

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

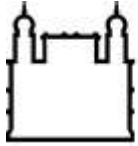
Desenvolvimento de vacinas de DNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína do envelope viral

Adriana de Souza Azevedo

Rio de Janeiro

2011

i



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Desenvolvimento de vacinas de DNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína do envelope viral

Adriana de Souza Azevedo

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Ada Maria de Barcelos Alves

Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2011

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Tese intitulada: **Desenvolvimento de vacinas de DNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína do envelope viral**

Adriana de Souza Azevedo

Aprovada em: 06/06/2011

Banca examinadora:

Dr. Ricardo Galler (Instituto de Tecnologia em imunobiológicos - FIOCRUZ/RJ) -
Presidente (**Revisor**)

Dra. Patrícia Bozza (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ)

Dr. Amilcar Tanuri (Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ/RJ)

Suplentes:

Dra. Myrna Cristina Bonaldo (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ)

Dra. Rafaela Vieira Bruno (Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ)

Rio de Janeiro

2011

iii

Dedico este trabalho a Deus. Amigo
presente em todos os momentos!

Fly high.

Rise above adversity.

Fly high, but take others with you.

Autor desconhecido

Compra a verdade, e não a vendas; e também a sabedoria, a instrução e o entendimento. Pv 23:23

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por realizar o meu grande sonho de fazer a minha pós-graduação *stricto sensu* nesta Instituição tão renomada que é a Fundação Oswaldo Cruz.

Agradeço a Dra. Ada Alves por ter acreditado em meu trabalho e investido em mim, confiando este projeto que foi um verdadeiro desafio e ao mesmo tempo um presente; o meu coração é agradecido por todo conhecimento discutido e aprendido ao longo desses anos. A única coisa chatinha é que as moléculas não se enganam (...), mas aprendi que com determinação conseguimos convencê-las a ficar do nosso lado.

Agradeço a Dra. Simone Morais (Si ou Siri) que sempre esteve comigo dando a maior força, incentivando e acreditando no sucesso deste trabalho, sem contar a sua participação naqueles experimentos gigantescos, obrigada!

Agradeço o Dr. Marciano que é simplesmente um incentivador em pessoa. Bom! Discutimos bastante, mas eu sou a irmãzinha mais nova!

Agradeço ao mestre Antônio (Tônico) que tem a arte de trabalhar com os animais e esteve colaborando nestes anos na realização dos experimentos com os animais, ajudando a contar “bilhões” de células para a realização dos ensaios de ELISPOT e de citometria.

Agradeço a Monete, a garota “mini prep”, nossa ex-aluna de iniciação científica e que ajudou por demais na busca de clones positivos das construções derivadas de DENV2.

Agradeço o Dr. Marcos Freire do LATEV pela colaboração, participação nos ensaios de desafio intracerebral e pela liberação dos vírus utilizados no presente trabalho.

Agradeço a Anna Yamamura e a Emily do LATEV por ensinar-me a técnica de PRNT.

Agradeço a Márcia Archer do LATEV pela ajuda na realização dos ensaios de ELISPOT e de titulação viral.

Agradeço a Fernanda, aluna de iniciação científica pelo “braço estendido” ajudando-me a organizar os experimentos.

Agradeço a Emanuely (Manu) pela ajuda nas clonagens das construções derivadas do DENV-3 e 4, pega pra nós? Obrigada!

Agradeço a Dra. Ana Cristina (Tininha) do INCQS pelas dicas, ensinamentos e pela grande participação nos experimentos de citometria.

Agradeço a Anninha Yorio pelas palavras abençoadas de incentivo, você é muito especial!

Agradeço os “meninos” brincalhões do nosso LABIFIV, Edson e Thiago pelas risadas e todas as “meninas” do Lab. Tamires, Kyssila, Roberta e Juliana por terem um espírito ajudador.

Agradeço a equipe do LIPMED que divide o espaço do laboratório conosco, este laboratório parece o coração de mãe, sempre cabe mais um!

Agradeço em especial a Rosimar Baptista (Rosi) e o Sérgio Amaro, amigos para toda hora.

Agradeço com saudades a Aline Vianna, lembrando-me da sua participação naqueles experimentos gigantescos e com um senso de humor “by Aline”, menina você faz falta!

Agradeço o Dra. Myrna por abrir as portas de seu laboratório para fazermos os experimentos de marcação metabólica e imunoprecipitação.

Agradeço a minha amiga Gisela que mesmo em meio à turbulência de final de Tese ajudou-me nos experimentos de marcação metabólica e imunoprecipitação, você é muito especial!

Agradeço o Dr. Ricardo Galler pela sua colaboração, discussões e revisão desta Tese. As suas sugestões contribuíram para enriquecer ainda mais este trabalho.

Agradeço as secretárias Aline e Fernanda do Pavilhão Leônidas Deane pela assistência de sempre!

Agradeço os secretários do curso de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Daniela e Vinícios, pela assistência durante o doutorado.

Agradeço a Dona Janete e o Sr. Délcio por cuidarem de nossas vidrarias e também pelo cafezinho gostoso!

Agradeço todos os meus amigos cariocas que conquistei nesta terra maravilhosa. Uai!! Cês são bão demais, sô!!!

Agradeço a minha mãe Elizabete (Bete) e meu pai Aderli que sempre me incentivaram a conquistar meus sonhos! Amo muito vocês!

Agradeço meu irmão Israel, por acreditar e participar ativamente de minhas conquistas.

Agradeço a Dona Riza, o Sr. Clarindo e família pelas orações e por me quererem sempre bem.

Agradeço o Pr. Celso Brasil, a sua esposa Sara e família pelas orações e pela amizade.

Agradeço o Pr. Ezequiel amigo para todas as horas!

Agradeço a Dona Cândida e família por me receber tão bem nesta cidade maravilhosa.

Os últimos serão os primeiros!? Agradeço o meu companheiro de todas as horas, amado e esposo Flávio Soares pela compreensão da ausência, mesmo presente! Obrigada por participar e acreditar nos meus sonhos, amo você! Ah!! Obrigada por conferir as referências e ficar comigo na madrugada imprimindo cópias da Tese.

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Aumento da replicação dependente de Anticorpos (do inglês: <i>Antibody-dependent enhancement</i>)
APC	Célula apresentadora de antígeno
BHK	Célula de rim de hamster neonato (do inglês: <i>Baby hamster kidney</i>)
BSS	Solução salina balanceada
BSS-CMF	Solução BSS livre de cálcio e Magnésio
C-terminal	Carboxi-terminal
CTL	Linfócito T citotóxico
DC-SING	Do inglês: (<i>dendritic cell</i>)- <i>specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbin nonintegrin</i>
DENV	Vírus da dengue
DF	Febre do dengue (do inglês: <i>Dengue Fever</i>)
DHF	Febre Hemorrágica da Dengue (do inglês: <i>Dengue Hemorrhagic Fever</i>)
DMEM	Meio mínimo essencial de Eagle, modificado por Dubelco
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSS	Síndrome do Choque da Dengue (do inglês: <i>Dengue shock syndrome</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISPOT	(do inglês: <i>Enzyme-linked immunosorbent spot</i>)
FA	Febre amarela
GM-CSF	Do inglês: <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HLA	Antígeno leucocitário humano
i.c.	Intracerebral
i.m.	Intramuscular
ICAM-3	Do inglês: <i>intercellular adhesion molecule 3</i>
IFN	Interferon

IL	Interleucina
LAV	Do inglês: live attenuated virus vaccine
LB	Meio de cultura Lúria-Bertani
LD ₅₀	Dose letal para 50% da população em teste (do inglês: <i>Lethal Doses 50%</i>)
M.O.I.	Multiplicidade de infecção
MCP-1	Do inglês: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
Mock	Células não infectadas
NS	Não estrutural
N-terminal	Amino-terminal
NTPase	Atividade 5' trifosfatase
OMS	Organização mundial da saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>)
pcTPA	Vetor construído a partir do plasmídeo comercial pcDNA3 (Invitrogen), contém a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA à montante ao sítio de clonagem
pE1D1	Plasmídeo recombinante que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) de DENV1
pE1D2	Plasmídeo recombinante que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) de DENV2
pE1D3	Plasmídeo recombinante que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) de DENV3
pE1D4	Plasmídeo recombinante que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) de DENV4
pE2D2	Plasmídeo recombinante que contém a sequência do domínio III da proteína E de DENV2
PFU	Unidade Formadora de Placa (do inglês: <i>Plaque forming unit</i>)
PIV	Purified inactivated virus vaccine

RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
RTPase	Atividade RNA trifosfatase 5' terminal
s.c.	Subcutânea
sCD4	Receptor CD4 solúvel
sCD8	Receptor CD8 solúvel
SDS-PAGE	Do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SFC	Células formadoras de <i>spot</i> (do inglês: <i>Spot forming cell</i>)
sIL-2	Receptor IL-2 solúvel
sTNFR	Receptor do fator de necrose tumoral solúvel
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
TBE	Do inglês: <i>tick-borne encephalitis</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
t-PA	Ativador de Plasminogênio de Tecido Humano
UTR	Regiões não traduzidas (do inglês: <i>untranslated regions</i>)
YF17D-D2	Vírus quimérico febre amarela-dengue sorotipo 2

