fato de após uma primeira infecção levando a formação de anticorpos homotípicos, gerados para aquele sorotipo, em uma infecção, subsequente com outro sorotipo, anticorpos da primeira infecção, se ligariam ao vírus formando um complexo, que além de não neutralizar a partícula viral, facilitaria a infecção em monócitos, macrófagos e células dendríticas, via receptor de Fcγ (HALSTEAD, 1988, 2007; MATHEW; ROTHMAN, 2008). Outra hipótese, é denominada de pecado antigênico original, onde a expansão seletiva de células T de memória, originadas de uma infecção primária, com baixa avidéz e que podem reconhecer epítomos dos diferentes sorotipos da Dengue, poderiam, durante uma infecção secundária por um sorotipo diferente, superar as células T naives com

alta avidéz para este novo sorotipo, alterando, portanto, a resposta imune de células T durante a infecção secundária (MATHEW; ROTHMAN, 2008). Uma teoria proposta por pesquisadores cubanos é a Teoria Integral de Multicausalidade, segundo a qual se aliam vários fatores de risco às teorias de infecções sequenciais e de virulência da cepa. A interação desses fatores de risco promoveria condições para a ocorrência da FHD (GUZMÁN; KOURÍ, 2002; MALAVIGE *et al.*, 2004). Uma hipótese alternativa, às citadas anteriormente, propõe que a resposta imune inata inicial e, em particular a resposta do Interferon (IFN) do tipo I, possa determinar a resposta subsequente e o desfecho clínico da doença (UMAREDDY *et al.*, 2008). Por conta das evidências citadas acima, a construção de uma vacina eficaz contra a Dengue deve ser capaz de induzir proteção contra todos os quatro sorotipos tanto homoganeamente quanto simultaneamente (VAUGHN *et al.*, 2000).

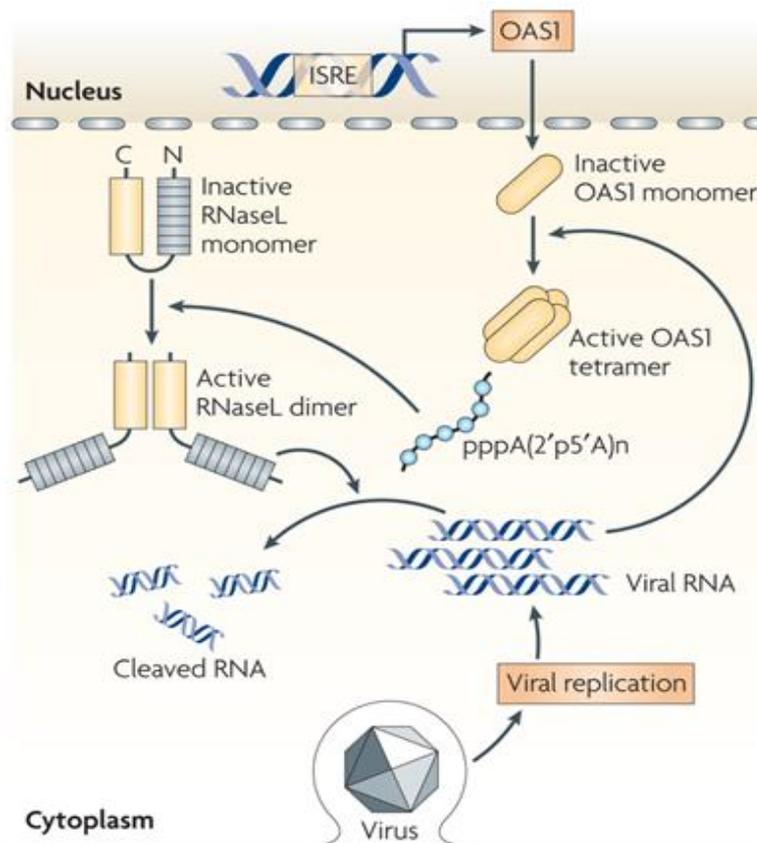
1.3.4.1 Efeitos antivirais

A primeira frente na resposta a uma infecção viral, inclusive na infecção pelo DENV, envolve a indução de IFN do tipo 1 em vários tipos celulares, ressaltando células dendríticas e também macrófagos (CHANG, 2009).

A ligação de moléculas de IFNs do tipo I ao seu respectivo receptor, com subsequente transdução de sinal, leva a indução de mais de 300 genes estimulados por IFN (interferon stimulated genes - ISGs). Contudo, poucos destes ISGs foram diretamente ligados a um estado antiviral. Muitos são, na verdade, produtos de genes que codificam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que detectam moléculas virais e modulam vias de sinalização ou fatores de transcrição que resultam em um aumento da produção de IFN e proteção contra a propagação viral. ISGs que codificam candidatos promissores com atividade antiviral direta incluem proteínas que catalisam a remodelagem de citoesqueleto, indução de apoptose e regulação de eventos pós-transcricionais (SADLER; WILLIAMS, 2009). Foram identificadas várias proteínas induzíveis pelo IFN com papel importante na supressão da propagação viral, como por exemplo, a 2'-5' oligoadenilato sintetase (2' -5' OAS), uma proteína cinase dsRNA-dependente conhecida como EIF2αK2 ou PKR e a proteína MxA da família Mx das GTPases (SADLER; WILLIAMS, 2009).

A 2'-5' Oligoadenilato sintase (2'-5' OAS) é uma proteína ácido ribonucléico dupla-fita dependente (dsRNA), induzida por IFN, que catalisa a formação de um oligonucleotídeo incomum, pppA(2'p5'A)n (2-5A), necessário para ativar uma endonuclease latente (RNase L), a qual degrada RNAs mensageiros virais necessários para a replicação citoplasmática de pequenos vírus de RNA (Picornaviridae), tais como o vírus da encefalomiocardite murina (EMCV) e o vírus MENGO (Figura 5; LENGYEL, 1982; SAMUEL, 1987; STAEHELI, 1990; SCHOGGINS, J; RICE, 2012).

Figura 5 - Via de ativação da OAS e RNaseL

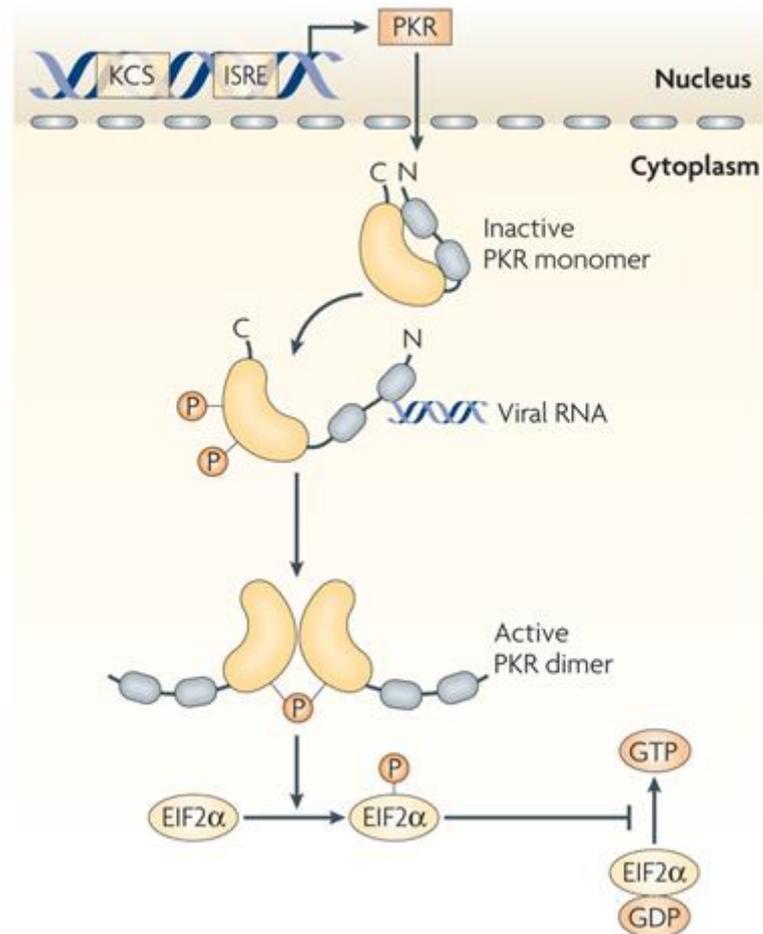


Fonte: (Sadler and Williams, 2009). A OAS é expressa em níveis constitutivamente baixos e induzida por IFNs do tipo I. A proteína acumula no citoplasma da célula como um monômero inativo. Após a ativação por um dsRNA viral a enzima oligomeriza para (no caso da OAS1) formar um tetrâmero que 2' -5' AO que, por sua vez, ativa a RNaseL inativa expressa constitutivamente. Ligação de 2' -5' AO a RNaseL, desencadeia a dimerização de monômeros da enzima, via seu domínio tipo cinase, que então cliva RNAs celulares e virais.

Uma segunda e importante proteína antiviral, principalmente induzida por IFN tipo I, é a EIF2αK2, a qual fosforila e inativa o fator de iniciação peptídico, eIF2,

envolvido na translação polirribossomal do RNA mensageiro viral, (Figura 6; (LENGYEJ, 1982; SAMUEL, 2001; STAEHELI, 1990).

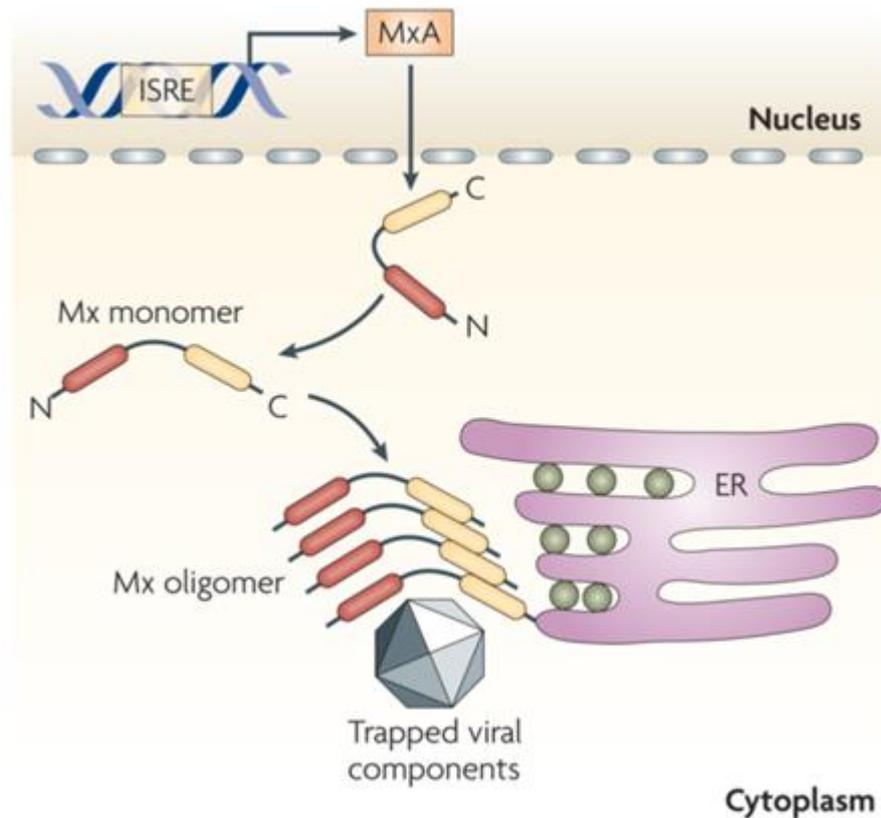
Figura 6 - Mecanismo de ação da EIF2 α K2



Fonte: (Sadler and Williams, 2009). EIF2 α K2 é constitutivamente expressa nas células nucleadas e também induzida por IFN do tipo I. Essa proteína se acumula no núcleo e no citoplasma como um monômero inativo. A EIF2 α K2 é ativada diretamente por RNAs virais, assim como por diversos outros ligantes. Após ativação, os monômeros de EIF2 α K2 são fosforilados e dimerizados para formar a enzima ativa. Quando ativa, a EIF2 α K2 regula várias vias de sinalização celular, uma delas é a inibição da tradução através da fosforilação de eIF2 α .

Outra proteína importante na defesa do hospedeiro contra patógenos é a MxA. As MxA são GTPases induzíveis por IFN do tipo I e bloqueiam a transcrição do genoma viral (Figura 7; SADLER; WILLIAMS, 2009).

Figura 7 - Mecanismo de ação da MxA



Fonte: (Sadler and Williams, 2009). Após estimulação com IFN do tipo I, a expressão de MxA é induzida através de elementos responsivos a estimulação com IFN. A proteína acumula-se no citoplasma em membranas intracelulares (como o retículo endoplasmático, ER) como oligômeros. Após a infecção pelo vírus, os monômeros são liberados e se ligam a nucleocapsídeos virais ou outros componentes do vírus, para aprisioná-los e depois degradá-los.

1.4 MACRÓFAGOS

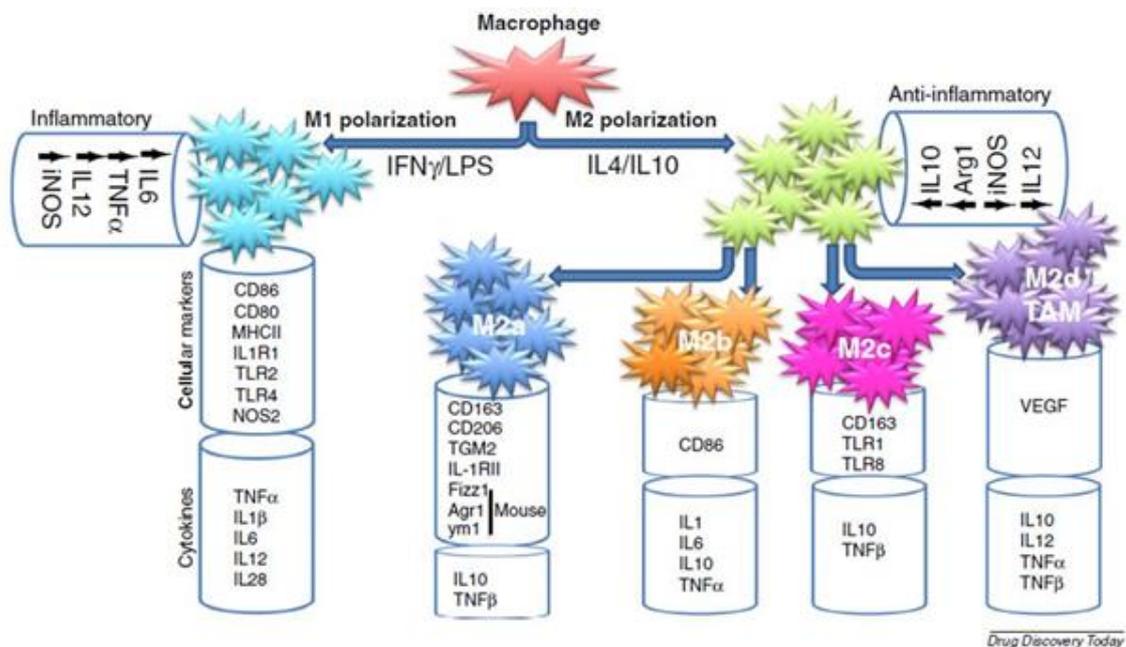
Macrófagos (M0s) são células do sistema imune e desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro. Sinais externos promovem o desenvolvimento de subgrupos de M0s que secretam diferentes citocinas e realizam diferentes funções na regulação e desenvolvimento da resposta imune (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Eles detectam e respondem a invasão de patógenos no sangue e nos tecidos pelo desencadeamento de uma elaborada reação imuno-inflamatória que leva a eliminação do patógeno e restabelecimento da homeostase. Em resposta ao patógeno os M0s sofrem uma profunda mudança de fenótipo, que irá culminar na elaboração de uma resposta imune apropriada (PATEL et al., 2017).

A diversidade funcional dos M0s pode ser atribuída a sua habilidade de responder a diferentes estímulos externos e resultar em diferentes fenótipos

funcionais. Dois principais fenótipos de M0s se destacam: os M0s ativados classicamente (M1) e os ativados alternativamente (M2). Macrófagos M2 são subdivididos, baseados em suas induções e funções, em M2a (induzido por IL-4 e IL-13), M2b (ativado por complexos imunes e agonistas de TLR) e M2c (induzido por IL-10) (Figura 8; BROWN *et al.*, 2014).

Durante uma infecção, os PRRs existentes tanto na superfície quanto no citosol dos M0s reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), após esse reconhecimento é desencadeada a produção de citocinas pró-inflamatórias M1, como $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-12 e IL-1 β (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008). Uma vez que a infecção está controlada, o objetivo do sistema imune é neutralizar os efeitos de macrófagos M1 pela produção de macrófagos M2 (GONG; DEVENISH; PRESCOTT, 2012).

Figura 8 - Diferentes tipos e subtipos de macrófagos e seus produtos secretados



Fonte: (PATEL *et al.*, 2017).

Os macrófagos classicamente ativados (M1) medeiam a defesa do hospedeiro contra uma ampla variedade de bactérias, protozoários e vírus, e desempenham papel importante na resposta imune antitumoral e antiviral. Esse subtipo de macrófago tem como principal característica a produção de óxido nítrico (NO). A síntese de NO é regulada pela disponibilidade de L-arginina, que serve

como substrato para a óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A L-arginina pode ser obtida através da circulação sanguínea ou pela síntese endógena, que ocorre através da citrulina. Experimentalmente, a captura da L-arginina por macrófagos cultivados *in vitro* aumenta em resposta à ativação provocada pela estimulação com LPS e IFN γ (BAYDOUN *et al.*, 1994; SATO; FUJIWARA; BANNAL, 1992).

Os macrófagos alternativamente ativados (ou M2) possuem atividade anti-inflamatória e regulam processos como o da cicatrização (GORDON, 2003; LOKE *et al.*, 2007), além de participarem diretamente na patogênese da fibrose, através da ativação de fibroblastos (BARRON; WYNN, 2011). Esse tipo de macrófago tem como característica a alta produção de IL-10 (SUTTERWALA *et al.*, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) coloca como definição de ensaio de potência testes que medem a atividade biológica de uma determinada vacina, mas não necessariamente refletem o exato mecanismo de proteção em humanos. Ainda segundo a OMS, o conceito inicial de testes de potência era a quantificação da vacina em comparação com um composto de referência cuja atividade biológica era conhecida. Atualmente, principalmente no caso de vacinas com patógenos atenuados, o que se propõe são ensaios “*in vitro*” com diferentes linhagens celulares onde apenas a titulação é avaliada. A OMS reitera, em um guia publicado em 2003, que no caso de vacinas compostas por antígenos heterólogos, métodos adicionais, que não considerem apenas a titulação, devem ser desenvolvidos (WHO, 2003). A partir desse relato da OMS e com a liberação de uma vacina atenuada heteróloga contra Dengue compreendemos a necessidade de desenvolver um método onde a atividade biológica possa ser medida avaliando por um lado o título e por outro a capacidade de indução de células humanas mediadoras da resposta imunológica. Neste contexto, reiteramos que o presente projeto se justifica pela necessidade de métodos alternativos para a avaliação da potência de vacinas em geral e desta forma contribui com o avanço no controle de qualidade deste insumo fundamental na saúde da população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar biomarcadores em macrófagos diferenciados de uma linhagem celular para o desenvolvimento de um ensaio de potência alternativo para a vacina da Dengue (CYD-TDV, Dengvaxia®).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferenciação de THP-1 em macrófagos
- Avaliar perfis fenotípicos de macrófagos após estímulo com IFN- γ /LPS e IL-4/IL-13;
- Avaliar perfis fenotípicos de macrófagos após infecção com diferentes títulos de DENV-2;
- Mensurar diferentes efetores antivirais em macrófagos infectados com diferentes títulos de DENV-2;
- Avaliar perfis fenotípicos de macrófagos após infecção com diferentes títulos da vacina;
- Mensurar diferentes efetores antivirais em macrófagos infectados com diferentes títulos da vacina;
- Analisar o parâmetro de linearidade dos biomarcadores escolhidos.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas neste trabalho as seguintes linhagens, as células de linhagem monocítica humana, THP-1 (ATCC® TIB-202™); as células derivadas de rim de macaco verde africano, VERO (ATCC® CRL-1586™), e células originadas do mosquito *Aedes albopictus*, C6.36 (ATCC® CRL-1660™). As células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Sigma-Aldrich/EUA) 1640, suplementado com 2-mercaptoetanol 0,05mM (BioRad) e 4,5g/L de D-glicose (Sigma-Aldrich/EUA). As células VERO foram cultivadas em meio Minimum Essential Media (MEM, GIBCO, Life Technologies), suplementado com 200mM de L-glutamina (GIBCO, Invitrogen Corporation) e 0,2% de penicilina-estreptomicina (GIBCO, Invitrogen Corporation), estas células foram utilizadas para o ensaio de titulação do vírus DENV-2 e da vacina Dengvaxia®. As células C6.36 foram cultivadas em meio Leibovitz (L-15, Sigma-Aldrich/EUA), essa linhagem foi usada para propagação do vírus DENV-2. Todos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab). As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura celular de 25 cm² (Corning Incorporated), as células THP-1 e VERO foram cultivadas em estufa umidificada a 37 ± 0,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ e a linhagem C6.36 foi mantida em estufa umidificada a 28 ± 0,5°C sem atmosfera de CO₂. Diariamente, as garrafas foram inspecionadas macro e microscopicamente. A partir destas garrafas foram obtidas as suspensões celulares para os experimentos ou repique de manutenção da cultura. Toda manipulação das células foi realizada em cabine de segurança biológica. A contagem de células foi feita utilizando a câmara de Neubauer, amostras das linhagens foram coradas com azul de Tripán 0,4% (GIBCO, Invitrogen Corporation) e depois contadas em um microscópio invertido (modelo Axiovert 100, Zeiss). A concentração celular foi obtida através da fórmula de contagem na câmara de Neubauer (Fórmula 1).

Fórmula 1 - Contagem de células viáveis na Câmara de Neubauer

$$\frac{\text{Nº de células viáveis}}{4} \times \text{fator de diluição} \times \text{fator de correção da câmara (10}^4\text{/mL)}$$

Todas as linhagens utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto a presença de micoplasma. O ensaio foi feito através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) segundo Lawson-Ferreira, 2016, no Laboratório de Vacinas Virais, no Setor de Cultura de células do INCQS, Fiocruz. As células utilizadas neste trabalho foram negativas para este teste.

4.2 VÍRUS E VACINA

Ao longo desse estudo foram utilizadas duas cepas distintas do vírus DENV-2 conforme descrito a seguir.

Nos experimentos iniciais foi usada a cepa de um vírus dengue 2 isolado do soro de pacientes (DENV-2) durante um surto do vírus no estado do Rio de Janeiro em 1995, gentilmente cedida pelos Dr. Marciano Paes e Dr^a. Ada Alves. Este foi propagado em células de mosquito, C6.36, com meio L-15 (Sigma-Aldrich/EUA) suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de caldo de fosfato triptose e 10% de soro fetal bovino (PAES *et al.*, 2009). Ao longo dos estudos, no entanto, notamos a perda de infectividade desta cepa, conforme observada em ensaio de CCID_{50%} utilizando células VERO, descrito no item 4.5 desta dissertação.

Os experimentos apresentados nessa dissertação foram então realizados com a cepa BR/RJ 0337/2008 (#HQ01253), cedida gentilmente pelo Laboratório de Imunologia Viral pelas Dr^{as}. Elzinandes Azeredo e Luzia Pinto. Esta cepa é representante da Linhagem II de DENV-2 e foi isolada a partir de amostra de soro de paciente no Laboratório de Flavivírus, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz. Esta cepa foi isolada no ano de 2008 de um natimorto (FARIA *et al.*, 2013).

A fim de compararmos os resultados obtidos com o vírus utilizamos a vacina comercial contra dengue Dengvaxia (CYD-TDV) produzida pela Sanofi Pasteur. Esta vacina foi produzida utilizando um vírus quimérico que contém os genes prM/E derivados de cada sorotipo do DENV carregados em um “esqueleto” representado pelo vírus vacinal contra a febre amarela (YFV-17D) (CAPEDING *et al.*, 2014).

4.3 ANTICORPOS UTILIZADOS

Neste trabalho, foram estudadas tanto proteínas intracelulares, envolvidas na resposta antiviral de células (OAS1-3, EIF2 α K2, MxA, RNase L) e a proteína viral NS-1 do DENV, bem como receptores de membrana expressos em macrófagos (TLR2, CD86 e CD14). Na tabela 2 abaixo está descrito a lista de anticorpos comerciais primários, secundários e conjugados utilizados neste trabalho.

Tabela 2 - Lista de anticorpos utilizados

Anticorpos	Fluorocromo	Firma
OAS1	Não conjugado	Santa Cruz
OAS2	Não conjugado	Santa Cruz
OAS3	Não conjugado	Santa Cruz
EIF2 α K2	Não conjugado	RD Systems
MxA	Não conjugado	RD Systems
RNase L	Não conjugado	Santa Cruz
NS-1	Não conjugado	Santa Cruz
Secundário	FITC anti-camundongo	Biologend
Secundário	Alexa Fluor® 488 anti-cabra	Invitrogen
Secundário	Alexa Fluor® 488 anti-coelho	Biologend
CD86	Alexa Fluor® 488	Biologend
TLR2	APC	Bioscience
CD14	PE	BD

Fonte: (Do autor, 2018).

4.4 PROPAGAÇÃO DO VÍRUS DENGUE 2

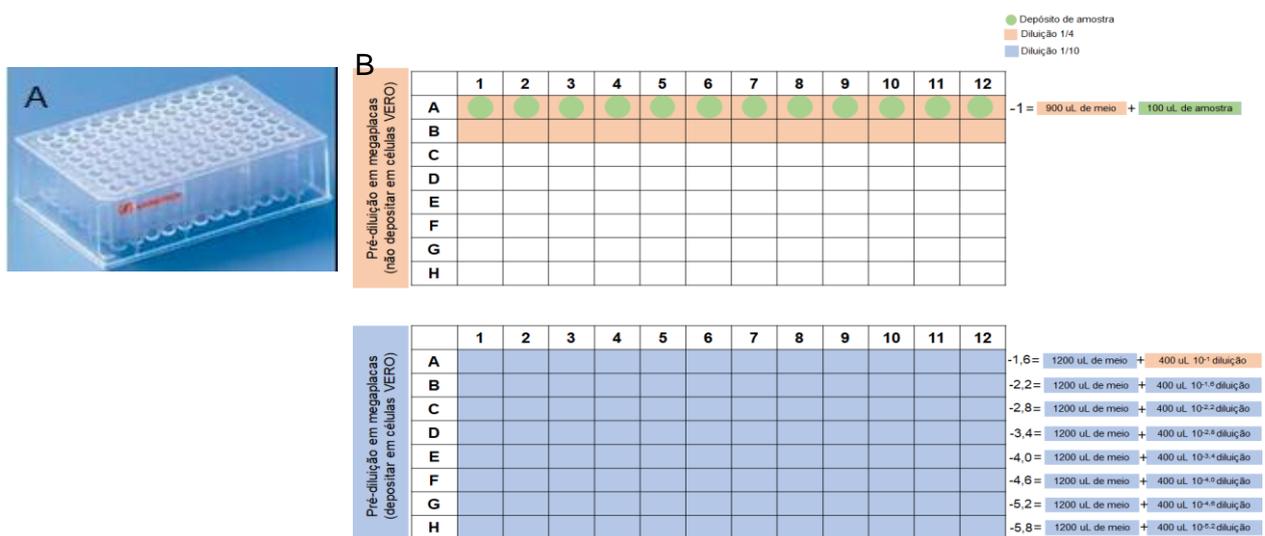
A propagação do vírus foi realizada de acordo com o protocolo segundo Acosta *et al.* (2008). As células C6.36 foram utilizadas para propagação do vírus DENV-2. As células foram cultivadas em uma garrafa de cultura de 25 cm² em estufa umidificada a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sem atmosfera de CO₂. Foi feita uma diluição do vírus de 1:5, diluiu-se 200 μL da solução viral em 800 μL de meio L-15 sem SFB. Quando foi observado que as células alcançaram, pelo menos, 80% da monocamada confluenta, o meio foi descartado e foi adicionado a diluição do vírus, a garrafa foi incubada em estufa umidificada a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sem atmosfera de CO₂ por 90 minutos, sendo homogeneizada a cada 15 minutos. Após a incubação, o inóculo viral foi

retirado e foi adicionado 10mL de meio L-15 com 2% SFB. A garrafa foi mantida em estufa umidificada a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sem atmosfera de CO_2 por aproximadamente 7 dias, até a observação de efeito citopático. No 12º dia a garrafa começou a apresentar efeito citopático e foi colocada para congelamento no freezer -70°C e após 1h o material foi descongelado e o conteúdo da garrafa foi centrifugado a 1.300 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e o pellet descartado. Foi adicionado ao sobrenadante 3mL de SFB (concentração final da solução em 30%) e foram feitos 24 criotubos de 500 μL . Os criotubos foram armazenados em freezer -70°C .

4.5 DETERMINAÇÃO DA $\text{CCID}_{50\%}$ DO VÍRUS DENV-2 E DA VACINA PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram preparadas em placas de 96 poços contendo 3×10^6 células/mL por poço com a linhagem VERO. As placas foram mantidas em estufa umidificada a 36°C com atmosfera de 5% de CO_2 até a distribuição das diluições virais. Para diluição do vírus DENV-2 foi utilizado o meio RPMI 1640 10% SFB e para diluição da vacina Dengvaxia® foi utilizado o meio MEM 10% SFB + 2% Hapes. As diluições foram preparadas em megaplacas (Esquema 1A). Foi feita uma pré-diluição de 1:10 e a partir desta fez-se uma diluição seriada de 1:4 (Esquema 1B).

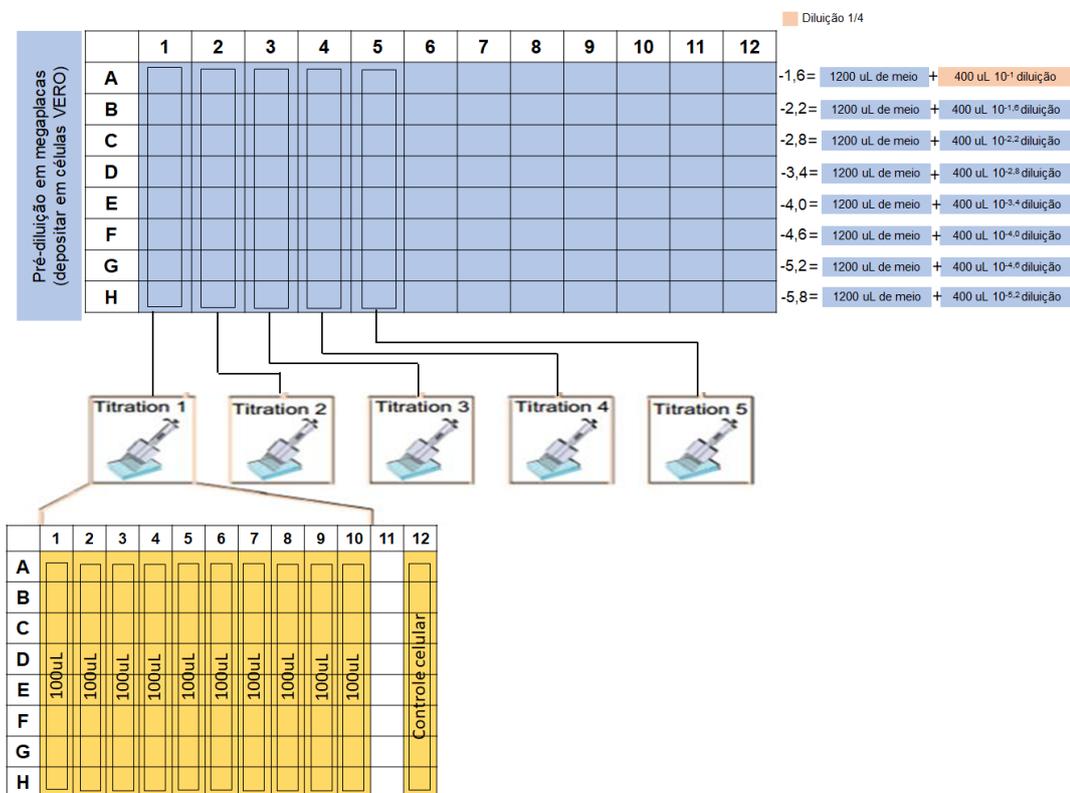
Esquema 1 - Preparação da diluição seriada em megaplacas



Fonte: (Do autor, 2018).

Com a micropipeta todo o volume da diluição da megaplaca, da coluna 1, letra A, foi recolhido e distribuído 100 μL em 10 poços consecutivos na primeira linha da microplaca. Cada poço da megaplaca corresponde uma linha inteira na microplaca. Esse procedimento foi realizado para cada poço da megaplaca. O volume dos poços da coluna 2 da megaplaca foi distribuído em outra microplaca, com as células, e assim sucessivamente (Esquema 2).

Esquema 2 - Distribuição das diluições virais para titulação em microplacas



Fonte: (Do autor, 2018).

As microplacas foram cobertas com filme adesivo e incubadas na estufa a 36°C, 5% CO₂ por 7 dias. Após a incubação de 7 dias, o meio da placa foi retirado e as células foram fixadas com 85% de acetona fria a < -20°C e incubadas por 15 minutos em freezer -20°C. Após a incubação, foi retirada a acetona e as placas foram colocadas para secar na capela por 30 minutos. Após a secagem total dos poços, as placas foram incubadas por 30 minutos com tampão de saturação (skim milk + TritonX), após a incubação o tampão foi removido e foi adicionado o anticorpo primário monoclonal específico. Após 45 minutos, as placas foram lavadas e foi

adicionado o anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina, incubando por 45 minutos. Após a incubação, o anticorpo secundário foi retirado e as placas foram lavadas duas vezes, após as lavagens foi adicionado o substrato da fosfatase alcalina e as placas foram incubadas no escuro por no mínimo 1h. Após a incubação as placas foram lavadas e colocadas para secar em temperatura ambiente. Os poços positivos e negativos são contados, com auxílio de um microscópio, para calcular a CCID_{50%} do vírus DENV-2 e da vacina Dengvaxia®.

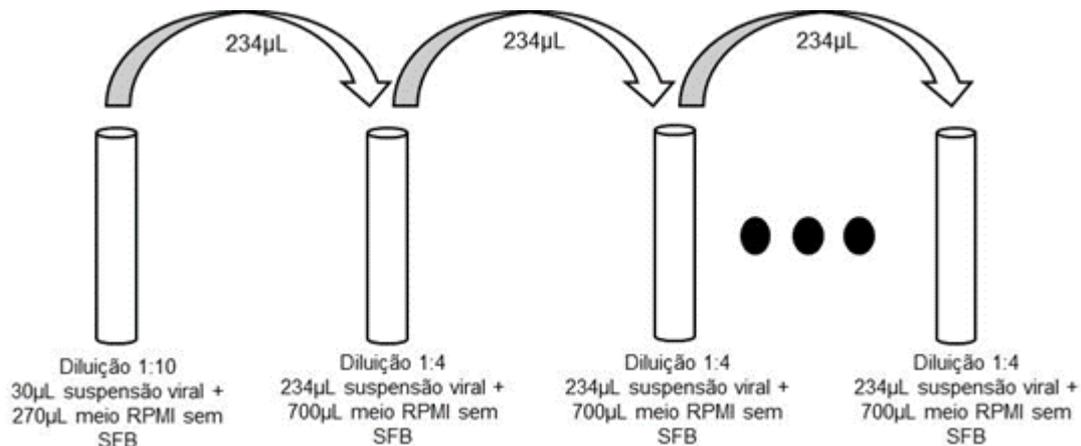
4.6 DIFERENCIAÇÃO DA LINHAGEM MONOCÍTICA THP-1 EM MACRÓFAGOS

Foram preparadas em placas de 96 poços contendo 3×10^6 células/mL por poço com a linhagem THP-1 em meio RPMI 1640 10% SFB. As células foram induzidas para diferenciação em macrófagos (moTHP-1) com 20 ng/mL de Forbol Miristato Acetato (PMA, Sigma-Aldrich) por 48h e após, foi realizada a troca por meio RPMI fresco e as células descansaram na estufa por 24h (ZHOU *et al.*, 2010).