RESUMO

A dengue é uma doença causada pelo vírus da dengue (DENV1-4). Apesar dos vários estudos, ainda não existe uma vacina comercialmente disponível. A proteína do envelope (E) de DENV apresenta-se como o maior componente protéico da superfície viral. Consequentemente, esta proteína é o principal alvo para a indução de uma resposta imune protetora, provavelmente baseada em anticorpos neutralizantes. No presente trabalho, nós avaliamos o potencial protetor de vacinas de DNA baseadas na proteína E de DENV2. Para isto, foram construídos dois plasmídeos, pE1D2 e pE2D2, que contêm as sequências que codificam o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) ou somente o seu domínio III, respectivamente, clonadas da montante à sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA). Os dois plasmídeos mediaram a expressão e secreção das proteínas recombinantes *in vitro* em células eucarióticas, detectadas com anticorpos anti-DENV2 e avaliadas por ensaios de imunofluorescência ou marcação metabólica seguida de imunoprecipitação. Ambas as vacinas de DNA foram capazes de induzir respostas imunes com produção de anticorpos neutralizantes em camundongos Balb/c, com títulos mais elevados nos animais imunizados com o pE1D2. A vacina pE1D2 também se mostrou mais protetora nos testes de desafio com uma dose letal de DENV2, induzindo 100% de sobrevivência nos camundongos imunizados, enquanto que 45% dos animais vacinados com o plasmídeo pE2D2 morreram após a infecção. Além disso, 10% e 65% dos camundongos imunizados com pE1D2 ou pE2D2, respectivamente, apresentaram morbidade frente ao desafio letal. As vacinas pE1D2 e pE2D2 também foram testadas combinadas com o vírus quimérico YF17D-D2, em um sistema de dose e reforço ou em imunizações simultâneas. O vírus quimérico YF17D-D2 foi construído com a substituição dos genes prM e E do vírus vacinal da febre amarela 17DD pelos genes prM e E de DENV2. A vacina de DNA pE1D2 combinada com a quimera YF17D-D2 induziu altos níveis de anticorpos neutralizantes nos animais vacinados com os diferentes esquemas de imunização. Além disso, esses animais apresentaram 100% de sobrevivência frente ao desafio letal com DENV2, com ausência de qualquer sinal clínico da infecção. O efeito sinérgico da imunização combinada também foi evidenciado quando combinamos a vacina pE2D2 e YF17D-D2, que gerou 100% de sobrevivência nos animais desafiados. A resposta imune celular foi avaliada pela produção de IFN- γ por células TCD8+ em ensaios de ELISPOT, evidenciando a ativação destas células nos animais imunizados com as pE1D2 independente da sua combinação com a quimera YF17D-D2. Além disso, a análise do perfil fenotípico das células TCD4+ e TCD8+ mostrou um percentual menor de linfócitos CD62L+ nos animais vacinados com o pE1D2 isolado ou combinado com o vírus quimérico, indicando que a vacina de DNA pode influenciar nos processos de ativação das células T. Posteriormente, foram construídas novas vacinas de DNA que codificam os ectodomínios da proteína E de DENV1, 3 e 4 (pE1D1, pE1D3 e pE1D4), cuja expressão foi confirmada *in vitro*, e que serão testadas futuramente em modelos animais.

ABSTRACT

Dengue is a disease caused by the dengue virus (DENV1-4). Despite several studies, no effective vaccine is yet commercially available. The envelope protein (E) of DENV is the viral surface major protein component, associated with numerous biological activities. Thus, this protein is the main target for the induction of a protective immune response based on neutralizing antibodies. In the present study, we evaluated the potential of DNA vaccines expressing the DENV2 E protein for the induction of protection. Two plasmids were constructed, pE1D2 and pE2D2, which contain sequences encoding the ectodomain of the E protein (domains I, II and III) or only its domain III, respectively, cloned upstream the encoding sequence of the human tissue plasminogen activator signal peptide (t-PA). Both plasmids mediated expression and secretion of the recombinant proteins *in vitro* in eukaryotic cells, detected with anti-DENV2 antibodies and evaluated by immunofluorescence or metabolic labeling assay followed by immunoprecipitation. Both DNA vaccines were elicited neutralizing antibodies in Balb/c mice, with the highest antibody titers detected in animals immunized with the pE1D2. The pE1D2 vaccine was also more protective in challenge tests with a lethal dose of DENV2, inducing 100% survival in immunized mice, while 45% of animals vaccinated with the plasmid pE2D2 died after infection. Furthermore, 10% and 65% of the mice immunized with pE1D2 or pE2D2, respectively, showed morbidity after virus challenge. The vaccines pE1D2 and pE2D2 were also tested in combination with the chimeric YF17D-D2 virus, in a prime and booster system or with simultaneous immunizations. The YF17D-D2 chimeric virus was previously constructed by replacing the prM and E genes of 17DD yellow fever vaccinal virus with those from DENV2. The pE1D2 DNA vaccine combined with the YF17D-D2 chimera induced high levels of neutralizing antibodies in animals vaccinated with any of the different immunization schedules. Moreover, these animals showed 100% survival rates against a lethal challenge with DENV2, with no clinical signs of infection. The synergistic effect of combined immunization was also evident when we used the pE2D2 DNA vaccine and the YF17D-D2 virus, which generated 100% survival in challenged animals. The cellular immune response was evaluated by the production of IFN- γ by CD8⁺ T cells in ELISPOT assays, revealing the activation of these cells in animals immunized with the pE1D2 alone or in combination with the YF17D-D2 chimera. Furthermore, analysis of the phenotypic profile of CD4⁺ and CD8⁺ T cells showed low percentage of CD62L⁺ lymphocytes in animals vaccinated with pE1D2, alone or combined with the chimeric virus, thus indicating that the DNA vaccine can influence the processes of T cell activation. New DNA vaccines encoding the ectodomains of DENV1, 3 and 4 of the envelope protein (pE1D1, pE1D3 and pE1D4) were constructed and the expression of recombinant proteins was confirmed *in vitro*. These DNA vaccines will be further tested animal models.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribuição geográfica da Dengue.	2
Figura 1.2	Distribuição do <i>Ae. aegypti</i> nas Américas em 1930, 1970 e 2002.	4
Figura 1.3	Estrutura da partícula de DENV.	7
Figura 1.4	Esquemas de organização do genoma infeccioso do DENV (a) e da poliproteína precursora expressa nas membranas do RE (b).	8
Figura 1.5	Representação esquemática dos resíduos de aminoácidos que compõem o ectodomínio (formado pelos domínios I, II e III) e a região de haste (azul claro) e âncora/transmembrana (azul achurado) localizada na porção C-terminal da proteína E de DENV (a).	12
Figura 1.6	Ciclo de vida do DENV.	16
Figura 1.7	Representação esquemática do mecanismo de ADE.	21
Figura 1.8	Célula transfectada por vacina de DNA.	29
Figura 3.1	Esquemas de imunizações e desafios.	44
Figura 4.1	Representação esquemática dos plasmídeos recombinantes pE1D2 (a) e pE2D2 (b).	51
Figura 4.2	Gel de agarose 1% com os plasmídeos recombinantes digeridos com enzimas de restrições específicas.	52
Figura 4.3	Gel de agarose 1% com os plasmídeos recombinantes digeridos com enzimas de restrições <i>EcoRV</i> e <i>XbaI</i> .	52
Figura 4.4	A análise da expressão <i>in vitro</i> de proteínas recombinantes.	53
Figura 4.5	SDS-PAGE com as proteínas recombinantes secretadas por células BHK transfectadas com os plasmídeos pE1D2, pE2D2 ou pcTPA	54
Figura 4.6	SDS-PAGE de proteínas recombinantes e virais marcadas metabolicamente com metionina [³⁵ S] e imunoprecipitadas com fluido ascítico anti-DENV2	56
Figura 4.7	Porcentagem de sobrevivência dos camundongos Balb/c imunizados com pE1D2 e pE2D2 e desafiados com DENV2.	57
Figura 4.8	Avaliação do percentual (a) e grau (b) de morbidade em camundongos vacinados com pE1D2, pE2D2 e controles.	58

Figura 4.9	Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV2 por ensaios de redução de placas (PRNT _{50%}).	60
Figura 4.10	Avaliação da proteção induzida pelas vacinas pE1D2 e YF 17D-D2 combinadas em um sistema de dose/reforço em camundongos Balb/c frente ao desafio letal com DENV2.	62
Figura 4.11	Avaliação da proteção quanto à porcentagem de sobrevivência (a) e graus de morbidade (b) em grupos de animais vacinados com o esquema de imunização combinada e simultânea (Mix).	64
Figura 4.12	Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV2 presente nos soros de animais imunizados com as vacinas pE1D2 e YF17D-D2 combinadas em um sistema de dose/reforço.	66
Figura 4.13	Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV2 presente nos soros de animais imunizados simultaneamente (Mix) com as vacinas pE1D2 e YF17D-D2.	67
Figura 4.14	Produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos vacinados utilizando o peptídeo SPCKIPFEI (epítipo presente na proteína E de DENV2) como antígeno estimulante (a) ou concanavalina A (ConA) como controle positivo (b).	69
Figura 4.15	Porcentagem de células TCD4+/CD62L+ e TCD8+/CD62L+ presente no baço dos animais vacinados.	71
Figura 4.16	Avaliação da proteção quanto à porcentagem de sobrevivência (a) e grau de morbidade (b) nos animais imunizados com a vacina pE2D2 combinada com vírus quimérico YF17D-D2.	72
Figura 4.17	Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV2 presente nos soros de animais imunizados com as vacinas pE2D2 combinada com a vacina YF 17D-D2.	73
Figura 4.18	Gel de agarose 1% com os 4 plasmídios recombinantes digeridos com enzimas de restrições específicas.	77
Figura 4.19	Detecção das proteínas recombinantes em de células BHK-21 transfectadas com os plasmídeos pE1D1 (a), pE1D3 (b) e pE1D4 (c).	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Classificação da FHD em 4 graus de severidade	18
Tabela 3.1	Oligonucleotídeos usados para a clonagem (1-3) ou sequenciamento dos fragmentos clonados (4-5)	39
Tabela 3.2	Esquema de imunização e desafio letal com DENV2.	44
Tabela 3.3	Esquema de imunização e desafio letal com DENV2.	45
Tabela 3.4	Esquema de imunização e desafio letal com DENV2.	46
Tabela 4.1	Resumo de dados obtidos com os diversos esquemas de imunização realizados neste trabalho.	75

ÍNDICE

Capítulo 1.	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE	3
1.1.1. <i>No mundo</i>	3
1.1.2. <i>No Brasil</i>	5
1.2. VÍRUS DA DENGUE	6
1.3. PROTEÍNAS FLAVIVIRAIS	9
1.3.1. Proteínas Estruturais.....	9
1.3.1.1. A proteína E	10
1.3.2. <i>Proteínas Não Estruturais</i>	12
1.4. CICLO DE VIDA.....	14
1.5. A DENGUE.....	16
1.6. RESPOSTA IMUNE	18
1.7. VACINAS CONTRA A DENGUE IMUNE	23
1.8. VACINAS DE DNA CONTRA DENGUE.....	28
1.8.1. <i>Vacinas de DNA</i>	28
1.8.2. <i>Vacinas de DNA & dengue</i>	31
Capítulo 2.	34
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.1.1. <i>Objetivos específicos</i>	35
Capítulo 3.	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. SOROTIPOS VIRAIS E LINHAGENS CELULARES	37
3.2. VETOR PLASMIDIAL	37
3.2.1. <i>Construção dos plasmídeos recombinantes</i>	38
3.2.2. <i>Extração do DNA plasmidial</i>	39
3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO IN VITRO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS	40
3.3.1. <i>Transfecção</i>	40

3.3.2. Infecção.....	41
3.3.3. Imunofluorescência	41
3.3.4. Marcação Metabólica e Imunoprecipitação.....	42
3.4. IMUNIZAÇÕES DE CAMUNDONGOS	43
3.4.1. Imunização simples (DNA/DNA)	43
3.4.2. Imunização combinada: DNA plasmidial + Quimera	44
3.4.2.1. Sistema de dose/reforço (DNA/DNA/Quimera)	44
3.4.2.2. Imunização simultânea (Mix: DNA + Quimera)	45
3.5. DESAFIOS COM DENV2.....	46
3.6. ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE.....	46
3.6.1. Análise dos níveis de anticorpos neutralizantes por ensaios de redução de placas (PRNT _{50%})	46
3.6.2. Análise da resposta celular.....	47
3.6.2.1. Quantificação de células produtoras de IFN- γ através de ensaios de ELISPOT.....	47
3.6.2.2. Citometria de Fluxo	48
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
Capítulo 4.	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES QUE CODIFICAM SEQUÊNCIAS INCOMPLETAS DA PROTEÍNA E DE DENV.....	51
4.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	53
4.2.1. Imunofluorescência.....	53
4.2.2. Imunoprecipitação de proteínas recombinantes	54
4.3. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA PELAS VACINAS DE DNA (IMUNIZAÇÃO SIMPLES: DNA/DNA) PE1D2 OU PE2D2 EM CAMUNDONGOS BALB/C	56
4.3.1. Avaliação da presença de anticorpos neutralizantes no soro de animais imunizados com as vacinas de DNA antes e após o desafio com DENV2	59

4.4. EFICÁCIA PROTETORA DA VACINA DE DNA PE1D2 EM TESTES DE IMUNIZAÇÕES COMBINADAS COM O VÍRUS QUIMÉRICO YF17D-D2	60
4.4.1. Avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes presente no soro de camundongos vacinados com diferentes protocolos de imunização combinada utilizando as vacinas PE1D2 e YF17D-D2	65
4.4.2. Avaliação da resposta imune celular quanto à produção de IFN- γ induzida nos camundongos vacinados com os diferentes esquemas de imunização	68
4.4.3. Avaliação da expressão do receptor CD62L na superfície de TCD4+ e TCD8+ derivadas do baço de animais vacinados	70
4.5. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA PELA VACINA DE DNA PE2D2 EM TESTES DE IMUNIZAÇÕES COMBINADAS COM O VÍRUS QUIMÉRICO YF17D-D2	71
4.5.1. Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes presente no soro de camundongos imunizados com a vacina PE2D2 combinada com o vírus quimérico YF17D-D2	73
4.6. COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM OS DIVERSOS PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO	74
4.7. CONSTRUÇÃO DE NOVOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES COM A CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS QUE CODIFICAM O ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA E DE DENV1, 3 e 4.	76
4.7.1. Análise da expressão das proteínas recombinantes mediada pelos plasmídeos pE1D1, pE1D3 e pE1D4.....	76
Capítulo 5.	78
5. DISCUSSÃO	79
5.1. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA PELAS VACINAS DE DNA	80
5.2. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA PELAS VACINAS DE DNA COMBINADAS COM O VÍRUS QUIMÉRICO YF17D-D2	85
5.3. VACINAS DE DNA TETRAVALENTES	91
Capítulo 6	92
6. CONCLUSÕES	93
Capítulo 7	95
7. PERSPECTIVAS	96

Capítulo 8	97
8. REFERÊNCIAS	98
Capítulo 9	118
9. ANEXOS	119
9.1.MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	119
9.2. ARTIGO CIENTÍFICO	123
9.3. DEPÓSITO DE PATENTE	132

Capítulo 1.

1. INTRODUÇÃO

A dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial entre as doenças causadas por arbovírus e acomete, principalmente, indivíduos que vivem nas regiões tropicais e subtropicais. Cerca de dois quintos da população mundial, o que equivale a aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas, reside em áreas endêmicas da dengue (Fig. 1.1) (Gibbons & Vaughn, 2002; Murrell *et al.*, 2011).



Figura 1.1: Distribuição geográfica da Dengue. Áreas de risco de transmissão em amarelo. (Adaptado de WHO, 2010).

O agente etiológico da dengue é o vírus da dengue (DENV), membro da família *Flaviviridae*. Esta família engloba arbovírus de grande importância médica, tais como, o vírus da febre amarela (FA) e os vírus causadores das encefalites: japonesa; St. Louis; oeste do Nilo; TBE (TBE, do inglês: tick-borne encephalitis); entre outros. O DENV compreende quatro sorotipos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 que são geneticamente relacionados, porém, antígenicamente distintos (Momdini *et al.*, 2009; Witehead *et al.*, 2007; Murrell *et al.*, 2011. Tais sorotipos são mantidos no meio ambiente através de ciclos silvestres e endêmicos. O silvestre ocorre na natureza entre primatas não-humanos e mosquitos silvestres, enquanto que o ciclo endêmico do DENV foi estabelecido em ambientes urbanos, envolvendo o homem e mosquitos adaptados ao ambiente peridomiciliar (Teoh *et al.*, 2010). Os mosquitos (fêmeas infectadas) do gênero *Aedes* são os responsáveis pela transmissão do DENV, principalmente o *Aedes aegypti* uma espécie sinantrópica

adaptada ao habitat humano (Gibbons & Vaughn, 2002; Gubler, 2002; Guzman *et al.*, 2010).

Indivíduos infectados com um dos quatro sorotipos de DENV podem permanecer assintomáticos ou apresentar um amplo espectro de quadros clínicos. Estes incluem as formas brandas, como a febre da dengue (FD); as formas graves da doença, como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD), que podem ser fatais (Edelman, 2007; Stephenson, 2005). Nos últimos 60 anos a incidência, distribuição e severidade clínica da dengue aumentaram drasticamente (Rigau-Pérez *et al.*, 1998; WHO, 2009). O porquê dessa situação ainda não está completamente compreendido. Entretanto, existem alguns fatores que são relevantes, como aqueles relacionados ao DENV (quatro sorotipos, virulência das cepas, razão de replicação e infecções sequenciais); ao hospedeiro (raça, idade, e sistema imune); e ao vetor (razão de reprodução e adaptação ao ambiente) (Teixeira *et al.*, 2009).