4.7 INFECÇÃO DAS CÉLULAS PELO VÍRUS DENV-2 E PELA VACINA

Novamente aqui foi utilizado o protocolo de infecção e diluição propostos pela WHO (2013), com a alteração do uso da linhagem THP-1 como célula hospedeira. As placas de 96 poços preparadas com as células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram utilizadas para infecção com o vírus DENV-2 ou com a vacina comercial contra Dengue. Foi realizada uma pré-diluição 1:10 do vírus ou da vacina e a partir desta foi feita uma diluição seriada com 10 pontos utilizando o fator de diluição 4, aproximadamente (Esquema 3). Nos poços referentes a cada uma das diluições, foram adicionados 100µL de suspensão viral do vírus DENV-2 ou da vacina por 1h, homogeneizando mecanicamente de 15 em 15 minutos. As placas foram incubadas em estufa a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO₂ por 24h.

Esquema 3 - Diluição do vírus 0337 e da vacina comercial contra Dengue



Fonte: (Do autor, 2018).

4.8 ESTIMULAÇÃO DOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DE THP-1 PARA OS DIFERENTES PERFIS DE POLARIZAÇÃO

Como controle positivo, as células diferenciadas em macrófagos foram estimuladas para induzir os perfis de ativação celular. Para o perfil M1 foram utilizados IFN γ (20 ng/ml) e LPS (1 μ g/mL), para o perfil M2a as citocinas usadas foram IL-4 e IL-13 (20ng/mL) e para o perfil M2c foi utilizado IL-10 (50 ng/mL) e TGF- β 1 (0,5 ng/mL) (CHANPUT et al., 2013). Foi adicionado 100 μ L de cada citocina, em seus respectivos poços, e as placas foram incubadas em estufa a $37 \pm 0,5^{\circ}$ C com atmosfera de 5% de CO $_2$ por 24h. A polarização de macrófagos foi verificada pela expressão de receptores de superfície de membrana e pela análise da concentração de NO.

4.9 OBSERVAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE EM MACRÓFAGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Esta técnica foi utilizada para se avaliar os perfis de macrófagos obtidos com a infecção do DENV e com a vacina Dengvaxia quanto uma possível modulação desses receptores pelos vírus em estudo.

Após a incubação, o meio de cultura foi descartado e as placas foram lavadas duas vezes com 100 μ L de PBS/BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich/EUA) 1%. Após esse procedimento, as células foram removidas utilizando 100 μ L de

tripsina/EDTA (GIBCO, Invitrogen Corporation) e meio RPMI 1640 10% SFB, a fim de inativar a ação da tripsina. A suspensão celular foi transferida para os respectivos tubos de citometria, as células foram lavadas com 1mL de PBS/BSA e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas por 30 minutos com 25µL dos anticorpos monoclonais em suas previamente estipuladas titulações sendo: CD14 (1:100), CD86 (1:50) e TLR2 (1:10). Após a incubação as células foram lavadas com 1mL PBS/BSA 1% e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200µL de paraformaldeído (PFA) 1% e em seguida as amostras foram lidas em aparelho de citometria de fluxo (CytoFlex, Beckman Coulter) e analisadas em software CytExpert. Possíveis grumos foram excluídos durante análise no aparelho em todos os experimentos.

4.10 ANÁLISE DE PROTEÍNAS INTRACELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Os efetores antivirais de interesse nesse estudo bem como uma proteína não estrutural do vírus (NS-1) foram analisados utilizando a citometria de fluxo. O procedimento utilizado para as OAS 1-3 foi padronizado pelo nosso grupo (SOUZA, 2016) e o mesmo foi utilizado para as outras proteínas em estudo. Após a incubação, as placas tiveram seu meio descartado, sendo lavadas duas vezes com 100µL de PBS/BSA 1%. Após esse procedimento, as células foram removidas utilizando 100µL de tripsina/EDTA (GIBCO, Invitrogen Corporation) e meio RPMI 1640 10% SFB, a fim de inativar a ação da tripsina. A suspensão celular foi transferida para os respectivos tubos de citometria e fixada com 1mL de PFA 1% por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 1mL de PBS/BSA 1%. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1mL de uma solução de 0,1% Triton X-100, para causar poros nas células, durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados aos tubos 1mL de PBS/BSA 1% e centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, foi realizada uma nova lavagem com PBS/BSA 1%. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas por 1h com 25µL

dos anticorpos primários policlonais referentes às OAS1, OAS2, OAS3, EIF2 α K2, MxA e RNase L (1:50) e 25 μ L do anticorpo primário monoclonal anti-NS-1 DENV-2 (1:50), nos tubos referentes a infecção viral, exceto os tubos referentes ao controle do anticorpo secundário. Após a incubação as células foram lavadas com 1mL PBS/BSA 1% e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. Depois da lavagem, foi adicionado 25 μ L do anticorpo secundário anti-coelho FITC (1:1000) para revelar a OAS1, 25 μ L do anticorpo secundário anti-cabra Alexa 488 para revelar as OAS2, OAS3 e MxA (1:1000) e 25 μ L do anticorpo secundário anti-camundongo Alexa 488 (1:1000) para revelar as EIF2 α K2, RNase L e NS-1 do DENV-2, as células foram novamente incubadas por 45 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com 1mL PBS/BSA 1% e foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. As células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS para leitura em aparelho de citometria de fluxo (CytoFlex, Beckman Coulter e Cyan, Dako). Para controle e calibração do aparelho foram feitos tubos adicionais com células sem marcação e tubos contendo células com os anticorpos secundários separadamente e em conjunto.

4.11 DETECÇÃO DE NITRITO PELA TÉCNICA DE GRIESS

A detecção de nitrito foi realizada em colaboração com o Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, INCQS, através do Dr. Fausto Ferraris. Este estudo foi realizado visando verificar a produção de óxido nítrico que está relacionada com a resposta originada por macrófagos M1 (pró-inflamatórios) como um ensaio biológico.

Para a dosagem do óxido nítrico, foi utilizada a reação colorimétrica de Griess, que consiste na detecção de nitrito (NO^2^-), resultante da oxidação do óxido nítrico (NO) nos sobrenadantes de cultura previamente coletados. Adicionou-se à uma placa de ELISA de 96 poços 50 μ L do sobrenadante de cultura em triplicata, seguido do mesmo volume do reagente de Griess. Este é composto de sulfanilamida 1% diluída em H_3PO_4 2,5% (solução A) e de N-1-naphtylethtylenodiamina, também diluído em solução de H_3PO_4 a 2,5% (solução B). Para a confecção de uma curva-padrão, uma solução de nitrito de sódio na concentração inicial de 200 μ M passou por diluições seriadas (fator 2) em RPMI suplementado com 2% de SFB. Após incubação de 10 minutos ao abrigo da luz, a leitura no espectrofotômetro foi

realizada a 450nm. As absorbâncias das diferentes amostras foram comparadas com a curva-padrão.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos experimentos foram compilados em tabelas de Excel e GraphPrism (versão 7.0). Foram calculadas as medianas, quartile 1 e 3, máximo e mínimo como análise descritiva. Para fins de comparação entre grupos foi aplicado o teste Man-Withney. As análises dos experimentos de citometria de fluxo foram feitas utilizando o programa CytoExpert.

5 RESULTADOS

Nesse capítulo serão apresentados os dados obtidos nos experimentos com a cepa viral 0337 (DENV-2) e a vacina comercial anti-Dengue. Serão mostrados os resultados obtidos no ensaio de CCID_{50%} em células VERO para duas cepas virais e a vacina; seguido dos resultados relativos as diversas proteínas estudadas.

5.1 CCID_{50%} DOS VÍRUS E VACINA

O ensaio de CCID_{50%} foi realizado conforme preconizado pela OMS, e descrito no item 4.5 da metodologia, e o resultado está compilado na tabela 3 e as curvas estão em anexo (Anexo A e B). Para se obter a CCID_{50%} utilizamos a técnica de imunohistoquímica, usando células VERO. Foi feita uma pré-diluição de 1:10 e a partir desta, fez-se uma diluição seriada de 1:4. O valor do título estimado para o vírus DENV-2 da cepa 0337 foi de $10^{3,02}$ que se encontra entre as diluições de $10^{-2,8}$ e $10^{-3,4}$ (Tabela 3). Já o valor do título da vacina foi cerca de um log acima (aproximadamente 10^4) do DENV-2 0337 (Tabela 3). Foi possível obter uma curva dose com as diluições realizadas tanto para a cepa DENV-2 0337 quanto para a vacina. Além disso, as curvas de ambas foram similares (Anexo A e B), tendo obtido uma correlação (r) de 0,99 e 0,98 para a amostra vacinal e a cepa viral, respectivamente. Não foi possível determinar a CCID_{50%} do vírus HUM DENV-2. Desta forma, optou-se por realizar todos os experimentos com a cepa 0337 que embora tenha, dentro das condições experimentais observadas, apresentado um título baixo em relação a vacina, demonstrou ainda uma capacidade infectiva concentração dependente.

Tabela 3 - CCID_{50%} das amostras de vacina e vírus DENV-2. Resultados expressos em $\log_{10}CCID_{50\%}/amostra$ em ensaio realizado em células VERO e analisado no programa CombiStat

Amostra	Limite mínimo	Estimado	Limite máximo
Vacina Dengvaxia – sorotipo 2	3,78864	4,18519	4,58174
Vírus DENV-2 0337	2,49868	3,02010	3,54151

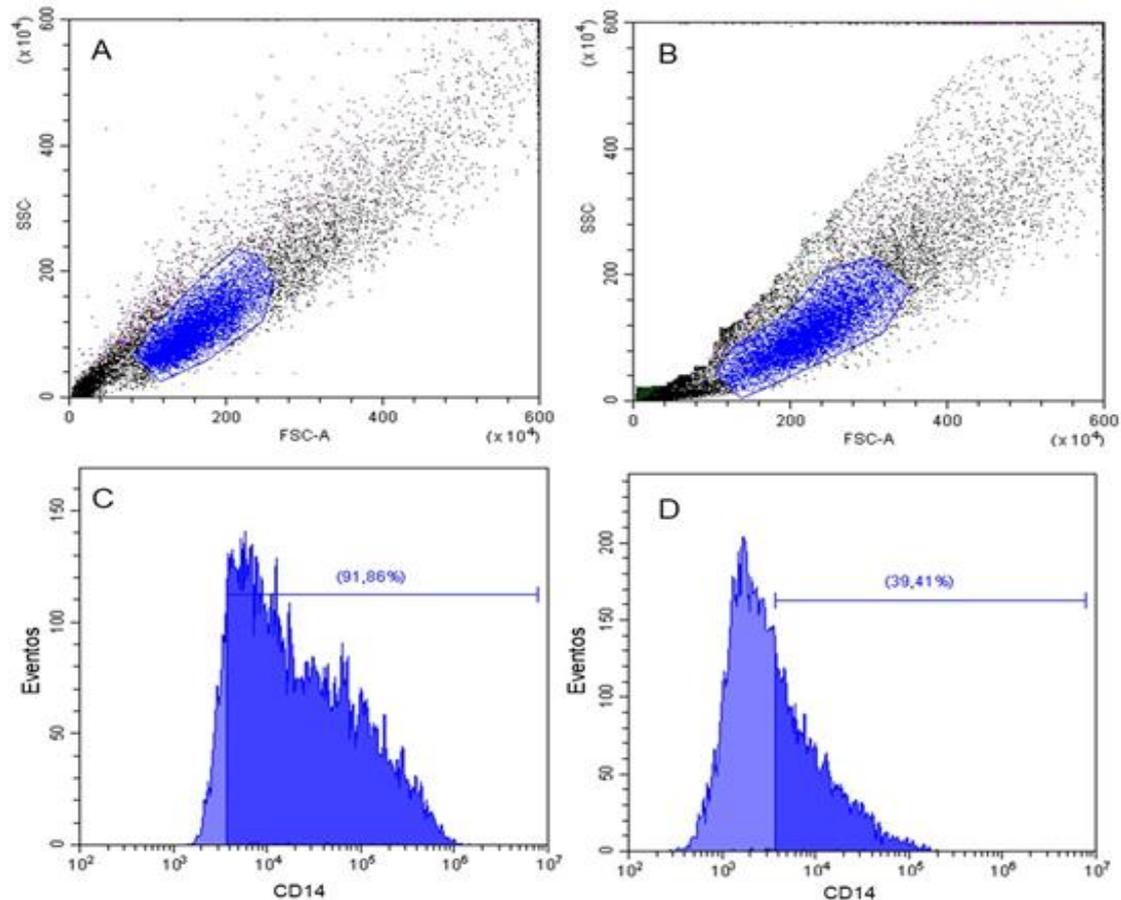
Fonte: (Do autor, 2018).

5.2 DIFERENCIAÇÃO DA LINHAGEM THP-1 EM MACRÓFAGOS

A fim de determinar a eficiência do método de diferenciação de células THP-1 em macrófagos, através do estímulo com PMA, foi analisado o perfil da molécula de superfície de membrana CD14 (Figura 9). Inicialmente foi feita uma cinética de doses de PMA e de tempo a fim de verificar quais seriam as melhores condições experimentais. O protocolo escolhido foi aquele onde a THP-1 produziu uma maior quantidade de NO (Apêndice A), sem alterar a viabilidade das células, ou seja, PMA 20ng/mL por 48h, seguidos de 24h sem estímulo na incubadora. Para confirmar a diferenciação das células em macrófagos por citometria de fluxo, foram utilizados dois fatores bem descritos na literatura. O primeiro foi a alteração de parâmetros relativos ao tamanho e granulosidade (FSC X SSC) e o segundo foi a perda da expressão do marcador “pan” de monócitos CD14.

Como observado através dos gráficos FSCxSSC, a linhagem THP-1 apresentou um aumento de tamanho e uma leve perda de granulosidade quando diferenciada com PMA (Figura 9A e B). Além disso, nota-se que enquanto as células não diferenciadas apresentaram cerca de 91% de positividade para CD14 (Figura 9 C), macrófagos diferenciados de THP-1 foram aproximadamente 40% positivos (Figura 9D), o que representou uma diminuição de 51% na porcentagem de células positivas para CD14.

Figura 9 – Figura representativa dos parâmetros SSC X FSC mostrando a diferenciação de células THP-1 em macrófagos através do tratamento com PMA



Células THP-1 foram tratadas com PMA a 20ng/mL por 48h. Após este período o meio foi trocado e as células permaneceram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 24 horas. As células foram então retiradas da cultura e marcadas com anti-CD14. FSC X SSC de células THP-1 sem (A) e com o tratamento com PMA 20ng/mL (B) em azul região de células analisadas. Histogramas representativos da expressão de CD14 em células THP-1 sem (C) e com PMA 20ng/mL (D). Em azul escuro estão representadas as células CD14⁺.

Fonte: (Do autor, 2018).

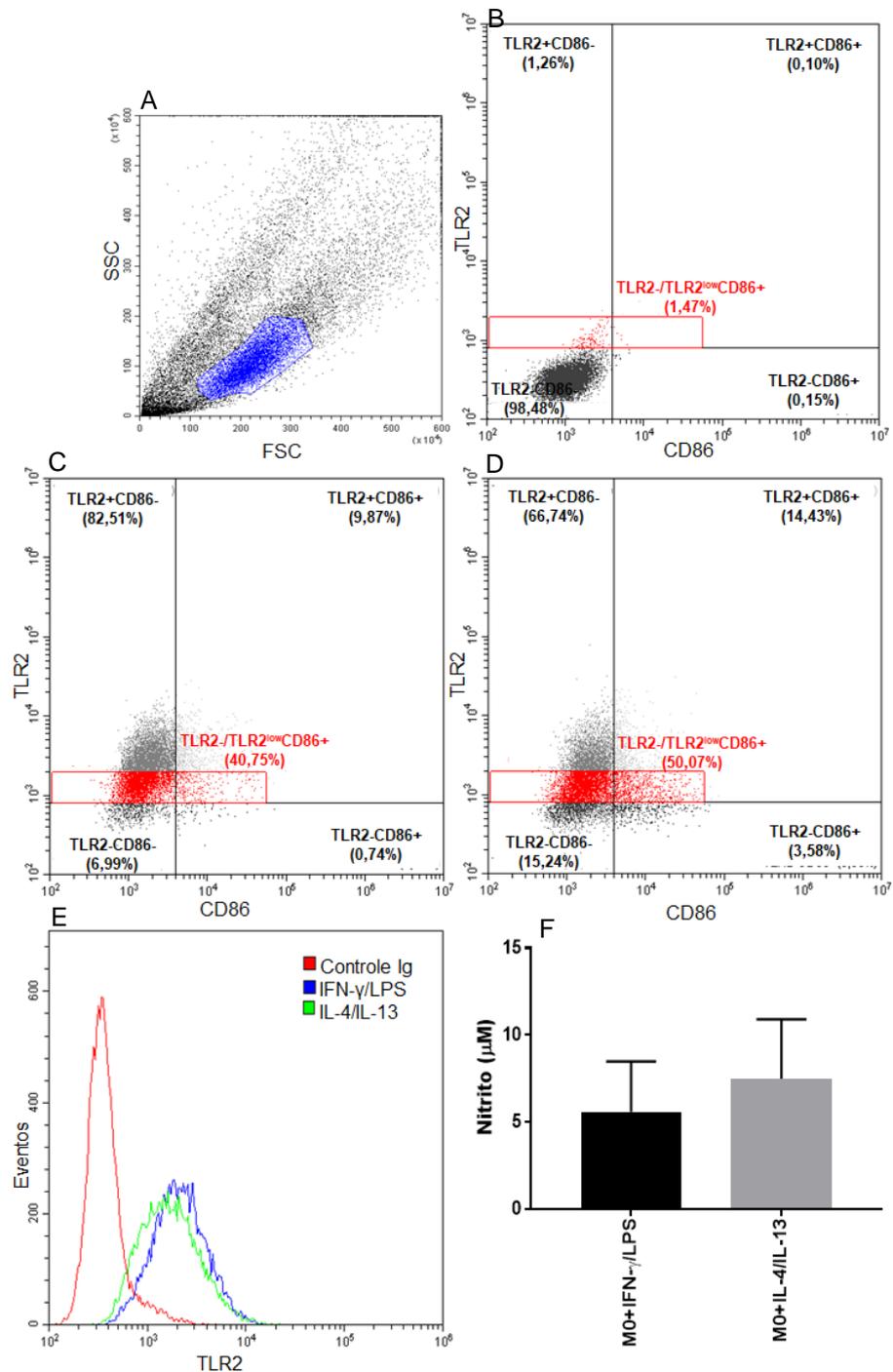
5.3 ESTUDO DE RECEPTORES DE SUPERFÍCIE DE MEMBRANA E EFETORES ANTIVIRAIS EM MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS DE THP-1

Para verificar a indução dos perfis de ativação celular, macrófagos diferenciados de células THP-1 foram incubados com IFN- γ e LPS, para induzir o perfil clássico (M1). Para induzir o perfil alternativo (M2), foram utilizadas as citocinas IL-4 e IL-13 (M2), conforme descrito na literatura por CHANPUT *et al.*, 2013.