Apesar dos esforços da comunidade científica desde meados do século passado na busca de métodos de controle da infecção/doença, estes ainda não foram alcançados, devido à grande complexidade que envolve a dengue. Atualmente, não existem drogas e vacinas, profiláticas ou terapêuticas, licenciadas contra a dengue (Julander *et al.*, 2011). Diante disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) elegeu o desenvolvimento de vacinas contra o vírus da dengue como prioridade mundial (Kinney & Huang, 2001). Nesse sentido, vários grupos de pesquisa e organizações estão trabalhando com diversas abordagens para o desenvolvimento de vacinas protetoras contra dengue.

1.1. EPIDEMIOLOGIA DA DENGUE

1.1.1. No mundo

Os primeiros relatos de grandes epidemias de doenças com características de dengue ocorreram na África, Ásia e América do norte, no século 18. Entretanto, há antigos registros chineses (265-420 dC) detalhando sintomas parecidos com a dengue (Gubler, 1998). Por outro lado, antes do desenvolvimento de técnicas que possibilitaram a confirmação de casos de dengue, como o isolamento viral, esses relatos apenas sugeriram a ampla circulação de DENV naquela época, pois existem

outros arbovírus, como o vírus chikungunya, que infectam humanos e causam sintomas parecidos à Dengue (Barreto & Teixeira, 2008).

Atualmente, aproximadamente 100 países no mundo são considerados regiões endêmicas, onde os sorotipos do DENV circulam naturalmente (Fig. 1.1) (Murrell *et al.*, 2011).

Antes da segunda guerra mundial a dengue era considerada uma doença benigna. No entanto, casos de FHD surgiram pela primeira vez em 1950, durante as epidemias registradas nas Filipinas e Tailândia, sendo que a dispersão de vários sorotipos durante a guerra pode ter contribuído para o agravamento desses casos (Barreto & Teixeira, 2008; Ross, 2010). Em 1975 o número de internações e mortes de crianças com casos graves de dengue aumentou no sudeste da Ásia, ocorrendo também à expansão desses casos para outros países em outros continentes (Ross, 2010).

Nas Américas as epidemias de dengue foram raras entre os anos de 1950-1970, devido ao programa de erradicação do vetor *Aedes* nas Américas do Sul e Central (Gubler, 1998). Entretanto, desde a paralisação deste programa, as Américas vêm sofrendo com constantes epidemias ao longo dos anos (Fig. 1.2) (Guzman, 2010).

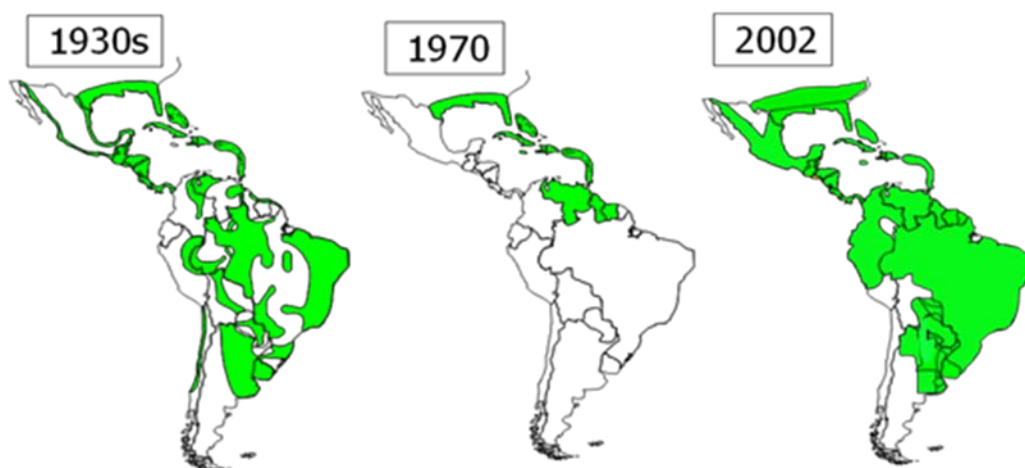


Figura 1.2: Distribuição do *Ae. aegypti* nas Américas em 1930, 1970 e 2002 (em verde). (Adaptado de Arias JR, (2002) - www.ops-oms.org/english/ad/dpc/densit/ppt, acessado em 25/03/2011).

1.1.2. No Brasil

No século 19, foram descritas epidemias de dengue ocorridas na cidade do Rio de Janeiro (RJ) nos anos de 1846-48 e em 1886 no município de Valença (RJ). Naquela época, a doença recebeu vários nomes populares, tais como: febre valenciana e polka (revisado por Schatzmayr & Cabral, 2009). No início do século 20, em 1922, foram registrados surtos de dengue na cidade de Niterói (RJ) (Passos *et al.*, 2008).

As campanhas de erradicação do vetor *Ae. aegypti* das Américas (1950-1960), coordenado pela Organização Pan-Americana da Saúde, a princípio realizadas para a eliminação da FA urbana, também resultaram na eliminação da dengue, uma vez que ambas arboviroses podem ser transmitidas pelo mesmo vetor. Entretanto, esse programa foi descontinuado levando a dispersão geográfica do mosquito em 1970 (Fig. 1.2) (Schatzmayr & Cabral, 2009).

O DENV1, que causou grandes epidemias nas Américas na década de 70, foi re-introduzido no Brasil em 1981-82 em Boa Vista (RR), juntamente com o DENV4. Contudo, a epidemia foi limitada. Por outro lado, em 1986, 1990 e 2002 os DENV1, DENV2 e DENV3, respectivamente, foram introduzidos no estado do Rio de Janeiro, sendo responsáveis por grandes epidemias que se espalharam para outros estados do Brasil (Nogueira *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2009). Desde então, os três sorotipos circulam em território nacional e foram responsáveis por mais de 4 milhões de casos de dengue registrados em 20 anos (Nogueira *et al.*, 2007).

Mais recentemente, o DENV4 foi detectado em algumas cidades do Brasil (de Melo *et al.*, 2009). Infelizmente, a re-introdução do DENV4 era esperada pela vigilância epidemiológica brasileira, pois países fronteiriços como a Venezuela e a Colômbia possuem grande circulação de DENV-4 (Figueiredo *et al.*, 2008).

Neste verão vivenciamos uma epidemia de dengue causada principalmente por DENV1, sendo detectado em várias regiões do Brasil. Além da dengue do tipo 1, novos casos de DENV4 foram registrados no Norte e Nordeste do país e tudo indica que esse sorotipo vem se dispersando através do território nacional, uma vez que casos autóctones ocorreram no sudeste, mais especificamente na cidade de Niterói (RJ) durante o mês de março de 2011 (Ministério da Saúde, 2011).

A circulação e co-circulação dos vários sorotipos de DENV ao longo desses anos contribuíram para a mudança do cenário atual da dengue no Brasil. Antes de 2007, a maioria dos casos graves da dengue (FHD/SCD) ocorria entre adultos com idades entre 20-40 anos de idade. Em 2007 ocorreu um aumento do número de casos FHD, quando comparado aos anos anteriores, com uma maior incidência em faixas etárias menores (<15 anos de idade). A mudança foi evidente na região Nordeste, onde as crianças foram responsáveis por 65% dos casos registrados de FHD (Rodriguez-Barraquer *et al.*, 2011). Tal fato pode estar relacionado com o acúmulo de imunidade contra os sorotipos circulantes nos indivíduos mais velhos, dirigindo a idade média de infecção primária e secundária para os grupos mais jovens. Esse fenômeno foi observado, por exemplo, em países asiáticos, onde a co-circulação dos quatro sorotipos e as infecções sequenciais, ocorridas ao longo de muitos anos, conferem proteção a população adulta sobrevivente. Sendo assim, nesses países, a dengue se tornou uma doença que acomete principalmente crianças não imunes ao sorotipo infectante (Gubler, 1998; Rodriguez-Barraquer *et al.*, 2011; Barreto & Teixeira, 2008).

1.2. VÍRUS DA DENGUE

Os DENV1-4 pertencem ao gênero *Flavivirus*, que inclui um grande número de agentes causadores de doenças em humanos, compreendendo aproximadamente 70 membros, cuja maioria é transmitida por artrópodos. (Chambers *et al.*, 1990; Bielefeldt-Ohmann, 1997).

A estrutura da partícula viral do DENV é relativamente simples, semelhante aos outros flavivírus. Os vírions são esféricos, pequenos, apresentam um diâmetro de aproximadamente 50nm, e são envelopados (Fig. 1.3). O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica, derivada do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, na qual 180 cópias das proteínas do envelope (E) e de membrana (prM/M) estão ancoradas (Perera & Kuhn 2008; revisado por Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Internamente, há um nucleocapsídeo com formato icosaédrico composto pela proteína estrutural do capsídeo ou core (C), complexada a uma molécula de RNA viral (Fig. 1.3) (Kinney & Huang, 2001; Kuhn *et al.*, 2002; Whitehead *et al.*, 2007; Murrel *et al.*, 2011).

O genoma do DENV compreende aproximadamente 10.700 nucleotídeos e se apresenta como uma fita simples de RNA com polaridade positiva. O RNA viral apresenta-se modificado em sua extremidade 5' UTR (do inglês: untranslated regions), através da adição de uma estrutura *cap* ($m^7G5'ppp5'A$). Entretanto, este RNA não contém uma cauda poliadenilada na extremidade 3' UTR. Ambas as regiões 5' e 3' UTRs do genoma exercem funções importantes na regulação da síntese e tradução do RNA viral (Fig. 1.4a) (Whitehead *et al.*, 2007). Além disso, existe apenas um quadro aberto de leitura no genoma do DENV. Sendo assim, a tradução do RNA viral produz uma poliproteína precursora das dez proteínas flavivirais. Esta proteína precursora possui uma sequência sinal que a direciona para a expressão no RE das células hospedeiras (Fig. 1.4a,b). A poliproteína é clivada em vários sítios por proteases celulares e pela protease viral, concomitante ao processo de tradução durante a translocação da proteína para o RE da célula hospedeira, no entanto, alguns sítios são clivados após a tradução (Fig. 1.4b) (Assenberg *et al.*, 2009).

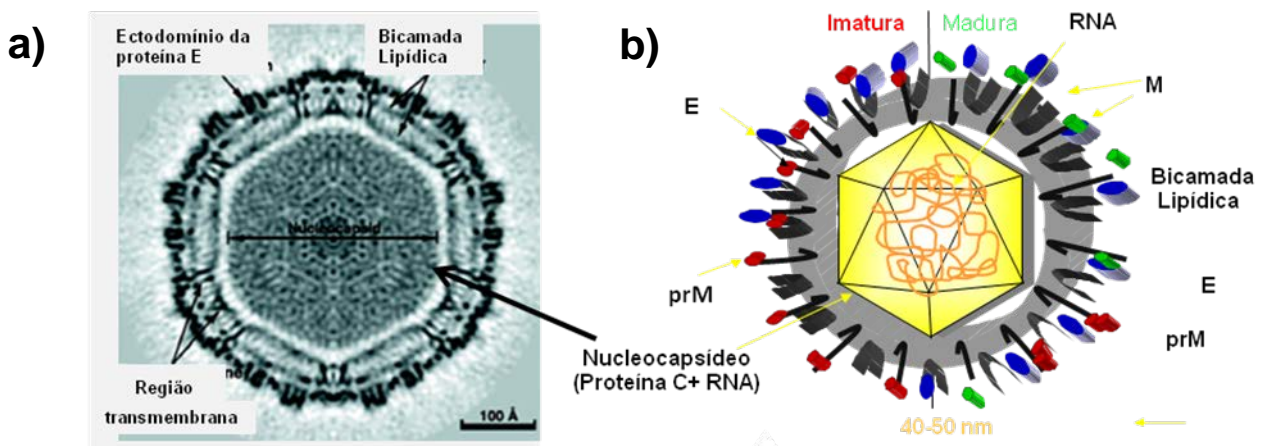


Figura 1.3: Estrutura da partícula de DENV. Imagem do vírus da dengue obtida através da técnica de microscopia crioeletrônica (a). Representação esquemática da partícula dos flavivírus imatura e madura (b). (Adaptada de: Heinz & Allison, 2001 & Zhang *et al.*, 2003).

O processamento da poliproteína gera três proteínas estruturais, C, pre-membrana (prM precursora da M) e E; e sete proteínas não estruturais (NS), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Fig. 1.4b) (Lindenbach & Rice, 2001; Whitehead *et al.*, 2007; Melino & Paci, 2007; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009; Murrell

et al., 2011). Enquanto as proteínas estruturais dispõem a arquitetura da partícula viral, as proteínas NS estão envolvidas nos processos de replicação e montagem dos novos vírions (Kinney & Huang, 2001; Chambers *et al.*, 1990).

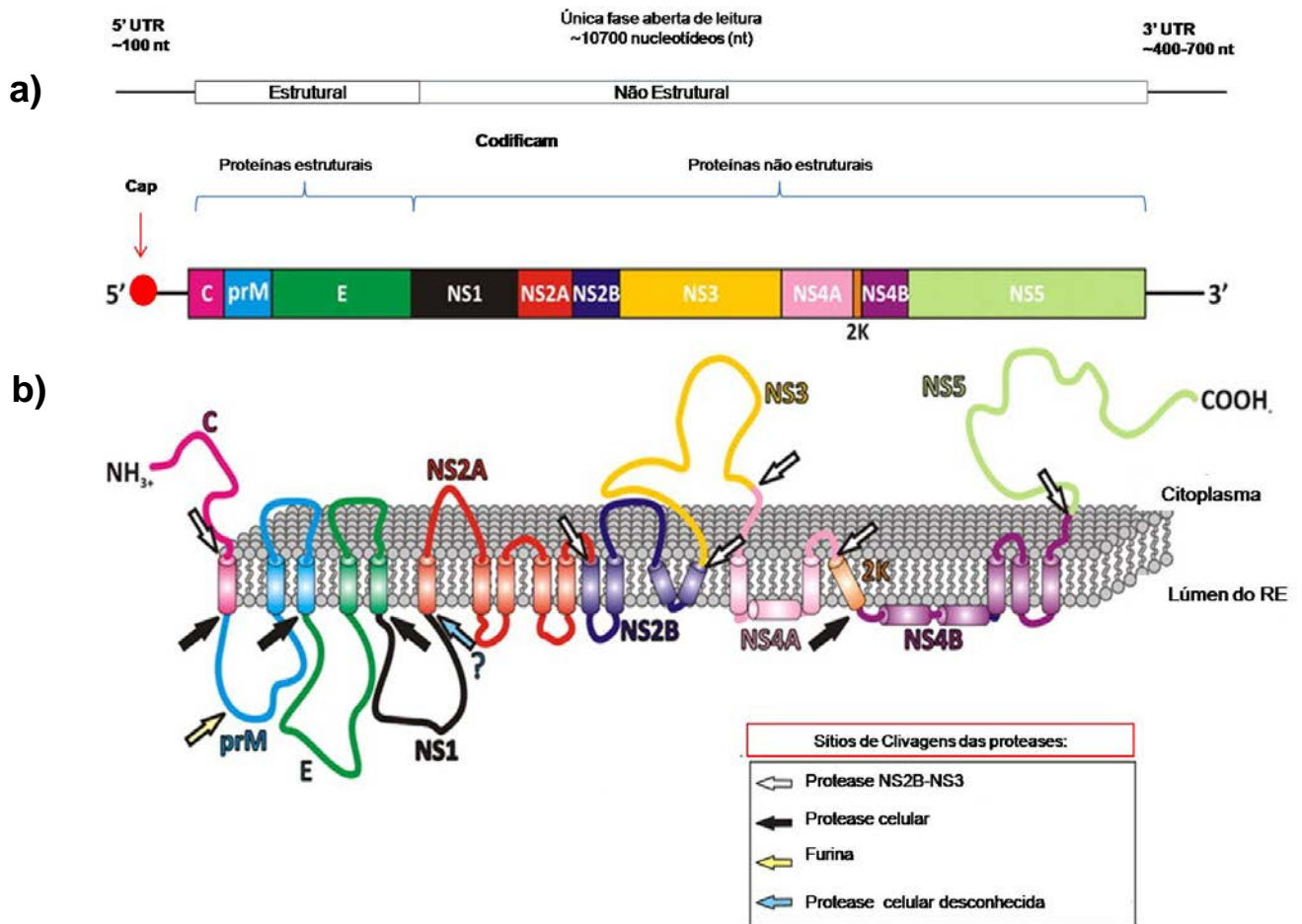


Figura 1.4: Esquemas de organização do genoma infeccioso do DENV (a) e da poliproteína precursora expressa nas membranas do RE (b). O genoma é constituído por um RNA fita simples com polaridade positiva e apresenta em sua extremidade 5' UTR uma estrutura denominada *cap* (a). A extremidade 3' UTR não contém uma cauda poliadenilada (a). O genoma do DENV possui apenas uma única fase aberta de leitura e sua tradução é direcionada para o RE gerando uma poliproteína precursora (b). Ao longo da sequência da poliproteína existem sítios de clivagens onde proteases, celular e viral, atuam gerando assim 3 proteínas estruturais (C, prM/M e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). (Adaptada de Assenberg *et al.*, 2009).

Os quatro sorotipos de DENV são geneticamente relacionados, compartilhando aproximadamente 65% da sequência de nucleotídeos que compõem seus genomas. O grau de parentesco genético encontrado nesses sorotipos é similar ao encontrado entre diferentes Flavivírus, como por exemplo, entre o vírus do oeste do Nilo e o vírus da encefalite japonesa (Guzman *et al.*, 2010; Murrel *et al.*, 2010). Portanto, esse dado reforça a individualidade de cada sorotipo. Além disso, os DENV1-4 são antígenicamente distintos, principalmente devido às diferenças 25-40% encontradas nas sequências de aminoácidos (aa), presentes na proteína E dos diferentes sorotipos virais. Adicionalmente, foram encontradas alterações na proteína E de genótipos que compõem o mesmo sorotipo de DENV, tanto na sequência nucleotídica quanto na sequência de aminoácidos, com aproximadamente 6% e 3%, respectivamente (Shrestha *et al.*, 2010).