5.3.1 Expressão de TLR2, CD86 e NO em macrófagos

A avaliação da polarização de macrófagos foi realizada através da análise dos perfis TLR2⁺CD86⁻ e TLR2⁺CD86⁺ (M1) e TLR2⁻CD86⁺ (M2). Além disso, os níveis de nitrito foram mensurados. Cerca de 93% das células moTHP-1 TLR2⁺CD86⁻ e TLR2⁺CD86⁺ foram obtidas quando a cultura de THP-1 diferenciada em macrófagos foi tratada com IFN- γ e LPS (perfil M1). Cerca de 7% das células foram duplos negativas (TLR2⁻CD86⁻) e menos de 1% das células foram negativas para TLR2 e positivas para CD86 (Figura 13B). Já as células tratadas com as citocinas IL-4/IL-13, que medeiam a polarização para o perfil M2, foi observada uma menor quantidade células positivas para TLR2 (80,5%) concomitante com uma maior quantidade de células TLR2⁻ ou TLR2^{low}CD86⁺ (50,07%) quando comparadas ao perfil M1. Além disso, verificou-se uma maior quantidade de células duplo negativas (15%) no perfil correlacionado a M2, quando comparadas com o perfil M1 (Figura 10C). Não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de nitrito produzido nas células em ambos os grupos de tratamento (Figura 10D). Foi observado uma mudança no perfil de células marcadas para estes dois receptores de superfície de membrana (TLR2 e CD86), quando estimulados com diferentes citocinas.

Figura 10 - Expressão de TLR2, CD86 e NO em células moTHP-1 estimuladas com IFN- γ /LPS ou IL-4/IL-13

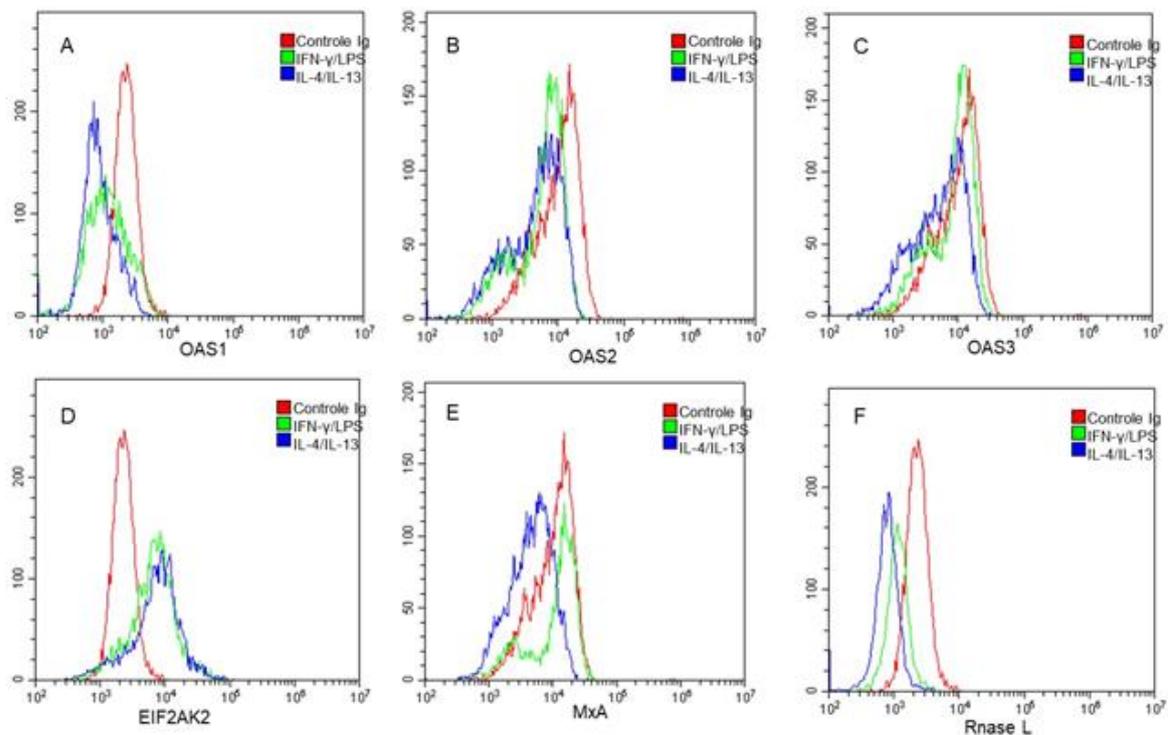


Gráficos originais de citometria de fluxo de um experimento representativo em células THP-1 diferenciadas em macrófagos mostrando FSC X SSC (A), autofluorescência (B), TLR2 e CD86 em moTHP-1 estimuladas com IFN γ /LPS (C), TLR2 e CD86 moTHP-1 estimuladas com I-L4/IL-13 (D), sobreposição do controle de Ig (vermelho), moTHP-1 estimuladas com IFN γ /LPS (azul) e moTHP-1 estimuladas com I-L4/IL-13 (verde) (E) e gráfico dos níveis de NO no sobrenadante das culturas de moTHP-1 estimuladas com IFN γ /LPS ou IL-4/IL-13 (F); media \pm desvio padrão, n = 6.
Fonte: (Do autor, 2018).

5.3.2 OAS 1-3, EIF2 α K2, MxA e RNase L em moTHP-1 diferenciadas para M1/M2

Foram avaliados também alguns efetores antivirais induzidos por interferon do tipo 1 nas células tratadas com INF γ /LPS (M1) e IL-4/IL-13(M2), a fim de avaliar os níveis destas proteínas após a polarização dos macrófagos diferenciados de THP-1 (Figura 11). Observou-se que, dentro das condições experimentais, as células diferenciadas não expressaram as três isoformas de OAS, a MxA e a RNase L (Figura 11A-C, E e F). Entretanto, a proteína EIF2 α K2 foi positiva, quando comparada com o controle de Ig. Aproximadamente 72% e 74% das células foram positivas para EIF2 α K2 quando estimuladas com INF γ /LPS ou IL-4/IL-13 respectivamente (Figura 11D). Em um estudo prévio foi observado que a expressão de EIF2 α K2 se encontrava pouco positiva em células THP-1 não diferenciadas (Apêndice B).

Figura 11 – Expressão de OAS 1-3, EIF2 α K2, MxA e RNaseL em moTHP-1

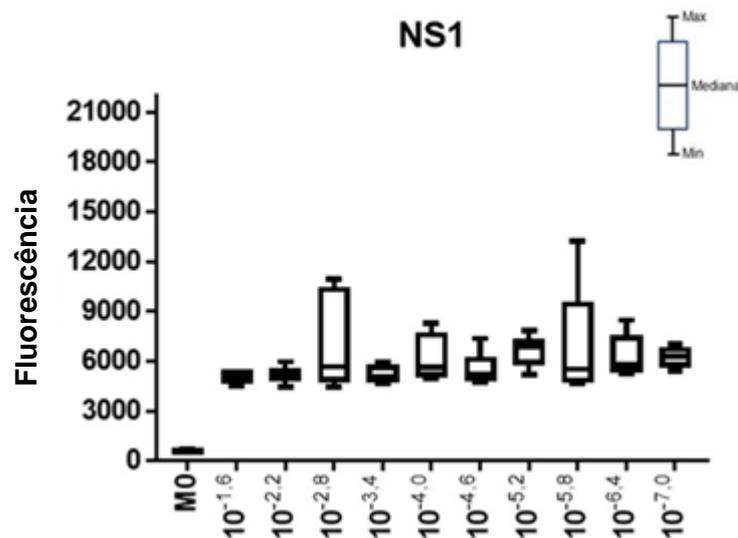


Fonte: (Do autor, 2018). Histogramas sobrepostos originais de citometria de fluxo de experimento representativo mostrando OAS 1 (A), OAS 2 (B), OAS 3 (C), EIF2 α K2 (D), MxA (E) e RNase L (F) em moTHP-1 estimuladas com INF γ /LPS (em verde) ou IL-4/IL-13 em azul. Em vermelho controle de Ig.

5.4 ESTUDO DOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE DE MEMBRANA, ÓXIDO NÍTRICO E NS-1 EM CÉLULAS INFECTADAS COM DENV-2 CEPA 0337

O próximo passo foi avaliar um possível efeito da infecção de macrófagos com o DENV-2 cepa 0337 quanto a expressão e nível dos parâmetros estudados. Foram realizadas 10 diluições do vírus, apresentadas da mais concentrada para a menos concentrada. A fim de confirmar a infecção das células foi avaliada a expressão da proteína viral NS-1 por citometria de fluxo (Figura 12).

Figura 12 - Box-plot mostrando a mediana geométrica da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) da proteína NS-1 em moTHP-1 infectadas com DENV2 0337



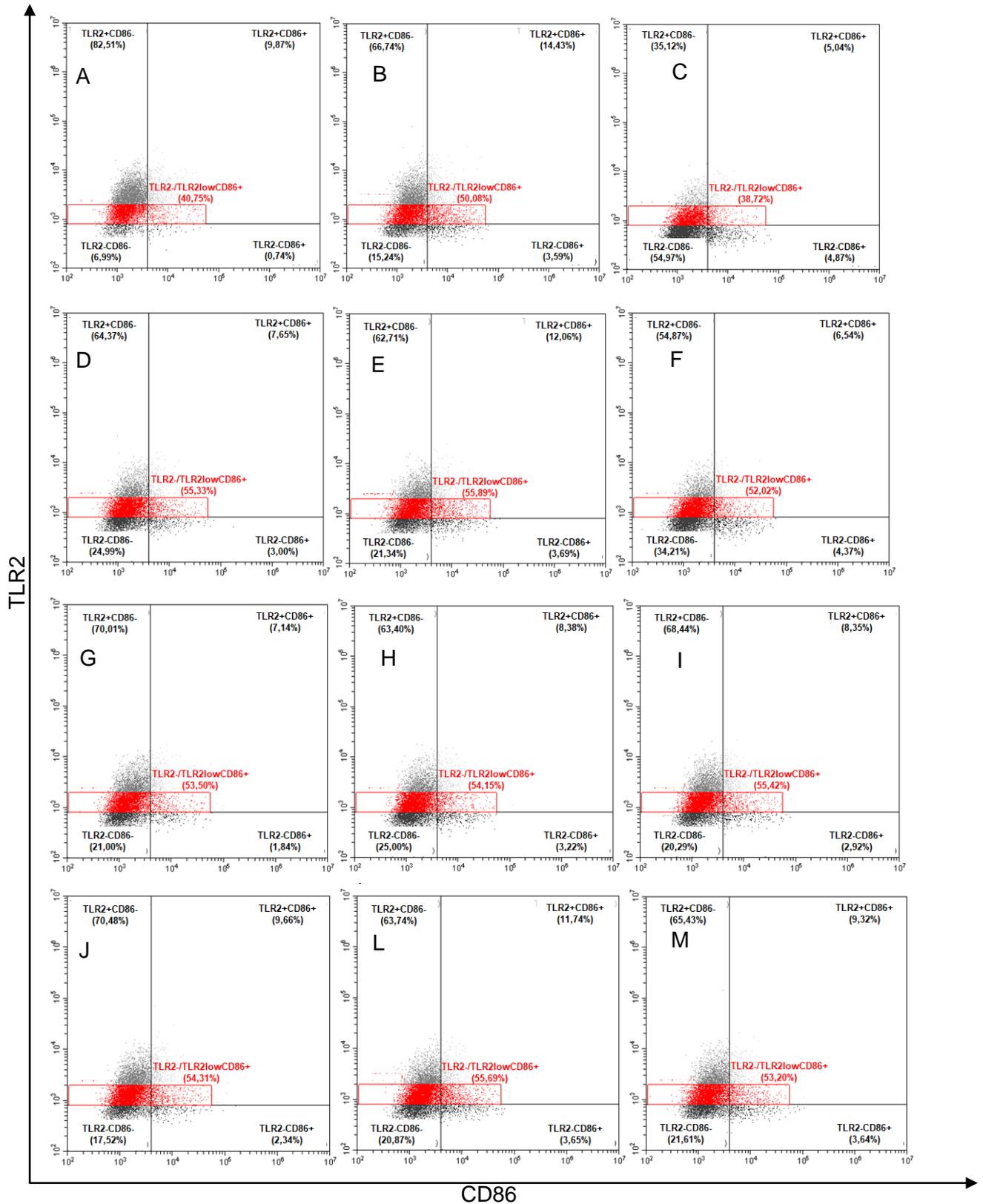
Fonte: (Do autor, 2018). Gráfico contendo os valores de expressão de NS-1 em intensidade de fluorescência (MIF) em 6 experimentos. MO = células diferenciadas não infectadas. As moTHP-1 foram infectadas com diferentes diluições do DENV-2 por 24h. Eixo X diluição seriada do vírus 1:4. Eixo Y mediana geométrica de MIF.

5.4.1 Expressão de membrana de TLR2 pelo vírus DENV-2

As células THP-1 diferenciadas em macrófagos quando estimuladas com INF γ /LPS expressaram um perfil majoritário de células TLR2⁺CD86⁻ e algumas TLR2⁺CD86⁺ ou TLR2⁻CD86⁻. Quando essas células foram tratadas com IL-4/IL-13 notou-se uma menor expressão do TLR2 e uma maior quantidade de células CD86⁺TLR2^{low} ou TLR2⁻, bem como na população duplo negativa, quando

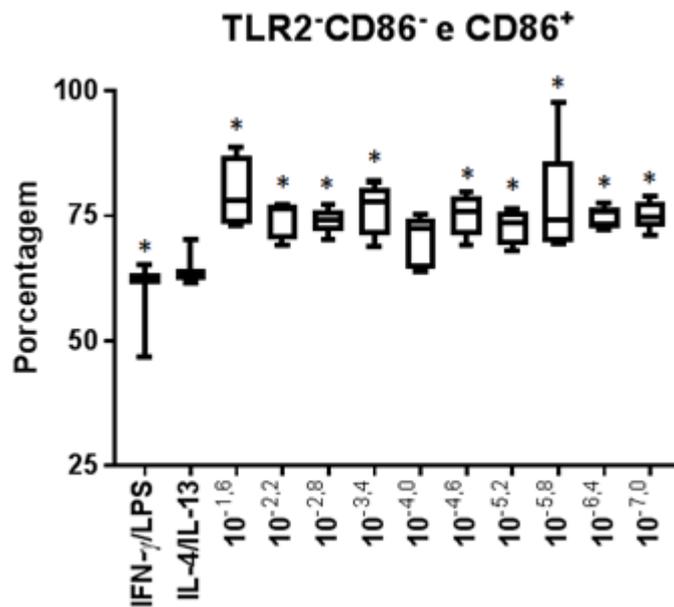
comparadas com as células para o perfil M1 (Figura 13A e B). A infecção das moTHP-1 com DENV-2 levou a uma diferença de cerca de 50% na expressão de TLR2⁺ e a uma maior quantidade de células com os perfis TLR2^{low} CD86⁺ ou TLR2^{low}CD86⁻ quando comparado com as moTHP-1 estimuladas com IFN- γ /LPS, assumindo um perfil mais semelhante àquele observado em moTHP-1 estimuladas com IL-4/IL-13 (Figura 13C-M). Todavia, esses achados ficam evidentes quando foi avaliado conjuntamente as populações duplo negativas mais as células TLR2^{low} em todos os experimentos realizados e comparando com células estimuladas com IFN- γ /LPS (Figura 14). A soma desses parâmetros demonstrou que houve uma diminuição significativa da expressão de membrana de TLR2 quando as moTHP-1 foram infectadas com DENV-2, ocorrendo uma leve regressão do efeito causado pela infecção nas maiores diluições, porém ainda significativo quando comparado com as moTHP-1 estimuladas tanto com IFN- γ /LPS (M1) quanto com IL-4/I-L13 (M2, Figura14).

Figura 13 - Expressão de membrana de TLR2 X CD86 em moTHP-1 infectadas com DENV-2



Fonte: (Do autor, 2018). moTHP-1 estimulada com IFN- γ /LPS (A), moTHP-1 estimulada com IL-4/IL-13 (B), moTHP-1 infectadas com diferentes diluições ($10^{-1,6}$ a $10^{-7,0}$) de DENV-2 (C-M). A região, em vermelho, mostra os dot plots representativos da porcentagem de células TLR2^{low}

Figura 14 - Perda na expressão de TLR2 em moTHP-1 infectadas com DENV-2

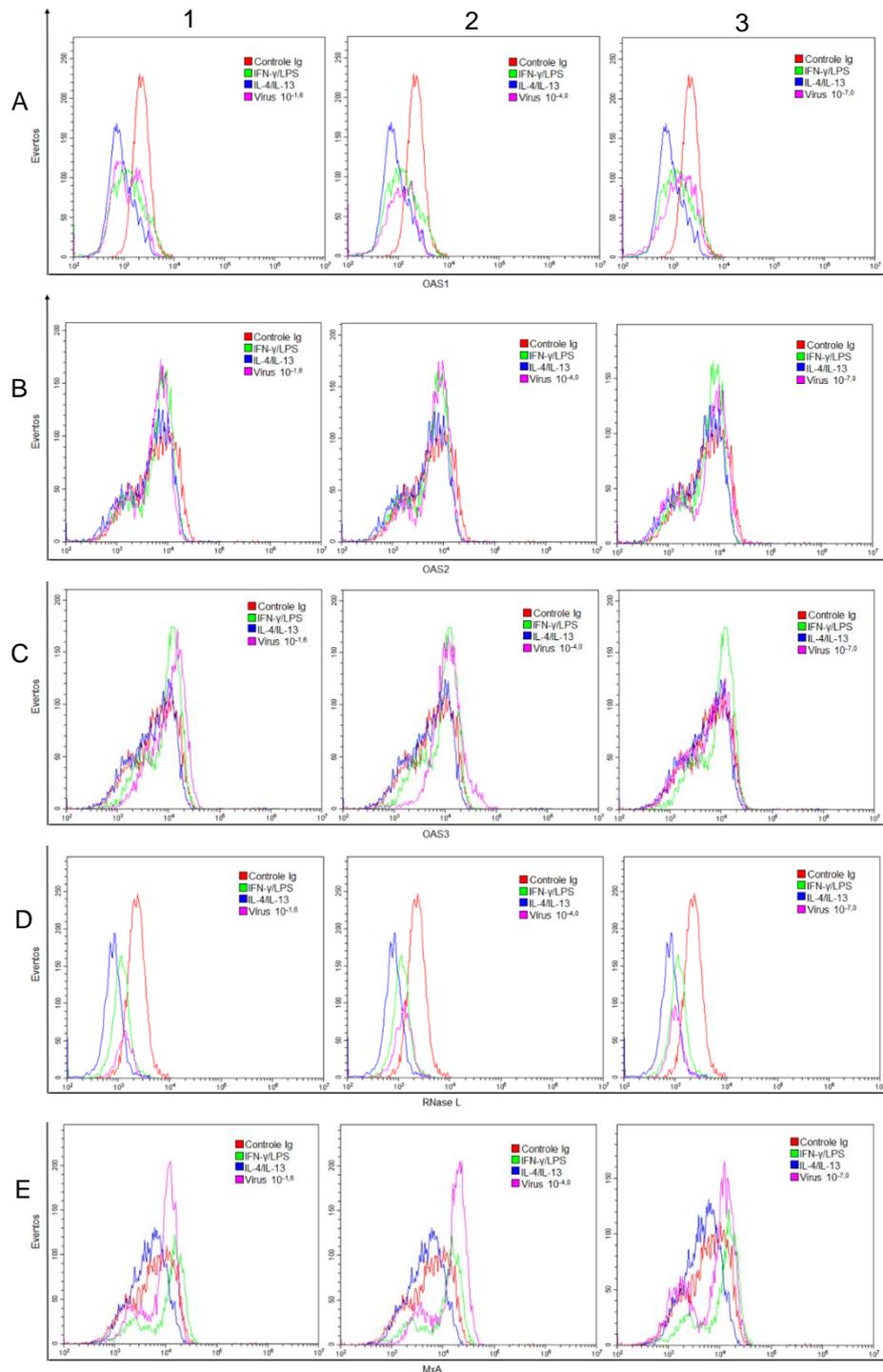


Fonte: (Do autor, 2018). Gráfico contendo valores da soma de porcentagens de TLR2⁻ e TLR2^{low+} em moTHP-1 relativo a 5 experimentos. As células foram infectadas com diferentes diluições (10^{-1.6} a 10^{-7.0}) de DENV-2. Análise estatística realizada no GraphPrism. Teste Mann-Whitney assumindo a significância entre as células estimuladas com IFN- γ /LPS e as diferentes diluições (*) no grau de confiança de 90% ($p \leq 0,1$). Apenas a diluição 10^{-4.0} não foi significativa. p valor < 0,1. Valores de significância de cada diluição estão no Apêndice C.

5.5 ESTUDO DOS EFETORES ANTIVIRAIS EM CÉLULAS INFECTADAS COM DENV-2 CEPA 0337

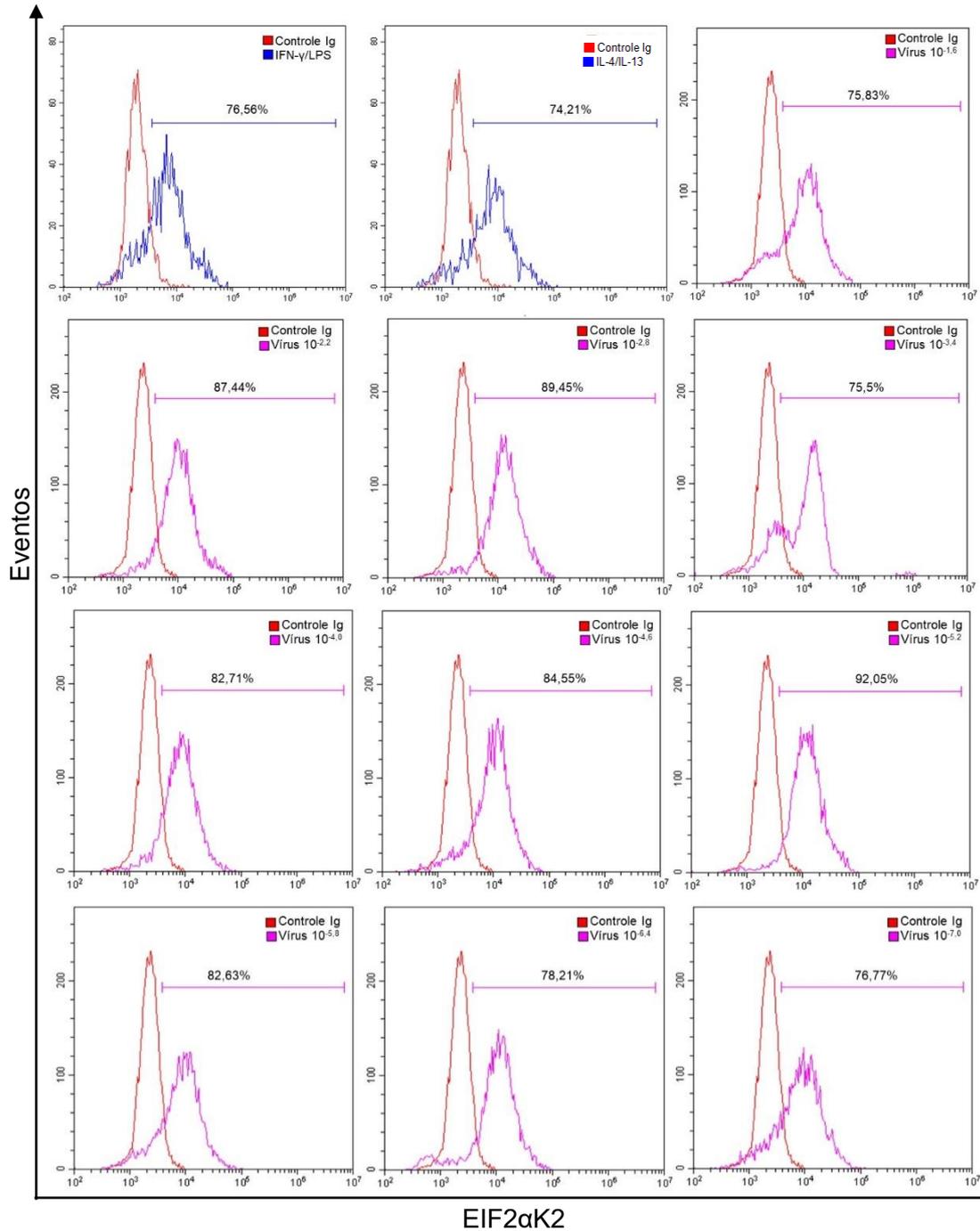
As moTHP-1 infectadas pelo DENV-2, nas condições experimentais apresentadas, não induziram níveis detectáveis das OAS 1-3, RNase L e MxA (Figura 15, Tabela 4 em Apêndice D), exceto a EIF2 α K2. O histograma de citometria obtido para esta proteína mostra um claro deslocamento para a esquerda do gráfico, em todas as variáveis. A comparação das diferentes diluições do vírus com as moTHP-1 estimuladas tanto com IFN- γ /LPS quanto com IL-4/IL-13 não apresentou uma clara diferença nos níveis de EIF2 α K2. (Figura 16 e 17).

Figura 15 - Histogramas representativos originais de citometria de fluxo mostrando a marcação intracelular de diversos efetores antivirais induzidos por interferon do tipo 1 em moTHP-1 infectadas com DENV-2



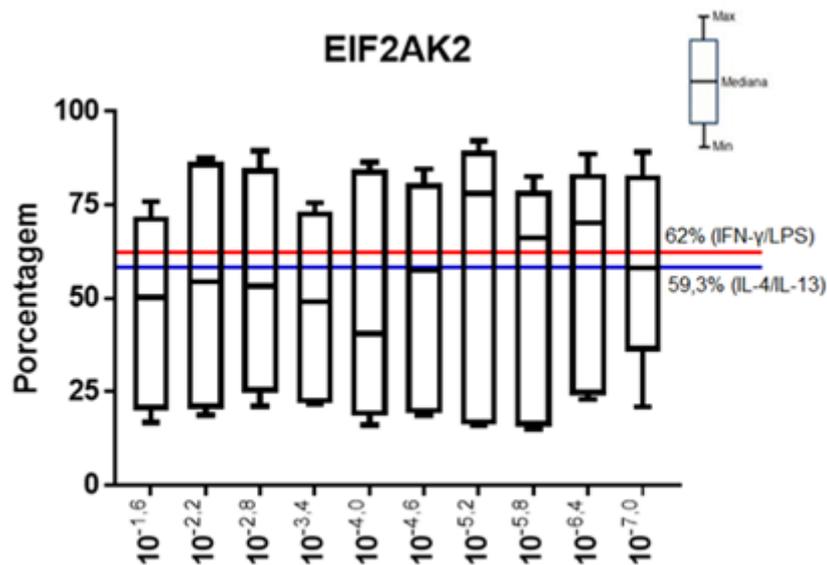
Fonte: (Do autor, 2018). OAS1 (A), OAS2 (B), OAS3 (C), RNase L (D) e MxA (E) marcadas intracelularmente em células moTHP-1. Histogramas de sobreposição de controle de Ig (vermelho), IFN- γ /LPS (verde), IL-4/IL-13 (azul) e DENV-2 (rosa). Coluna 1 = DENV-2 Diluição $10^{-1.6}$, Coluna 2 = DENV-2 Diluição $10^{-4.0}$ e Coluna 3 = DENV-2 Diluição 10^{-7}

Figura 16 - Histograma representativo de citometria de fluxo mostrando a marcação intracelular de EIF2 α K2 em moTHP-1 infectadas com DENV-2



Fonte: (Do autor, 2018). Histogramas de sobreposição controle Ig (vermelho), IFN- γ /LPS (1^o coluna a direita da figura em azul), IL-4/IL-13 (segunda coluna 1^o fileira em azul) e diluições do vírus (rosa).

Figura 17 - Box plot das porcentagens de EIF2 α K2 em moTHP-1 infectada com DENV-2

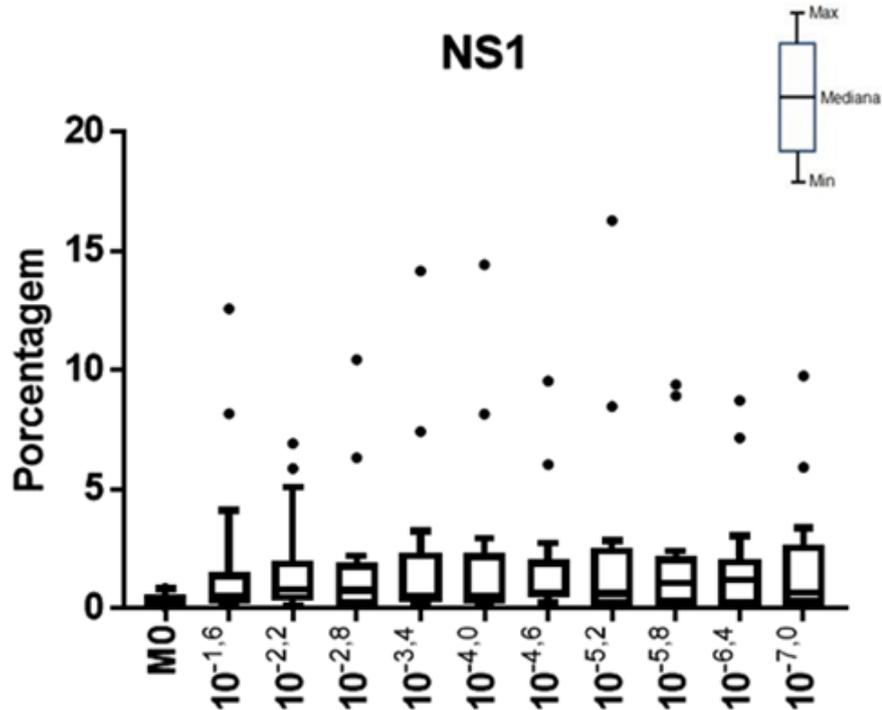


Fonte: (Do autor, 2018). Gráfico contendo valores da proteína EIF2 α K2 relativo a 6 experimentos em moTHP-1 infectadas com diferentes diluições do DENV-2. IFN- γ /LPS e IL-4/IL-13 n = 3, linha representando a média das porcentagens de M1 e M2.

5.6 AS MOTHP-1 INFECTADAS COM A VACINA DENG VAXIA®

A fim de compararmos os dados obtidos com o vírus realizamos experimentos preliminares com uma vacina comercial que contém os quatro sorotipos. Devido o número reduzido de amostras disponíveis, foram realizados 2 experimentos independentes. Novamente foi utilizado o anticorpo anti-NS-1 DENV-2 para determinar a infecção desta vacina no modelo (Figura 18). Foi observado cerca de 10% células positivas para anti-NS-1 nas moTHP-1 infectadas com a vacina, enquanto que nas células infectadas com o vírus não ultrapassaram 4% (Figura 18). Vale ressaltar que segundo os resultados obtidos para a CCID_{50%} do vírus e da vacina, foi demonstrado que a vacina continha um título maior que o vírus.

Figura 18 - Anti-NS-1 DENV-2 em amostra de vacina comercial e vírus DENV-2

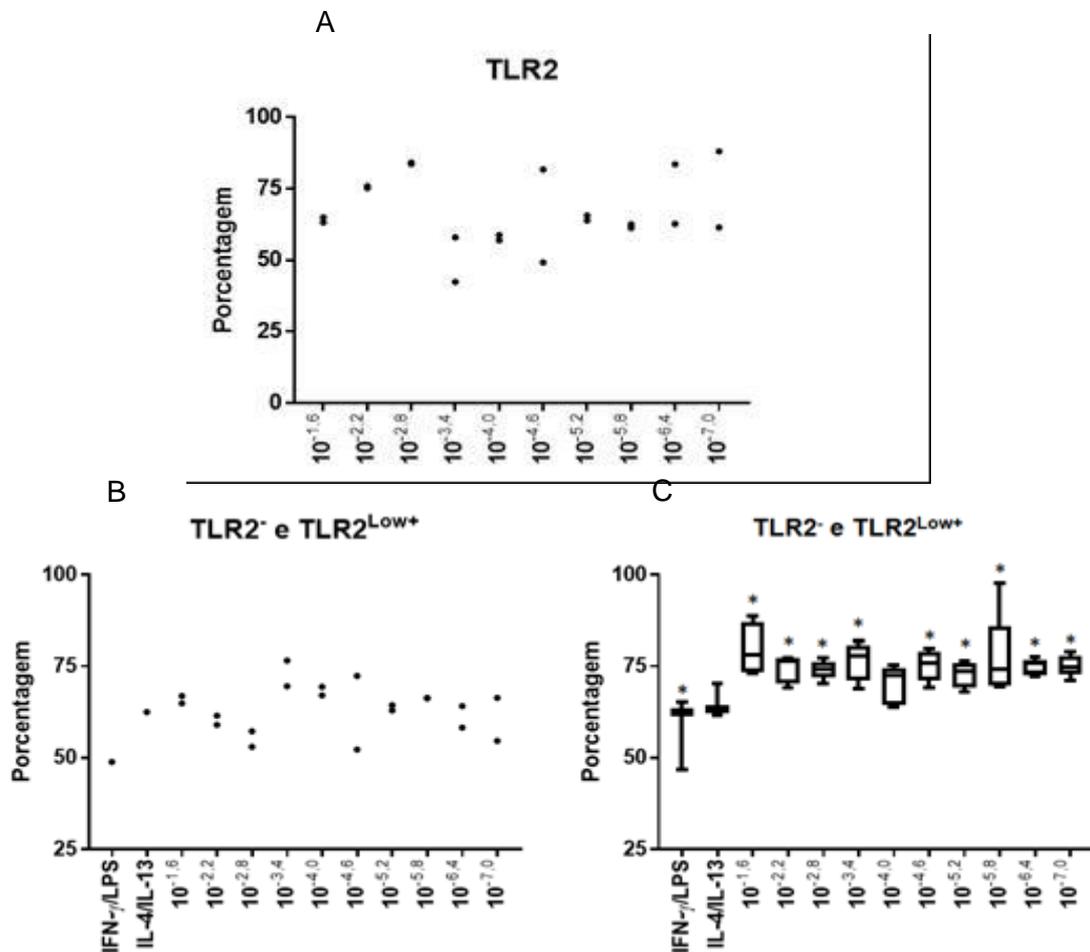


Fonte: (Do autor, 2018). Gráfico de comparação dos valores obtidos com a vacina (pontos pretos, n = 2) e com o vírus DENV-2 (box plot, n = 6) na infecção de moTHP-1 com diferentes diluições. A técnica utilizada para medir NS-1 foi a citometria de fluxo.

5.6.1 Expressão de TLR2 em moTHP-1 infectadas com vacina X DENV-2

A expressão do receptor de membrana TLR2 também foi alterada com a vacina, tendo sido observada uma menor expressão, aproximadamente 20% (Figura 19A) quando comparado a moTHP-1 estimulada com IFN- γ /LPS (cerca de 85% TLR2⁺). Quando analisada a soma das porcentagens obtidas nos perfis TLR2⁻ e TLR2^{low} da vacina e comparado com os dados obtidos com moTHP-1 infectada com o vírus DENV-2, notou-se um comportamento semelhante (Figura 19B e C).