Apesar da diferença existente entre os DENV1-4, os sorotipos circulam em um mesmo nicho ecológico e são capazes de causar quadros clínicos idênticos da dengue no homem (Guzman *et al.*, 2010).

1.3. PROTEÍNAS FLAVIVIRAIS

1.3.1. Proteínas Estruturais

A proteína do capsídeo (C), possui um peso molecular (PM) de aproximadamente 11 KDa. Esta proteína é extremamente básica e se complexa com o RNA viral para formar o nucleocapsídeo. Além de ser um componente estrutural, a proteína C participa da montagem da partícula viral (Chambers *et al.*, 1990; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi observado que células infectadas com DENV apresentam proteínas C localizadas ao redor de gotículas lipídicas (do inglês: lipid droplet) derivadas do RE, e foi demonstrado que tal localização é crucial para a formação de partículas virais (Samsa *et al.*, 2009)

A proteína M é pequena (7-9 KDa) e está presente no envelope lipídico do DENV maduro (Fig. 1.3b). Primariamente, ela é sintetizada na forma de sua precursora, uma proteína glicosilada denominada prM (pré-membrana). A prM tem um PM de aproximadamente 19-26 kDa e um sítio de glicosilação que está localizado no peptídeo "pr". O processamento da prM está ligado à maturação dos vírions e ocorre em ambientes ácidos, durante o seu transporte através do complexo

de golgi (Chang, 1997; kinney & huang, 2001; Lindenbach & Rice, 2001; Whitehead *et al.*, 2007; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Aparentemente, a prM participa do processo de maturação e biosíntese da proteína E. Essas proteínas são co-transportadas através da via exocítica, sob a forma de heterodímeros prM-E. Estudos sugerem que a prM atua como uma chaperonina, cuja função é evitar erros de dobramentos na proteína E, durante o processo de maturação viral (Chang, 1997; Stiasny & Heinz, 2006; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

1.3.1.1. A proteína E

A proteína E destaca-se por ser o maior componente glicoprotéico presente na superfície do DENV, associada a numerosas atividades biológicas importantes. Ela atua como proteína ligante, interagindo com receptores presentes na superfície de células alvo e mediando a endocitose da partícula viral. Tal proteína é responsável pela fusão da bicamada lipídica do vírus à membrana citoplasmática da vesícula endossômica e participa da dissociação do nucleocapsídeo no citoplasma (Chang, 1997; Lindenbach & Rice, 2001).

A proteína E é constituída por aproximadamente 494-501 aa, com PM em torno de 55-60 kDa. Uma pequena variação no tamanho e PM é encontrada entre os DENV1-4 (Fig. 1.5a). Por outro lado, existem dois sítios de glicosilação N-ligados na proteína E nas posições ASN-67 e ASN-153 que são conservados entre os quatro sorotipos do DENV. O sítio de glicosilação na posição ASN-153 é conservado em muitos Flavivirus, enquanto que o ASN-67 parece ser exclusivo da proteína E de DENV (Chang, 1997; Mondotte *et al.*, 2007).

A glicoproteína E é formada por um dímero alongado que se estende paralelamente à bicamada lipídica que compõe a partícula viral (Fig. 1.5c). Cada monômero é formado pela composição de três domínios: I, II e III (Fig. 5b). Estes foram distinguidos, por cristalografia de raios-X e estão arranjados na estrutura terciária da proteína (Lee *et al.*, 1997; Modis *et al.*, 2003; Modis *et al.*, 2005). Previamente a esses estudos, foram identificados em outro Flavivirus (TBE) domínios antigênicos presentes na proteína E, denominados A, B e C, que correspondem aos domínios II, III e I, respectivamente (Roehrig *et al.*, 1998). Além dos três domínios que juntos formam um ectodomínio, existem as regiões de haste e de âncora (domínio transmembrana), com aproximadamente 100 resíduos de aa

localizados na porção C-terminal da proteína E (Fig. 1.5a,d) (Allison *et al.*, 1999; Purdy & Chang, 2005). Tais regiões são altamente hidrofóbicas e compreendem aproximadamente 20% da proteína E.

O domínio I localiza-se centralmente na molécula protéica e contém, aproximadamente 120 resíduos de aa. Nesse domínio, há vários sítios antigênicos que induzem uma resposta imune predominantemente de anticorpos não-neutralizantes tipo-específico (Lee *et al.*, 1997). Entretanto, alguns estudos demonstraram que anticorpos gerados contra esse domínio também podem ter atividade neutralizante (Fig. 1.5) (Roehrig *et al.*, 1998).

O domínio II tem forma alongada e compreende a região responsável pelo processo de dimerização dos monômeros de proteína E. Este domínio contém aproximadamente 180 resíduos de aa. A sua estrutura tem forma de dedo, possuindo na sua extremidade uma região denominada “loop” de fusão, com uma sequência hidrofóbica altamente conservada entre os sorotipos e que se expõe apenas na presença de pH ácido. Tal região é responsável por mediar a fusão das membranas viral e endossômica, durante a infecção da célula hospedeira. O domínio II induz uma resposta imune humoral com a produção de anticorpos neutralizantes e não-neutralizantes, e ambos reagem cruzadamente com outros sorotipos (Fig. 1.5) (Modis *et al.*, 2003; Modis *et al.*, 2004).

O domínio III se localiza na porção C-terminal da proteína E e consiste de aproximadamente 98 resíduos de aa, que se dobram em um módulo independente, semelhante a uma imunoglobulina. Esse domínio é responsável pela interação vírus-célula, apresentando sítios que se ligam a receptores presentes na superfície das células hospedeiras, como por exemplo, o receptor DC-SIGN situado na membrana de células dendríticas imaturas (Lee *et al.*, 1997; Beasley & Barret, 2002; Modis *et al.*, 2003; Modis *et al.*, 2005; Guzman *et al.*, 2010). Essa interação mediada pelo domínio III promove a endocitose da partícula viral. Alguns epítomos localizados nessa região são capazes de induzir uma resposta de anticorpos neutralizantes tipo e subtipo-específico (Modis *et al.*, 2003; Modis *et al.*, 2005). O domínio III dos vários sorotipos de DENV tem sido considerado um importante alvo para a produção de anticorpos monoclonais e vacinas para uso terapêutico e profilático, respectivamente (Fig. 1.5) (Guzman *et al.*, 2010; Sukupolvi-Petty *et al.*, 2007; Shrestha *et al.*, 2010).

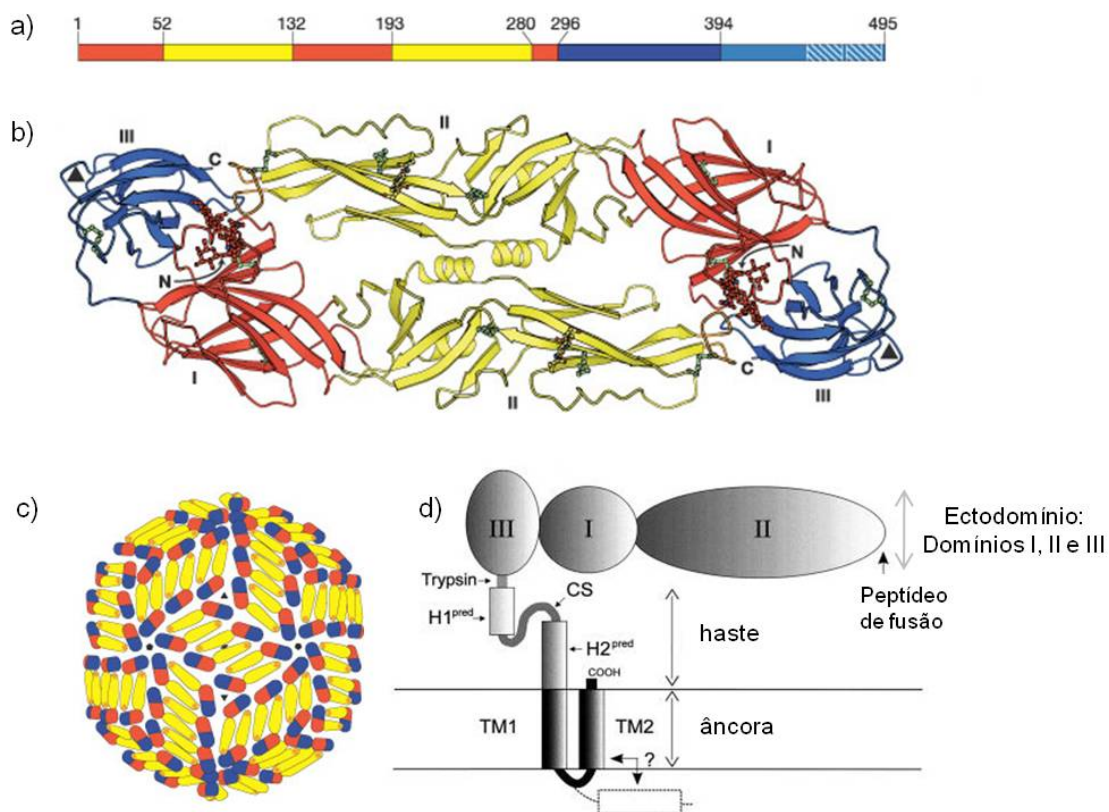


Figura 1.5: Representação esquemática dos resíduos de aminoácidos que compõem o ectodomínio (formado pelos domínios I, II e III) e a região de haste (azul claro) e âncora/transmembrana (azul achurado) localizada na porção C-terminal da proteína E de DENV (a). O domínio I está representado em vermelho, o domínio II em amarelo e o Domínio III em azul escuro (a, b, c). Conformação dimérica da proteína E presente na superfície das partículas virais maduras (b). Os dímeros de E estão dispostos paralelamente à superfície da membrana viral. Configuração do ectodomínio e representação das regiões haste/âncora em relação à bicamada lipídica (d) (Adaptada de Allison *et al.*, 1999 & Modis *et al.*, 2003).