Figura 19 - Box plot das porcentagens de TLR2 em moTHP-1 infectadas com a vacina comercial e com o vírus DENV-2



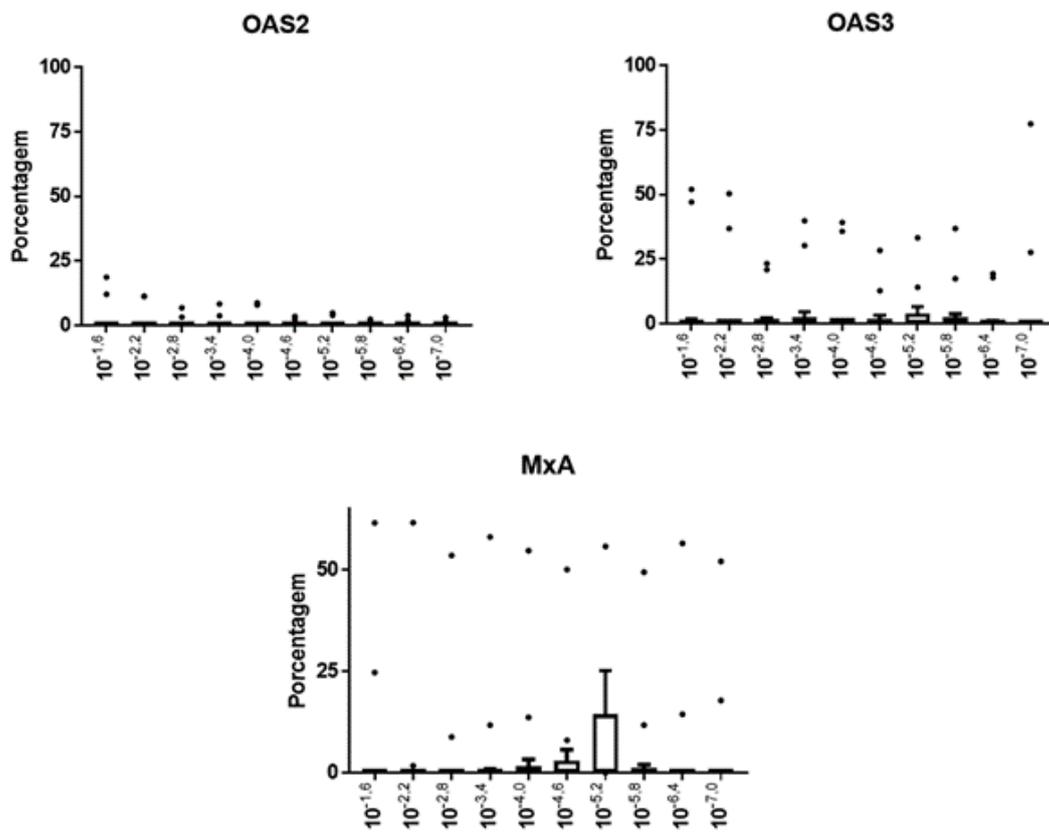
Fonte: (Do autor, 2018). Gráficos contendo valores do receptor de superfície de membrana TLR2 (A) de moTHP-1 infectadas com vacina comercial; comparação da soma dos valores de TLR2⁻ e TLR2^{low} em moTHP-1 infectadas com a vacina comercial (B) e com vírus DENV-2 (C).

5.6.2 Efeitos antivirais em moTHP-1 infectadas com vacina X DENV-2

As moTHP-1 quando infectadas com a vacina comercial contra a Dengue apresentaram um aumento nos níveis das proteínas OAS2 (diluição $10^{-1,6}$ cerca de 20% positivas), OAS3 (em média das diluições cerca de 40% positivas frente a 0% do DENV-2) e MxA (aumento mínimo cerca de 20% na primeira diluição da vacina, entretanto forte variação nos dois experimentos realizados). Além disso, foi observado uma tendência de queda nas porcentagens de células positivas para as proteínas OAS2 e MxA (Figura 20). Já a EIF2 α K2 não apresentou diferenças entre

as moTHP-1 infectadas com o vírus ou com a vacina. Não foi possível mensurar as demais proteínas nas células infectadas com a vacina (OAS1 e RNase L).

Figura 20 - Valores de OAS2, 3 e MxA em moTHP-1 infectadas com vacina X DENV-2



Fonte: (Do autor, 2018). Gráficos de comparação dos valores de OAS2, 3 e MxA obtidos com a vacina (pontos pretos, n = 2) e com o vírus DENV-2 (box plot, n = 6) na infecção de moTHP-1 com diferentes diluições.

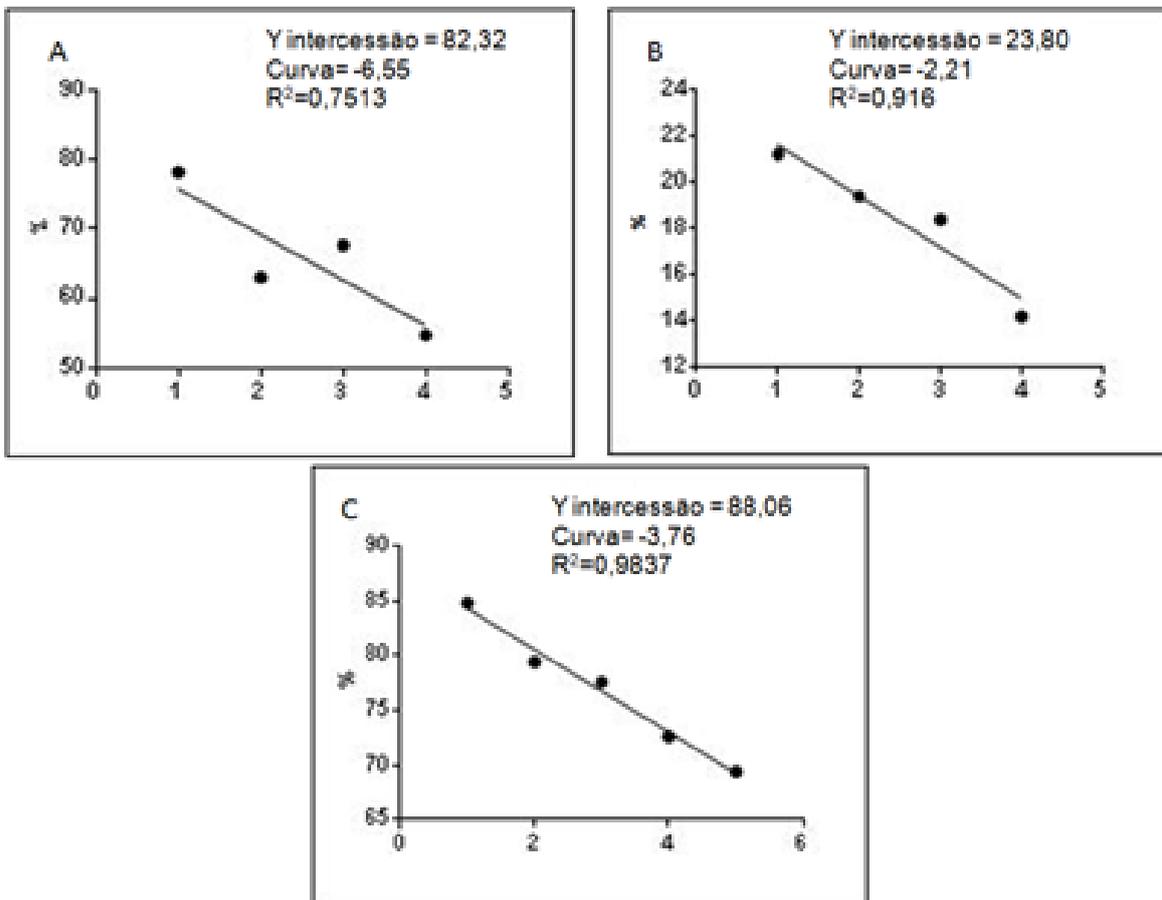
5.7 BIOMARCADORES PARA ENSAIO DE POTÊNCIA ALTERNATIVO

De todas as proteínas analisadas foram escolhidas as duas que mais mostraram um padrão diluição-dependente. Todavia, foi observado que esse padrão se encontrou na maioria das vezes entre três a quatro pontos consecutivos na curva de diluição, não necessariamente no começo ou no fim da mesma. Analisamos a regressão linear de alguns pontos das proteínas EIF2 α K2 e TLR2 tanto para as moTHP-1 infectadas com o vírus DENV-2 quanto para as infectadas com a vacina.

5.7.1 EIF2 α K2 como biomarcador para o vírus ou vacina

O efeito de diferentes diluições do vírus DENV-2 em moTHP1 revelou uma tendência, observada em todos os experimentos, conforme a diluição aumentou, o efector antiviral EIF2 α K2 diminuiu. No intuito de se avaliar a capacidade preditiva da proteína EIF2 α K2 como um biomarcador de potência, foram escolhidas algumas diluições e avaliou-se a linearidade do efeito observado (Figura 21A). Foi possível obter uma regressão linear maior que 90% nas diluições de $10^{-3,4}$ - $10^{-5,2}$ (Figura 21B) e de $10^{-4,6}$ até $10^{-7,0}$ (Figura 21C).

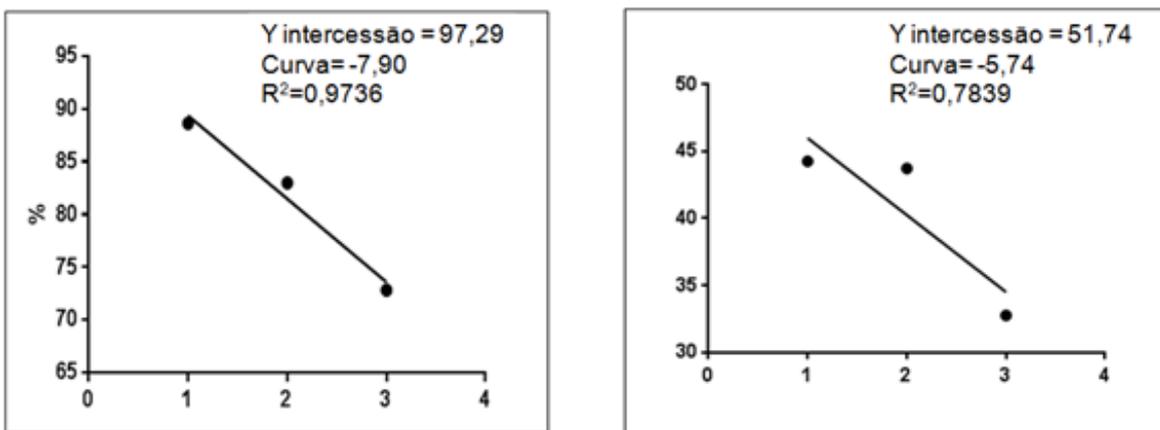
Figura 21 - EIF2 α K2 como biomarcador para ensaio de potência alternativo com DENV-2



Fonte: (Do autor, 2018). Regressão linear em três experimentos distintos de moTHP-1 infectada com vírus DENV-2 por 24h. (A) diluições de $10^{-3,4}$ - $10^{-5,2}$; (B) diluições de $10^{-3,4}$ - $10^{-5,2}$; (C) diluições de $10^{-4,6}$ até $10^{-7,0}$

Os experimentos preliminares com a vacina comercial contra Dengue mostraram a mesma tendência que foi observada com o vírus (Figura 22). No entanto, obteve-se uma grande variação ao longo das repetições do ensaio, onde no primeiro experimento a regressão foi de cerca de 70% (Figura 22A) e no experimento B foi de cerca de 90%, Figura 22B). Esses dados mostram a necessidade de mais experimentos para compreender melhor se este efector antiviral poderia vir a ser sugerido como um biomarcador para a avaliação da potência da vacina.

Figura 22 - EIF2 α K2 como biomarcador para ensaio de potência alternativo com a vacina Dengvaxia®



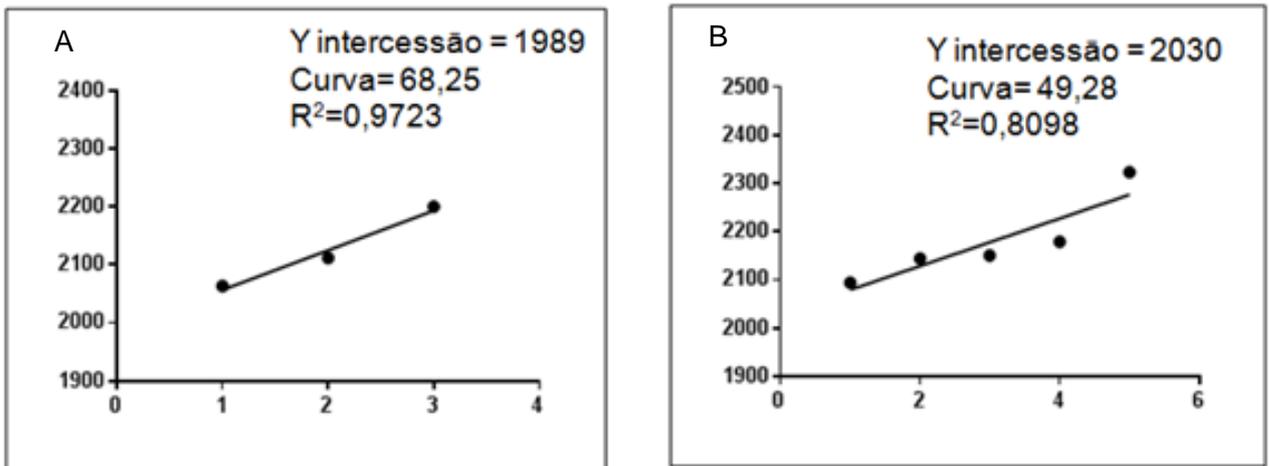
Fonte: (Do autor, 2018). Regressão linear em dois experimentos distintos de moTHP-1 infectada com a vacina comercial Dengvaxia®

5.7.2 TLR2 como biomarcador para o vírus ou vacina

A menor expressão do TLR2 foi significativa nas moTHP-1 infectadas com o vírus DENV-2 e as infectadas com a vacina apresentaram resultados semelhantes. Ao observar esse efeito nas diferentes diluições percebeu-se a possibilidade do uso desse receptor como um possível desfecho para o desenvolvimento de um ensaio de potência alternativo. Desta forma, foi avaliada a regressão linear em diferentes experimentos e diferentes diluições (Figura 23). Foi observada uma linha crescente, em contraste com o observado com EIF2 α K2, porém com um valor de R mais elevado (97% Figura 23A e 81% Figura 23B). A faixa de diluição utilizada para verificar a linearidade foi de $10^{-4,0}$ até $10^{-5,2}$ (Figura 23A) e $10^{-1,6}$ até $10^{-4,0}$ (Figura 23B).

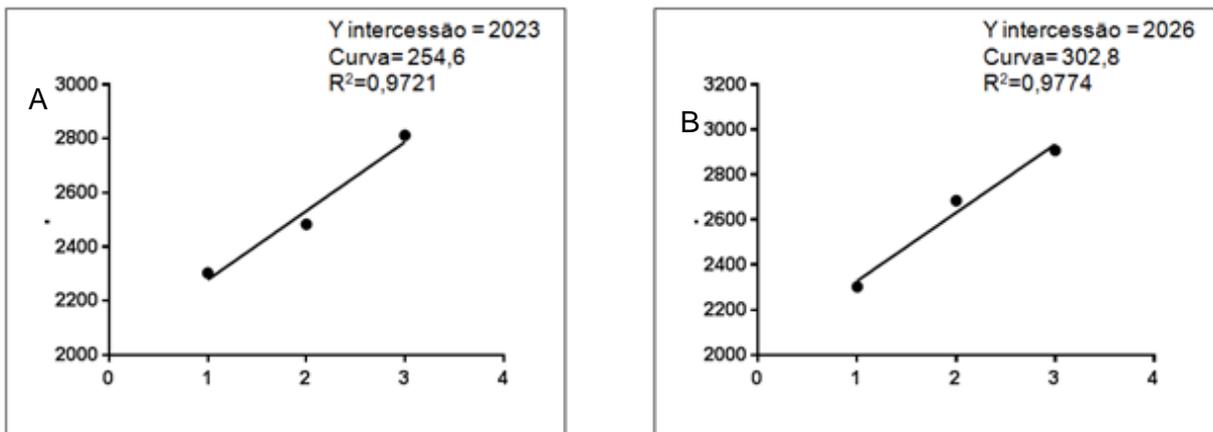
As células infectadas com a vacina demonstraram a mesma tendência, com valores de R maiores e quase idênticos (97%, Figura 24A e B). A faixa de diluição utilizada foi de $10^{-1,6}$ até $10^{-2,8}$ em ambos os experimentos.

Figura 23 - TLR2 como biomarcador para ensaio de potência alternativo com DENV-2



Fonte: (Do autor, 2018). Regressão linear em dois experimentos distintos de moTHP-1 infectada com vírus DENV-2 por 24h. (A) diluições de $10^{-4,0}$ até $10^{-5,2}$ e (B) diluições de $10^{-1,6}$ até $10^{-4,0}$

Figura 24 - TLR2 como biomarcador para ensaio de potência alternativo com a vacina Dengvaxia®



Fonte: (Do autor, 2018). Regressão linear em dois experimentos distintos de moTHP-1 infectada com a vacina Dengvaxia®. (A) e (B) diluições de $10^{-1,6}$ até $10^{-2,8}$

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi investigado diversos marcadores de superfície e intracelulares em macrófagos diferenciados de células THP-1 (moTHP-1) quanto a possíveis alterações na expressão ou nível destes após infecção por DENV-2 ou por uma vacina comercial contra Dengue, contendo os quatro sorotipos do vírus atenuados. Além disso, foi avaliada a possibilidade de polarização da moTHP-1 para perfis M1 ou M2 pelo vírus DENV-2 ou vacina comercial contra a Dengue, sendo utilizado como controle moTHP-1 estimuladas com IFN- γ /LPS (M1) ou IL-13/IL-4 (M2). As células THP-1 são uma linhagem monocítica amplamente utilizada, pela facilidade de cultivo e de diferenciação em macrófagos (AUWERX, 1991; BASTIAAN-NET *et al.*, 2013; CHANPUT *et al.*, 2012, 2013; CHANPUT; MES; WICHERS, 2014; TSUCHIYA *et al.*, 1982). O protocolo mais utilizado para diferenciar essas células em macrófagos utiliza PMA, sendo que o mesmo pode induzir a ativação de NF κ B e com isso levando uma diferenciação polarizada para um perfil inflamatório, M1 (CHENG *et al.*, 2015). Entretanto, há controversas na determinação dos protocolos para diferenciação, bem como relativo a polarização desta linhagem. Daigneault *et al.* (2010) descreveu que a diferenciação utilizando 200nM (120ng/mL) de PMA por três dias, seguido de cinco dias em meio de cultura sem PMA, aumentou a expressão de marcadores específicos para macrófagos. De uma forma geral, a diferenciação de THP-1 em macrófagos requer um protocolo com concentrações altas numa faixa de 100 a 200nM (60-120 ng/mL) por 72 a 96 horas (CHANG, 2009). Em contrapartida, Maeß *et al.* (2014), tentando otimizar um protocolo de transfecção com moTHP-1, relataram que as altas concentrações de PMA alteravam a resposta dessas células e que doses mais baixas de PMA (10 a 100ng/mL incluindo a concentração de 20 ng/mL) aumentaram a resposta de moTHP-1 aos estímulos para polarização. Tendo em vista os diversos trabalhos descritos na literatura e dados prévios obtidos sobre a cinética de concentração de PMA, escolheu-se utilizar neste estudo 20ng/mL por 48h, seguido de 24h em meio de cultura sem PMA. A escolha deste protocolo se deve a menor toxicidade do PMA (analisada por 7AAD), maior produção de NO (Apêndice A) e maior perda da molécula de superfície CD14 (Figura 9); sendo esse protocolo semelhante ao sugerido por Maeß *et al.* (2014).

Para indução da polarização *in vitro* de moTHP-1 em variados perfis de macrófagos também foram descritos diversos protocolos utilizando diferentes estímulos, tais como IL-10/TGF β 1 ou IL-4/IL-13 para M2 e IFN- γ /LPS para M1 por períodos diferentes, de 24 a 72 horas de estimulação com concentrações de 5 a 25 ng/mL das citocinas e de LPS em uma faixa de 0,001 μ g a 1 μ g (CHANPUT *et al.*, 2013; MAEß *et al.*, 2014; SPENCER *et al.*, 2010; CARAS *et al.*, 2011). Neste trabalho usamos o protocolo segundo Chanput *et al.* (2013), com algumas modificações; foi utilizado o tempo de 24h para as moTHP-1 estimuladas com IFN- γ e LPS e o perfil foi verificado avaliando a expressão dos marcadores de superfície TLR2 e CD86, bem como a produção de NO. Foi observado que as células do perfil M1 apresentavam majoritariamente TLR2⁺CD86⁻ ou TLR2⁺CD86⁺, enquanto as células estimuladas para o perfil M2 tenderam para TLR2^{low}CD86⁻, TLR2^{low}CD86⁺, TLR2⁻CD86⁺ ou TLR2⁻CD86⁻. Os resultados obtidos através da análise dos níveis de NO produzidos não demonstraram diferença significativa entre os dois grupos de estímulo, podendo indicar por um lado que a polarização alcançada não foi suficientemente alta nesse modelo para verificarmos alterações nos níveis de NO ou o mesmo não seria um bom marcador para polarização de moTHP-1. Contudo, existem, na literatura, relatos contraditórios a respeito da polarização das moTHP-1. Maeß *et al.* (2014) utilizando a regulação do receptor de quimiocina C-C do tipo 7 (CCR7) como marcador de ativação pró-inflamatória observou que o PMA induziu uma ativação dose dependente em moTHP-1, mostrando que em concentrações muito elevadas o PMA sozinho conduz a um perfil pró-inflamatório nestas células. Ao estimular estas células com a citocina IL-10, elas não foram capazes de alterar sua polarização para um perfil anti-inflamatório quando avaliadas as expressões de CCR7, SOCS3 e IL-10 (MAEß *et al.*, 2014). Já Tjiu *et al.* (2011) relatou que células THP-1 tratadas com 320nM (192ng/mL) de PMA exibiam uma significativa expressão do receptor de manose CD206, um marcador para macrófagos com perfil anti-inflamatório, além de altos níveis de TGF β 1. Essas células quando tratadas com IFN- γ e LPS apresentavam um padrão de citocinas pró-inflamatórias (altos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6) e marcadores de superfície específicos para M2 (CD206 e CD204), mostrando uma mudança no perfil fenotípico destas células para M1. Outra questão comumente levantada na literatura é a definição de marcadores para a determinação da polarização de macrófagos em geral. Em uma revisão publicada

por Patel *et al.* (2016) os autores descreveram diversos marcadores de superfície para os perfis M1 e M2, bem como relataram diversas proteínas produzidas por esses perfis após estímulos diferentes. Os marcadores de superfície, tais como os TLR2 e 4, CD86, MHC-II, entre outros caracterizariam um perfil M1, enquanto TLR2^{low} ou ausente, CD86, CD206, CD163, dentre outros definiriam um perfil M2 (KIM *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2017; TANGA; NUTILE-MCMENEMY; DELEO, 2005; WANG; LIANG; ZEN, 2014). Quanto a produção de NO, um aumento estaria relacionado a ativação de células M1 (PATEL *et al.*, 2017; WANG; LIANG; ZEN, 2014). A polarização definida apenas pela expressão ou perda de um marcador ou dois de superfície não deve ter um caráter decisivo, porém é um indicativo que neste modelo alterações de TLR2 e CD86 foram induzíveis com as citocinas e LPS utilizadas. Como na literatura apresentada percebemos que há diversos marcadores para a polarização de uma forma geral, sendo assim seria interessante a ampliação no futuro das moléculas de superfície a serem avaliadas, bem como mensurar as citocinas produzidas após os diferentes estímulos e assim confirmam a polarização das moTHP-1 nas condições utilizadas.

A participação do TLR2 no reconhecimento de PAMPs e seu papel como marcador fenotípico para células M1 e em baixa expressão em M2, tornaram-no atraente para investiga-lo como possível personagem na infecção dessas células pelo DENV-2. De fato, já há relatos de tropismo do vírus DENV por macrófagos (KYLE; BEATTY; HARRIS, 2007), bem como em PBMCs (AZEREDO *et al.*, 2010; CHEN; NG; CHU, 2015) e em células dendríticas (GEORGE *et al.*, 2017) foi observado um aumento da expressão de TLR2 após pelo menos 2 dias de infecção com DENV. Nessa dissertação, foi observada uma expressão menor de TLR2 em moTHP-1 infectadas tanto com o vírus DENV-2 quanto com a vacina contendo os quatro sorotipos, quando comparamos com as células estimuladas para um perfil M1. Os dados obtidos aqui com o vírus ou vacina, considerando esse receptor, foram mais próximos aos obtidos com o estímulo para M2. Não foi possível medir os receptores de superfície (CD86 e TLR2) nas moTHP-1 sem estímulo. Sendo assim, foi discutida duas possibilidades hipotéticas. A primeira seria a possibilidade de TLR2 ser internalizado após reconhecimento do vírus, nesse caso ocorreria uma perda do receptor na membrana no tempo de 24 horas. Há trabalhos que demonstraram que o TLR2 pode ser internalizado após reconhecimento de PAMPs,

porém ainda não se definiu qual seria a consequência deste fenômeno (BRANDT *et al.*, 2013; TRIANIAFILOU *et al.*, 2004; UNDERHILL *et al.*, 1999). Outra hipótese seria que a infecção regularia positivamente a expressão de TLR2 na membrana e essa molécula estaria aumentando conforme o suceder da infecção. Esta última hipótese estaria em acordo com os dados publicados em PBMCs por Azeredo *et al.* (2010) e George *et al.* (2015). Para elucidar estas questões em aberto experimentos incluindo moTHP-1 sem estímulo, bem como incluindo o bloqueio de TLR2 e uma cinética de tempo devem ser realizados.

Outro braço desta dissertação foi investigar a participação de diversos efetores antivirais induzidos por interferon do tipo 1 nesse modelo. Há diversos relatos na literatura sobre a atuação de OAS, EIF2 α K2 e MxA na infecção por DENV nos mais diversos modelos celulares (JADHAV *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2009; PADWAD *et al.*, 2010; UMAREDDY *et al.*, 2008). Suma, esses efetores antivirais parecem ter papéis dependentes do tipo celular estudado. Jadhav *et al.* (2018) demonstrou a participação de OAS em uma linhagem de macrófagos, a U937. Em estudo comparando cepas diferentes de DENV-2 em linhagem de células hepáticas humanas, HepG2, apresentaram diferenças na expressão de OAS, MxA e EIF2 α K2 (UMAREDDY *et al.*, 2008). Outro estudo com THP-1 não diferenciadas e silenciadas para a proteína de choque térmico 70 (heat shock protein 70) mostraram um aumento de EIF2 α K2 em células infectadas com o vírus DENV-2 (PADWAD *et al.*, 2010). Os resultados aqui obtidos com as moTHP-1 sugerem que essas células expressam EIF2 α K2 intracelular e que, conforme a diluição do vírus DENV aumenta, a porcentagem de células positivas para esta proteína diminuiu, indicando um possível papel dessa proteína na infecção com o vírus, corroborando com os dados relatados para as THP-1 não diferenciadas e em outras células (PADWAD *et al.*, 2010; UMAREDDY *et al.*, 2008). Além disso, não foi possível detectar nenhuma das três formas da OAS, bem como a proteína MxA na infecção das moTHP-1 com DENV-2. Contudo, com a vacina contendo os quatro sorotipos, as moTHP-1 apresentaram uma clara positividade para as formas OAS2 e 3, MxA e EIF2 α K2. Esse fato indica que outros sorotipos poderiam ser reconhecidos por PRRs diferentes. No entanto, são necessários outros experimentos, incluindo ensaios com os sorotipos separados, a fim de avaliarmos essa possibilidade, bem como outras metodologias para confirmar os níveis dessas proteínas.

Como último aspecto a ser discutido nessa dissertação, as proteínas escolhidas para estudar a possibilidade de utiliza-las em um ensaio de potência alternativo para a vacina contra Dengue. A OMS prescreve que o principal aspecto a ser considerado para desenvolver um ensaio de potência é avaliar um desfecho que seja por um lado a prova da eficácia e por outro responda de forma linear em uma curva de diluições no modelo proposto (OMS, 2013). Atualmente os ensaios de potência para vacinas virais atenuadas são realizados em cultura de células e visam apenas verificar a infectividade sem qualquer proximidade ao efeito fisiológico (COUNCIL OF EUROPE, 2008-a). De forma preliminar, foram realizadas algumas tentativas de encontrar uma regressão ideal nos dados obtidos tanto com o vírus quanto com a vacina para as proteínas TLR2 e EIF2 α K2, foram consideradas eleitas por apresentarem resultados mais lineares. De fato, ao serem avaliadas algumas diluições percebeu-se que o TLR2 poderia ser um bom desfecho, visto que a regressão obtida ultrapassou 90%. Entretanto, visto que o título obtido com a vacina e com o vírus, conforme visto no ensaio de CCID_{50%}, foi baixo e a resposta linear encontrava-se entre as três primeiras diluições (vacina) e com o vírus variando entre as cinco últimas ou as três últimas diluições, seriam necessários mais estudos; talvez com intervalos menores mais ao invés de 1:4, utilizando um fato menor 1:2. Este fator é utilizado para ensaios com vírus de baixa infectividade (FUCHES, 2003, 2010; MOURA, 2009).

7 CONCLUSÕES

A diferenciação da linhagem THP-1 utilizando PMA foi realizada com sucesso, as células diferenciadas apresentaram características semelhantes aos macrófagos como mudanças no tamanho, granulosidade e perda da molécula de superfície CD14, mostrando que o protocolo utilizado neste trabalho, para diferenciação desta linhagem, foi eficiente.

As moTHP-1 estimuladas com IFN- γ /LPS (M1) apresentaram majoritariamente os perfis TLR2⁺CD86⁻ ou TLR2⁺CD86⁺ enquanto as células estimuladas para o perfil M2 (IL-4/IL-13) tenderam para TLR2^{low}CD86⁻, TLR2^{low}CD86⁺, TLR2⁻CD86⁺ ou TLR2⁻CD86⁻, visto que na literatura os marcadores de superfície, tais como os TLR2 e 4, CD86, MHC-II, entre outros caracterizaram um perfil M1, enquanto TLR2^{low} ou ausente, CD86, CD206, CD163, dentre outros definiriam um perfil M2, conclui-se que a polarização das células com base nesses receptores foi possível. Entretanto, estudos mensurando citocinas e outros marcadores dessas células devem ser conduzidos a fim de confirmar os dados obtidos.

Observamos que as moTHP-1 infectadas com diferentes diluições tanto do vírus DENV-2 quanto da vacina comercial contra a dengue apresentaram uma expressão menor de TLR2 quando comparadas com as células estimuladas para o perfil M1. As porcentagens do receptor TLR2 nas moTHP-1 infectadas com DENV-2 ou com a vacina foram semelhantes as encontradas nas células estimuladas para o perfil M2, fato que leva a conclusão que o DENV-2 e a vacina estariam modulando a expressão desse receptor.

As moTHP-1 infectadas com DENV-2 apresentaram altas porcentagens de EIF2 α K2 intracelular. Conforme a diluição do vírus DENV-2 aumentou, a porcentagem de células positivas para esta proteína diminuiu, indicando um possível papel dessa proteína na infecção com vírus. Os demais efetores antivirais não apresentaram positividade nas moTHP-1 infectadas com o vírus DENV-2 nesse modelo. Conclui-se então que a EIF2 α K2, mas não os outros efetores antivirais investigados, foi modulada pela infecção do DENV-2 no modelo apresentado.

Com a vacina contendo os quatro sorotipos da Dengue houve uma clara positividade para as formas OAS2 e 3, MxA e EIF2 α K2, indicando que os outros

sorotipos presentes na vacina poderiam estar sendo reconhecidos por diferentes PRRs.

Foi possível encontrar para o receptor de superfície TLR2 uma regressão de mais de 90% em alguns pontos de diluição, tanto do vírus quanto da vacina. Concluimos, então, que esse receptor poderia ser um biomarcador candidato para o desenvolvimento de um teste de potência alternativo para vacina contra dengue.

8 PERSPECTIVAS

Avaliar os diferentes efetores antivirais e receptores de superfície celular em células THP-1 diferenciadas em macrófagos sem nenhum estímulo.

Diminuir o fator de diluição do vírus DENV-2 e da vacina buscando melhorar a linearidade entre os pontos, além de realizar mais experimentos, possibilitando assim uma melhor análise estatística.

Estudos mensurando outras citocinas (IL-10, IFN- γ) e outros marcadores devem ser conduzidos a fim de confirmar os dados obtidos.

REFERÊNCIAS

- PRECIOSO, A.R.; PALACIOS, R.; THOMÉ, B.; MONDINI, G.; BRAGA, P.; KALIL, J. Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, 2015.
- AUWERX, J. The human leukemia cell line, THP-1 : A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. **Birkh/iuser Verlag Basel**, v. 47, p. 22–23, 1991.
- AZEREDO, E. L. *et al.* Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. **Immunology**, v. 130, n. 2, p. 202-216, 2010.
- AZEVEDO, A. S. *et al.* DNA Vaccines against Dengue Virus Type 2 Based on Truncate Envelope Protein or Its Domain III. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. 1-8, 2011.
- BARRON, L.; WYNN, T. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 300, n. 09, p. 723-728, 2011.
- BASTIAAN-NET, S. *et al.* Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 167-175, 2013.
- BAYDOUN, A. R. *et al.* Discrimination between citrulline and arginine transport in activated murine macrophages: inefficient synthesis of NO from recycling of citrulline to arginine. **British Journal of Pharmacology**, v. 112, n. 2, p. 487-492, 1994.
- BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 6, p. 3733-3739, 2008.
- BERNADETE, M.; EDUARDO, P. **Vigilância Sanitária para Gestores Municipais de Serviços de Saúde**. [s.l: s.n.]. (Série Saúde & Cidadania).
- COLLER, Beth-Ann G.; CLEMENTS, DAVID E.; BETT, ANDREW J.; SAGAR, SANGEETHA L.; TER MEULEN, J. H. The Development of Recombinant Subunit Envelope-Based Vaccines to Protect Against Dengue Virus Induced Disease. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7267-7275, 2012.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.
- BRADY, O. J. *et al.* Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.
- BRANDT, K. J. *et al.* TLR2 ligands induce NF-κB activation from endosomal

compartments of human monocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

BROWN, M. B. et al. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-10, 2014.

SIMMONS, Cameron P.; FARRAR, Jeremy J. M.D.; Ph.D.,
VAN VINH CHAU, Nguyen; WILLS, Bridget. Dengue. **The New England Journal of Medicine**, p. 1423-1432, 2012.

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

CHANG, Z.L. Recent development of the mononuclear phagocyte system: in memory of Metchnikoff and Ehrlich on the 100th Anniversary of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Biology of the Cell**, v. 101, n. 12, p. 709-721, 2009.

CHANPUT, W. *et al.* β -Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 56, n. 5, p. 822-833, 2012.

CHANPUT, W. *et al.* Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. **Food and Function**, v. 4, n. 2, p. 266-276, 2013.

CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 37-45, 2014.

CHEN, J.; NG, M. M. L.; CHU, J. J. H. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 7, p. 1-34, 2015.

CHENG, Y. L. *et al.* Dengue Virus Infection Causes the Activation of Distinct NF- κ B Pathways for Inducible Nitric Oxide Synthase and TNF- Expression in RAW264.7 Cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

CHUANSUMRIT, A.; CHAIYARATANA, W. Hemostatic derangement in dengue hemorrhagic fever. **Thrombosis Research**, v. 133, n. 1, p. 10-16, 2014.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418-11431, 2006.

COSTA, S. M. *et al.* DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. **Virology**, v. 358, n. 2, p. 413-423, 2007.

DURBIN, A. P. *et al.* in a live attenuated tetravalent DENV vaccine. v. 29, n. 42, p. 7242-7250, 2012.

FARIA, N. R. DA C. *et al.* Twenty Years of DENV-2 Activity in Brazil: Molecular Characterization and Phylogeny of Strains Isolated from 1990 to 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, 2013.

FUCHES, R. M. M. **Avaliação da imunogenicidade da vacina contra raiva em células Vero , desenvolvida no Instituto Butantan , segundo dois esquemas de imunização , em camundongos Avaliação da imunogenicidade da vacina contra raiva em células Vero , desenvolvida no Instituto.** 2003. 55 f. Dissertação (Mestrado em em Ciências) - Programa de Pós-Graduação da Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2003.

FUCHES, R. M. M. **Validação de bioensaios para o estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva.** 2010. 83 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

GEORGE, J. A. *et al.* TLR2/MyD88 pathway-dependent regulation of dendritic cells by dengue virus promotes antibody-dependent enhancement via Th2-biased immunity. **Oncotarget**, v. 8, n. 62, p. 106050-106070, 2017.

GONG, L.; DEVENISH, R. J.; PRESCOTT, M. Autophagy as a macrophage response to bacterial infection. **IUBMB Life**, v. 64, n. 9, p. 740-747, 2012.

GORDON, S. Alternative activation of macrophage by IL-10. **Nature reviews Immunology**, v. 3, n. 5-6, p. 23–35, 2003.

GREEN, A. M. *et al.* Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **J Mol Biol.**, v. 426, n. 6, p. 1148-1160, 2014.