1.3.2. Proteínas Não Estruturais

A NS1 é uma glicoproteína que possui PM de aproximadamente 45-48 KDa. Essa proteína não estrutural é secretada e detectada em grandes quantidades no soro de indivíduos infectados com DENV. Tal característica peculiar fez da NS1 um dos principais marcadores utilizados no diagnóstico precoce da dengue (Young *et al*, 2000, Hu *et al.*, 2011). Além disso, a proteína NS1 também pode ser encontrada no interior de células infectadas ou ancorada a sua superfície, através de uma sequência hidrofóbica que corresponde à região N-terminal da proteína NS2A, e que funciona como uma sequência sinal capaz de interagir com uma cauda GPI (Glicosil-

Fosfatidil-Inositol), formando assim uma âncora GPI-NS1 (Jacobs *et al.*, 2000). Adicionalmente, o nosso grupo demonstrou que células transfectadas com a vacina de DNA pcTPANS1ANC, que possui o gene da NS1 e a sequência que corresponde à região N-terminal da proteína NS2A, apresenta a proteína NS1 ancorada em sua superfície celular, observado por microscopia eletrônica de transmissão (Costa *et al.*, 2007). Pouco se sabe sobre o papel biológico da NS1, embora ela seja essencial para a viabilidade do DENV. Alguns estudos sugerem que a NS1 está envolvida nos processos de replicação, montagem e maturação da partícula viral (Lindenbach & Rice, 2001; Assenberg, 2009).

A NS2A, a NS2B, a NS4A e a NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas associadas à membrana e/ou a outras proteínas para exercerem seus papéis biológicos, envolvidos no ciclo replicativo do DENV. A NS4B aparentemente modula a replicação viral através da interação com outra proteína não estrutural a NS3. Além disso, a NS4B pode estar associada à inibição da resposta de interferons (IFN do tipo 1) em indivíduos infectados (Lindenbach & Rice, 2001; Umareddy *et al.*, 2006). Em particular, a NS2B se associa à porção proteásica da NS3 para formar uma serino-protease ativa (NS2B-NS3), que cliva junções protéicas na poliproteína viral (Fig. 1.4b) (Melino & Paci, 2007).

A NS3 (69-70 KDa) possui aproximadamente 618 aa e é caracterizada como uma proteína multifuncional com atividades de serino-protease (NS2B-NS3); de helicase (atua na dissociação da dupla fita de RNA sendo potencializada quando a NS3 está associada a NS4B durante a replicação do RNA viral); de NTPase (hidrolisa ATP para fornecer energia durante os processos de replicação); e de RTPase (atua provavelmente removendo o grupo fosfato da região 5' N-terminal que parece estar envolvido no processo de adição da estrutura *cap* na extremidade 5' UTR do genoma viral). Além disso, a interação NS3/NS5 pode estimular as atividades enzimáticas da proteína NS3 (nas porções helicase e NTPase). Em resumo, a NS3 exerce um papel fundamental no ciclo de vida dos flavivirus, participando ativamente do processamento da poliproteína e nos processos de replicação do RNA viral (Lindenbach & Rice, 2001; Umareddy *et al.*, 2006; Melino & Paci, 2007; Assenberg *et al.*, 2009).

A proteína mais conservada dentro dos Flavivírus é a NS5 (103 KDa) (Lindenbach & Rice, 2001). Ela possui um motivo metiltransferase, constituído de aproximadamente 320 resíduos de aa, localizado na porção N-terminal da proteína. Tal motivo é responsável pela adição do *cap* e pela metilação da extremidade 5' UTR e, como citado acima, a NS3 parece cooperar com a NS5 nesse processamento (Assenberg *et al.*, 2009). Já na porção C-terminal da NS5 localiza-se uma sequência com atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp, do inglês: RNA-dependent RNA polymerase) responsável pela replicação, sintetizando cópias negativas e positivas do RNA viral. As fitas negativas servem de molde para a transcrição das fitas positivas de RNA que serão utilizadas para a tradução de novas poliproteínas e/ou seguirão para a montagem do nucleocapsídeo das partículas virais (Lindenbach & Rice, 2001; Qi *et al.*, 2008; Melino *et al.*, 2007).

1.4. CICLO DE VIDA

Na infecção natural por DENV, mosquitos infectados inoculam partículas virais no hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Inicialmente, próximo ao local da picada, o DENV interage, através de seu ligante (proteína E), com receptores e co-receptores localizados na superfície de células permissivas à infecção. Tal interação promove a adsorção e entrada da partícula viral por meio de endocitose (Fig. 1.6). Além disso, esse estágio de “reconhecimento” (vírus-célula) determina o tropismo celular do DENV (Clyde *et al.*, 2006). Vários receptores foram propostos em diferentes células de mamíferos, incluindo o heparan sulfato, proteínas do choque térmico (Hsp70 e Hsp90), GRP78/Bip, CD14, receptor de laminina, CLEC5A (do inglês: C-type lectin domain family 5A), DC-SING (do inglês: DC (dendritic cell)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin), entre outros (Clyde *et al.*, 2006; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Murrell *et al.*, 2011).

Em geral, células da linhagem dos fagócitos mononucleares, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas são consideradas os alvos principais da infecção por DENV. Dentre essas, destacam-se as células dendríticas imaturas, especialmente aquelas derivadas de monócitos. Tais células apresentam alta expressão do receptor DC-SING na sua superfície, responsável por mediar a entrada do vírus (Wu *et al.*, 2000; Lozach *et al.*, 2005; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudos clínicos e de autópsias de indivíduos com histórico

de dengue, apontam outras células, como hepatócitos, linfócitos, células endoteliais, neuronais e de Langerhans, também como alvos para a replicação viral (Rosen *et al.*, 1999; King *et al.*, 1999; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005; Clyde *et al.*, 2006; Cabrera-Hernandez *et al.*, 2007; Paes *et al.*, 2009).

Uma vez realizada a endocitose da partícula viral, a glicoproteína E do DENV sofre eventos moleculares complexos, dependente de pH ácido, essenciais para o estabelecimento da infecção. Inicialmente, há a dissociação dos homodímeros da proteína E com projeção dos domínios II, os quais expõem o peptídeo ou “loop” de fusão que se insere na membrana do endossomo. Finalmente, os monômeros de E se trimerizam e completam o processo de fusão das membranas viral e endossômica, culminando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (Modis *et al.*, 2004; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

No citoplasma, o genoma viral desnudo, livre do capsídeo, estabelece um processo infeccioso. Tal genoma, que compreende um RNA de fita simples com polaridade positiva, se comporta como um RNA mensageiro (RNAm). Inicialmente, ocorrem às primeiras traduções do RNA viral e processamento da poliproteína nas membranas do RE, com produção das proteínas flavivirais (estruturais e NS) (Fig. 1.4b). Em especial, a NS5 produz cópias de RNA de polaridade negativa, a partir do RNA viral, as quais servem de molde para a síntese de novas fitas positivas, que serão incorporadas às novas partículas virais (Fig. 1.6) (Clyde *et al.*, 2006; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009). A partir dessa fase, há um aumento substancial na produção de proteínas virais. As proteínas estruturais prM e E formam heterodímeros que permanecem ancorados na face interna do RE. Adicionalmente, o complexo de replicação viral (RNA viral, proteínas virais e, possivelmente fatores da própria célula hospedeira), encontra-se ancorado na face externa das membranas do RE (Mackenzie, 2005). As novas fitas de RNA com polaridade positiva interagem com as proteínas C e juntos formam o nucleocapsídeo, que brota em direção ao lúmen do RE, adquirindo, assim uma bicamada lipídica, contendo heterodímeros prM/E. A partícula viral imatura recém formada, segue pela via de secreção e completa seu processo de maturação na rede trans-Golgi, local onde ocorre a clivagem da prM pela furina. Tal processo promove um rearranjo na superfície do vírion: rompem-se os heterodímeros M/E e os homodímeros de E expõem o domínio de ligação (domínio III) formando, dessa forma, uma partícula

viral infectiva (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Clyde *et al.*, 2006; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Por outro lado, pode haver clivagem parcial da prM gerando, assim, partículas virais imaturas (Fig. 1.3b) (Perera & Kuhn, 2008).