GUY, B. *et al.* Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue , West Nile and Japanese encephalitis viruses. v. 28, p. 632-649, 2010.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue : a continuing global threat. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 12, p. S7-S16, 2010.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue : an update. v. 2, n. January, p. 33-42, 2002.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue : Challenges to Molecular Biology. **SCIENCE**, v. 239, n. 1893, 1988.

J. SADLER, R. G. W. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nat Rev Immunol**, v. 124, n. 1, p. 234–250, 2009.

JADHAV, N. J. *et al.* Immunomodulatory effect of 1, 25 dihydroxy vitamin D3 on the expression of RNA sensing pattern recognition receptor genes and cytokine response in dengue virus infected U937-DC-SIGN cells and THP-1 macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 62, n. July, p. 237–243, 2018.

KIM, D. *et al.* A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 14975-14983, 2007.

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

KYLE, J. L.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. Dengue Virus Infects Macrophages and Dendritic Cells in a Mouse Model of Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 12, p. 1808-1817, 2007.

LEE, E.; WEIR, R. C.; DALGARNO, L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. **Virology**, v. 232, n. 2, p. 281-290, 1997.

LENGYEJ, P. BIOCHEMISTRY OF INTERFERONS AND THEIR ACTIONS. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 51, p. 251-282, 1982.

LIN, R.J. *et al.* Distinct Antiviral Roles for Human 2',5'-Oligoadenylate Synthetase Family Members against Dengue Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8035-8043, 2009.

LINDENBACH, B.; RICE, C. MOLECULAR BIOLOGY OF FLAVIVIRUSES. **ADVANCES IN VIRUS RESEARCH**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, 2007.

LOKE, P. *et al.* Alternative Activation Is an Innate Response to Injury That Requires CD4+ T Cells to be Sustained during Chronic Infection. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3926–3936, 2007.

LOZACH, P. Y. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23698-23708, 2005.

MAESS, M. B. *et al.* Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. **Journal of Immunological Methods**, v. 402, n. 1-2, p. 76-81, 2014.

MALAVIGE, G. N. *et al.* Dengue viral infections. **Post. grad. medj.**, p. 588-601, 2004.

MARGARET A. LIU. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. **Immunological Reviews**, v. 239, n. 1, p. 62-84, 2011.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue Virus Pathogenesis : an Integrated View. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p.

564-581, 2009.

MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, p. 300-313, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PNI Programa Nacional de Imunizações**. [s.l: s.n.]. v. 91

MOURA, W. C. DE. **Aplicação do conceito dos Três Rs nos ensaios de Controle da Qualidade de imunobiológicos para Raiva Wlamir Corrêa de Moura**, 2009.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annu Rev Immunol.*, v. 29, p. 587-619, 2011.

NETTO, E. J. R. *et al.* Controle da qualidade de vacinas contra febre amarela utilizadas no Programa Nacional de Imunizações do Brasil Quality control for yellow fever vaccines used in the Brazilian National Immunization Program. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 606–612, 2011.

NOBLE, C. G. *et al.* Strategies for development of dengue virus inhibitors. **Antiviral Research**, v. 85, n. 3, p. 450–462, 2010.

OSORIO, J. E. *et al.* Development of DENVax: A chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. **HHS Public Access**. v. 29, n. 42, p. 7251-7260, 2015.

PADWAD, Y. S. *et al.* Dengue Virus Infection Activates Cellular Chaperone Hsp70 in THP-1 Cells: Downregulation of Hsp70 by siRNA Revealed Decreased Viral Replication. **Viral Immunology**, v. 23, n. 6, p. 557-565, 2010.

PAES, M. V. *et al.* Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. **Laboratory Investigation**, v. 89, n. 10, p. 1140-1151, 2009.

PATEL, U. *et al.* Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 1, p. 186-193, 2017.

PONTE, C. F. Vacinação, controle de qualidade e produção de vacinas no Brasil a partir de 1960. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 10, p. 619-653, 2003. Supl. 2.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. *et al.* From re-emergence to hyperendemicity: The natural history of the dengue epidemic in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2011.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. MINIREVIEW Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. **Virology**, v. 257, n. 1, 1999.

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. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 66, n. 3, p. 264-272, 2002.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, DYLAN B.; JAENISCH, T.; WILLIAM, G.R. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 1, n. 7446, p. 504-507, 2013.

SAMUEL, C. E. Antiviral actions of interferons. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 778-809, 2001.

SATO, H.; FUJIWARA, M.; BANNAI, S. Effect of lipopolysaccharide on transport and metabolism of arginine in mouse peritoneal macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 52, n. 2, p. 161-164, 1992.

SCHOGGINS, J; RICE, C. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. **Curr Opin Virol.**, v. 1, n. 6, p. 519-525, 2012.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 12, p. 745-759, 2015.

SOUZA, N. R. Q. **Estudo do papel da 2' -5' Oligoadenilato Sintetase (2' -5' OAS) em resposta a diversos indutores de efetores antivirais relacionados a Dengue.** 2016. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

SPENCER, M. *et al.* Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 299, n. 6, p. E1016-E1027, 2010.

SUN, W. *et al.* Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve adults Wellington. **Human Vaccines**, v. 8600, 2009.

SUTTERWALA, F. S. *et al.* Reversal of Proinflammatory Responses by Ligating the Macrophage Fcγ Receptor Type I. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 1, p. 217-222, 1998.

TANG, D. C.; DEVIT, M.; JOHNSTON, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Letters to Nature**, v. 356, 1992.

TANGA, F. Y.; NUTILE-MCMENEMY, N.; DELEO, J. A. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 16, p. 5856-5861, 2005.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000-2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013.

THISYAKORN, U.; THISYAKORN, C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 2, n. 1, p. 3-9, 2014.

TRIANIAFILOU, M. *et al.* Lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 internalization and

targeting to the Golgi are lipid raft-dependent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40882-40889, 2004.

TSUCHIYA, S. *et al.* Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester1. **Cancer Research**, v. 42, n. April, p. 1530-1536, 1982.

UMAREDDY, I. *et al.* Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 12, p. 3052-3062, 2008.

UNDERHILL, D. M. *et al.* The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, **Published online: 16 December 1999**; | doi:10.1038/35005543, p. 39, 1999.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products. **Guidance for Industry**, v. 27, n. 6, p. 568-577, 2011.

VAUGHN, D. W. *et al.* Dengue Viremia Titer , Antibody Response Pattern , and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **J Infect Dis.**, v. 188, n. 1, p. 2-9, 2000.

VERCH, T.; TRAUSSCH, J. J.; SHANK-RETZLAFF, M. Principles of vaccine potency assays. **Bioanalysis**, v. 10, n. 3, p. 163-180, 2018.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-9, 2014.

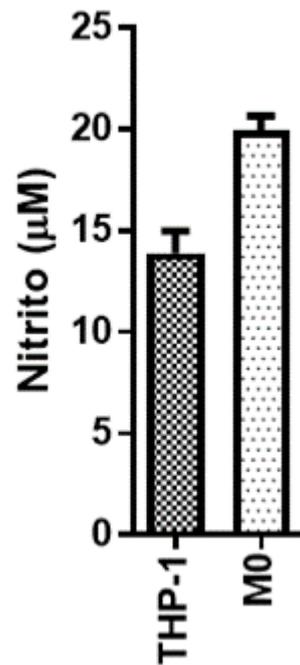
WHO. **GUIDELINES ON NONCLINICAL EVALUATION OF VACCINES**. 2003.

YU, I.M. *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v. 1834, n. 2008, 2008.

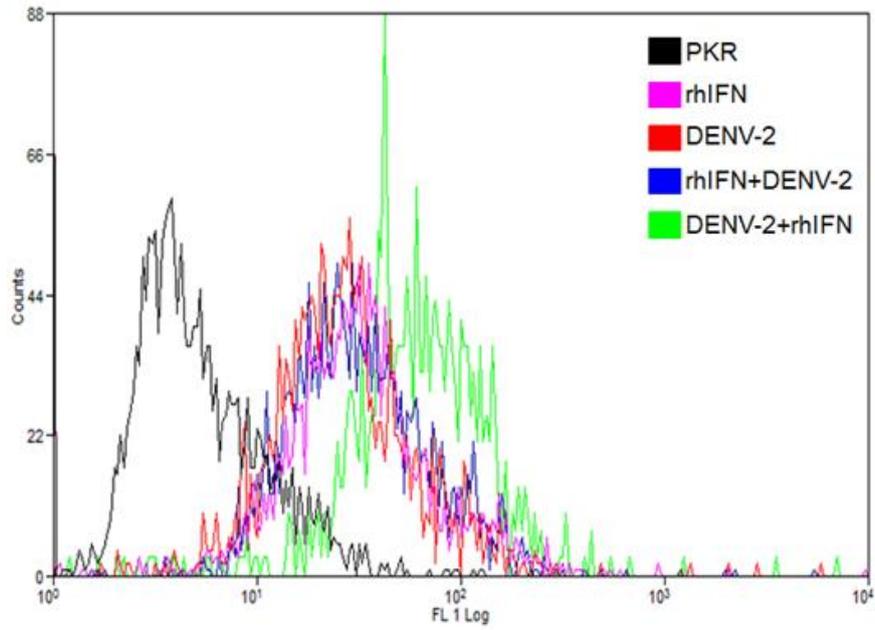
ZAITSEVA, E. *et al.* Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. **PLoS Pathog.**, v. 6, n. 10, 2010.

ZHOU, L. *et al.* Retinoid X receptor agonists inhibit phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)-induced differentiation of monocytic THP-1 cells into macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 335, n. 1-2, p. 283-289, 2010.

APÊNDICE A – Produção de NO em THP-1 e macrófagos diferenciados de THP-1



Fonte: (Do autor, 2018). Gráfico dos níveis de iNOS no sobrenadante das culturas de THP-1 sem estímulo de PMA e com estímulo de 20ng/mL de PMA (M0); media \pm desvio padrão, n = 6.

APÊNDICE B – Expressão de EIF2 α K2 em THP-1 não diferenciadas

Fonte: (Do autor, 2018). Expressão de EIF2 α K2 em células THP-1 não diferenciadas por citometria de fluxo. THP-1 sem estímulo (preto), THP-1 estimuladas com interferon do tipo 1 (IFN-1) (rosa), células infectadas com DENV-2 (vermelho), THP-1 estimuladas com IFN-1 e posteriormente infectadas com DENV-2 (azul) e células infectadas com DENV-2 e posteriormente estimuladas com IFN-1.

APÊNDICE C – Tabela com os valores de significância relativos a Figura 16

Diluições	P valor
$10^{-1,6}$	0,0571
$10^{-2,2}$	0,0357
$10^{-2,8}$	0,0357
$10^{-3,4}$	0,0357
$10^{-4,0}$	0,1071
$10^{-4,6}$	0,0357
$10^{-5,2}$	0,0571
$10^{-5,8}$	0,0357
$10^{-6,4}$	0,0357
$10^{-7,0}$	0,0357

Fonte: (Do autor, 2018). Para calcular o nível de significância entre as moTHP-1 estimuladas com IFN- γ /LPS e as diluições do vírus foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Apenas a diluição de $10^{-4,0}$ não apresentou significância.

APÊNDICE D – Tabela com as porcentagens das proteínas OAS1-3, MxA, RNase L e NS1 em moTHP-1 infectadas com o vírus DENV-2

Diluição	OAS1	OAS2	OAS3	MxA	RNase L	NS1
10 ^{-1,6}	0,63%±	0,12%±	0,68%±	0,04%±	0,88%±	1,03%±
	0,0051	0,0007	0,0072	0,00032	0,0092	0,0152
10 ^{-2,2}	0,39%±	0,38%±	0,62%±	0,07%±	1,39%±	1,37%±
	0,0034	0,0024	0,0036	0,00042	0,0160	0,0184
10 ^{-2,8}	1,62%±	0,29%±	0,84%±	0,02%±	0,68%±	0,96%±
	0,0289	0,0026	0,0078	0,0002	0,0080	0,0087
10 ^{-3,4}	0,47%±	0,28%±	1,24%±	0,33%±	1,38%±	1,15%±
	0,0041	0,0017	0,0189	0,0043	0,01366	0,0128
10 ^{-4,0}	0,38%±	0,32%±	1,08%±	0,68%±	1,08%±	1,11%±
	0,0036	0,0012	0,0062	0,0145	0,0132	0,0120
10 ^{-4,6}	0,75%±	0,44%±	1,02%±	1,30%±	1,12%±	10,39%
	0,0047	0,0031	0,0129	0,0246	0,0136	±0,2271
10 ^{-5,2}	5,42%±	0,47%±	1,83%±	5,81%±	2,51%±	1,14%±
	0,0919	0,0028	0,0270	0,1092	0,0392	0,0120
10 ^{-5,8}	1,98%±	0,34%±	1,19%±	0,57%±	1,32%±	1,15%±
	0,03494	0,0012	0,0153	0,0082	0,0170	0,0096
10 ^{-6,4}	0,44%±	0,44%±	0,56%±	0,13%±	0,97%±	1,23%±
	0,0027	0,0027	0,0033	0,0005	0,0112	0,0112
10 ^{-7,0}	1,12%±	0,37%±	0,40%±	0,18%±	1,93%±	1,27%±
	0,0123	0,0024	0,0037	0,0015	0,0259	0,0140

Média ± desvio padrão
 Fonte: (Do autor, 2018).

ANEXO A – Curva de regressão para o título da vacina Dengvaxia®

comStat Version 5.0. Friday, 10 August 2018, 10:20:03 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Dengue vaccine
Component	All types

Remarks: In cases where no slope can be calculated, it is possible to specify a fixed slope to force a result.
To mimic Spearman/Kaerber calculations specify a rectangular transformation with fixed slope equal to $1/\ln(\text{dilution factor})$.
This should only be done in cases where less than 2 non-extreme responses are observed as shown in this example.
The confidence limits are a good approximation to the Irwin/Cheeseman limits.

Sample 1	
Preparation	Type 1
Ass. pot.	? log ₁₀ CCID ₅₀ /vial
Reconstitution vol.	1 vial / 500 µl
Inoculation vol.	100 µl / well
Doses	(1)
-2.6 log ₁₀	
-3.2 log ₁₀	
-3.8 log ₁₀	
-4.4 log ₁₀	
-5.0 log ₁₀	
-5.6 log ₁₀	
-6.2 log ₁₀	
-6.8 log ₁₀	

Sample 2	
Preparation	Type 2
Ass. pot.	? log ₁₀ CCID ₅₀ /vial
Reconstitution vol.	1 vial / 500 µl
Inoculation vol.	100 µl / well
Doses	(1)
-2.6 log ₁₀	9/10
-3.2 log ₁₀	7/10
-3.8 log ₁₀	4/10
-4.4 log ₁₀	1/10
-5.0 log ₁₀	0/10
-5.6 log ₁₀	0/10
-6.2 log ₁₀	0/10
-6.8 log ₁₀	0/10

Model: Determination ED50
Design: Completely randomised
Transformation: $y' = \log(y)$
Theoretical variance: 1

Common slope(factor) = 0.723824 (fixed, $p = 0.134$)
Correlation | r |: 0.996458 (Weighted)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	Chi-square	Probability
Regression	1	32.5707	32.5707	32.5707	0.000 (***)
Non-linearity	6	0.231952	0.0386586	0.231952	1.000
Quadratic curvature	1	0.000567134	0.000567134	0.000567134	0.981
Lack of quadratic fit	5	0.231384	0.0462769	0.231384	0.999
Treatments	7	32.8026	4.68609	32.8026	0.000 (***)
Theoretical variance			1.00000		
Total	7	32.8026	4.68609		

Sample 2			
Preparation	Type 2		
(log ₁₀ CCID ₅₀ /vial)	Lower limit	Estimate	Upper limit
log ₁₀ ED ₅₀ /vial	3.78864	4.18519	4.58174
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	-0.396549	0.00000	+0.396549



ANEXO B – Curva de regressão para o título do vírus DENV-2 0337

omistat5 Version 5.0. Friday, 10 August 2018, 10:23:48 [-03:00]. Page 1 of 1



Substance	Dengue vaccine
Component	All types

Remarks: In cases where no slope can be calculated, it is possible to specify a fixed slope to force a result.
To mimic Spearman/Kaerber calculations specify a rectangular transformation with fixed slope equal to $1/\ln(\text{dilution factor})$.
This should only be done in cases where less than 2 non-extreme responses are observed as shown in this example.
The confidence limits are a good approximation to the Irwin/Cheeseman limits.

Sample 1	
Preparation	Type 1
Ass. pot.	? log ₁₀ CCID ₅₀ /vial
Reconstitution vol.	1 vial / 500 µl
Inoculation vol.	100 µl / well
Doses	(1)
-2.6 log ₁₀	
-3.2 log ₁₀	
-3.8 log ₁₀	
-4.4 log ₁₀	
-5.0 log ₁₀	
-5.6 log ₁₀	
-6.2 log ₁₀	
-6.8 log ₁₀	

Sample 2	
Preparation	Type 2
Ass. pot.	? log ₁₀ CCID ₅₀ /vial
Reconstitution vol.	1 vial / 500 µl
Inoculation vol.	100 µl / well
Doses	(1)
-2.6 log ₁₀	4/10
-3.2 log ₁₀	2/10
-3.8 log ₁₀	1/10
-4.4 log ₁₀	0/10
-5.0 log ₁₀	0/10
-5.6 log ₁₀	0/10
-6.2 log ₁₀	0/10
-6.8 log ₁₀	0/10

Model: Determination ED50
Design: Completely randomised
Transformation: $y' = \logit(y)$
Theoretical variance: 1

Common slope(factor) = 0.723824 (fixed, $p = 0.651$)
Correlation | r | : 0.980096 (Weighted)

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	Chi-square	Probability
Regression	1	9.01997	9.01997	9.01997	0.003 (**)
Non-linearity	6	0.370088	0.0616814	0.370088	0.999
Quadratic curvature	1	0.0884738	0.0884738	0.0884738	0.766
Lack of quadratic fit	5	0.281615	0.0563229	0.281615	0.998
Treatments	7	9.39006	1.34144	9.39006	0.226
Theoretical variance			1.00000		
Total	7	9.39006	1.34144		

Sample 2			
Preparation	Type 2		
(log ₁₀ CCID ₅₀ /vial)	Lower limit	Estimate	Upper limit
log ₁₀ ED ₅₀ /vial	2.49868	3.02010	3.54151
Rel. to Ass.	?	?	?
Rel. to Est.	-0.521415	0.00000	+0.521415