As partículas virais de DENV são liberadas para o meio extracelular através de exocitose e ganham a corrente sanguínea do hospedeiro infectado. Portanto, nesse período de viremia, um mosquito (*Aedes*) pode se infectar durante o respasto sanguíneo, fechando assim o ciclo de vida do DENV.

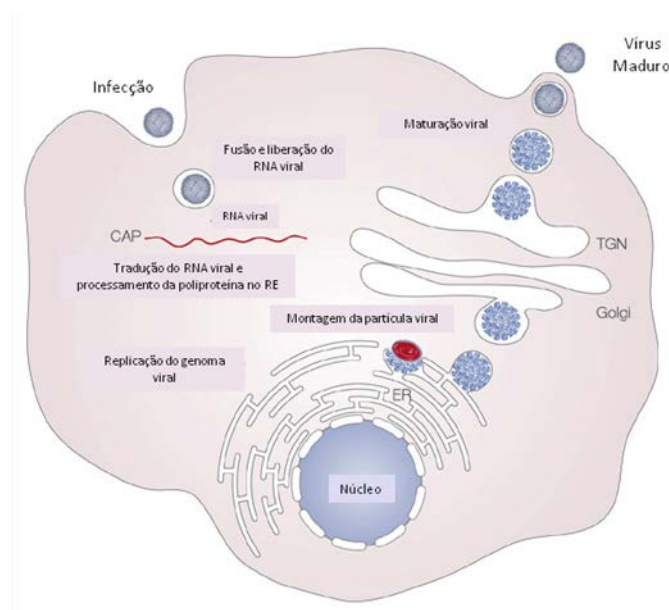


Figura 1.6: Ciclo de replicação do DENV. A entrada da partícula viral ocorre através da via de endocitose mediada por receptor. No pH ácido do endossoma a proteína E sofre mudanças conformacionais que levam a fusão das membranas viral e endossômica. O RNA viral é traduzido e inicia-se o processo de replicação. A montagem das partículas virais ocorre no RE, e as novas partículas imaturas recém formadas, seguem pela via de secreção e completam a maturação na rede trans-Golgi. Posteriormente os vírus são liberados pela célula hospedeira. Adaptado de Mukhopadhyay *et al.*, 2005.

1.5. A DENGUE

Um amplo espectro de manifestações clínicas pode ser diagnosticado em pacientes com dengue. Além disso, a dengue muitas vezes apresenta evolução clínica, com resultados imprevisíveis nos indivíduos sintomáticos (WHO, 2009). Por

outro lado, muitos indivíduos infectados com DENV não apresentam sintomas da doença (Rothman, 2004).

Segundo a OMS a dengue pode se apresentar como quadros de febre indiferenciada, FD e quadros mais graves como FHD/SCD (WHO, 1997; Whitehead *et al.*, 2007; WHO, 2009). Os quadros de dengue se iniciam logo após o período de incubação viral (4-7 dias). A febre indiferenciada mimetiza o que ocorre em outras infecções virais, comprometendo assim, o diagnóstico de dengue (Gurugama *et al.*, 2010). Nos quadros de FD, frequentemente são observados os sintomas de: febre alta; dores (de cabeça, retroorbitais, nos ossos, nas articulações, abdominais); vômitos; diarréias; manifestações dermatológicas, pruriginosas ou não, como erupções maculo-papulares. Além disso, são relatadas leucopenias, trombocitopenias e elevações nos níveis de transaminases no soro dos indivíduos com dengue. A FD tem duração de aproximadamente 5-7 dias e após este período geralmente a febre cessa e os sintomas regridem. A recuperação em muitos pacientes é ainda acompanhada de fadiga prolongada e depressão por muitos dias (Whitehead *et al.*, 2007; WHO, 2009; Ross, 2010; Gurugama *et al.*, 2010).

O curso clínico inicial da FHD se assemelha com àquele apresentado na FD. Contudo, os sintomas dos pacientes evoluem rapidamente, seguidos de sangramentos espontâneos. Tipicamente, a FHD é caracterizada por febre alta, manifestações hemorrágicas, aumento da permeabilidade vascular, insuficiência e/ou falência circulatória, trombocitopenia e hepatomegalia (Ross, 2010; Gurugama *et al.*, 2010). Além disso, o extravasamento de fluido intravascular para os espaços intersticiais causa hemoconcentração e hipoproteinemia em pacientes com FHD (WHO 1997).

A FHD foi classificada em 4 graus de gravidade (Tab. 1.1), sendo que os graus 3 e 4 definem os quadros da SCD, a qual está associada à elevada taxa de mortalidade (9-47%) (WHO, 2009; Gurugama *et al.*, 2010). Na SCD aparecem os sintomas típicos de insuficiência circulatória, tais como: taquicardia, hipotensão, pele fria e pegajosa, periferias congestionadas e cianose circum-oral. Muitos pacientes com SCD morrem com disfunções em múltiplos órgãos e coagulação intravascular disseminada (Ross, 2010; Gurugama *et al.*, 2010).

Graus	Sintomas da FHD
Grau 1	Febre; sintomas não específicos; teste torniquete positivo.
Grau 2	Manifestações de grau 1 associado a sangramentos espontâneos.
Grau 3	Choque insipiente com sinais de falência circulatória.
Grau 4	Choque profundo com pulso e pressão sanguínea indetectável

Tabela 1.1: Classificação da FHD em 4 graus de severidade. Obs.: Os graus 3 e 4 são considerados SCD, (Ross, 2010).

Na prática clínica, geralmente são encontradas várias dificuldades para se aplicar os critérios definidos para a classificação de FD, FHD e SCD em pacientes com a dengue. Entretanto, tal classificação permanece sendo amplamente utilizada, até o momento. Nos últimos anos, houve transformações na epidemiologia da dengue no mundo, que refletiram no aumento drástico do número de casos confirmados, acompanhados de maior percentual de indivíduos com formas graves da doença e muitos desses casos não apresentaram manifestações hemorrágicas (Nogueira *et al.*, 2007; Balmaseda *et al.*, 2005; Tan & Alonso, 2009). Sendo assim, a OMS e o TDR (Tropical Disease Research) têm apoiado estudos clínicos multicêntricos, realizados em regiões endêmicas de dengue, para definir critérios de classificação da doença em graus de gravidade, utilizando para isto dados clínicos e laboratoriais, com o objetivo de estabelecer parâmetros que indiquem sinais de alerta para o desenvolvimento de formas mais graves da dengue (WHO, 2009; Nielsen, 2009; Guzman *et al.*, 2010).

1.6. RESPOSTA IMUNE

A infecção com um dos quatro sorotipos do DENV induz imunidade duradoura, provavelmente por toda vida, contra o sorotipo infectante (imunidade homotípica). Apesar de ser gerada uma resposta imune cruzada entre os sorotipos heterólogos que pode ser protetora, esta resposta é de curta duração (alguns meses) contra os sorotipos heterólogos (Murphy & Whitehead, 2011). Sendo assim, naturalmente ocorrem infecções sequenciais com os diferentes sorotipos virais, principalmente nas regiões hiperendêmicas, onde há co-circulação de vários DENV (Laoprasopwattana *et al.*, 2007; Yauch *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Diversos estudos evidenciaram que estas infecções sequenciais ao invés de conferir

proteção aos indivíduos levam a uma maior incidência dos casos mais graves de dengue (Rothman & Ennis, 1999; Vaughn *et al.*, 2000; Hastead, 2007; Duangchinda *et al.*, 2010). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar tal fato, que serão discutidos mais adiante.

A primeira linha de defesa, contra o DENV provavelmente tem início com a produção de interferons (IFNs) (Ho *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010). Essas moléculas parecem ser cruciais para a proteção, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, frente à infecção por DENV (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). A partícula viral interage com receptores de reconhecimento de patógenos, como lecitinas do tipo-C e TLRs (toll-like receptors), que são expressos em células de origem mielóide. Foi demonstrada a participação desses receptores na indução de resposta inata com produção de IFNs do tipo 1 (α e β) e 2 (γ) na infecção por DENV (Shresta *et al.*, 2005; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Além disso, foi observada a ativação de células NK (natural killer), que podem secretar várias citocinas incluindo o IFN- γ , em pacientes que apresentaram quadros leves de dengue, sobretudo durante os eventos iniciais da doença, antes do estabelecimento da resposta imune adaptativa (Azeredo *et al.*, 2005). Além disso, camundongos geneticamente deficientes de IFNs tipo 1 e 2 são altamente suscetíveis à infecção primária por DENV (Shresta *et al.*, 2004; Ho, 2005). Alguns trabalhos sugerem que as proteínas não estruturais do DENV, a NS2A, NS4A, NS4B e NS5 estão envolvidas na inibição da resposta inata antiviral impedindo a produção de IFN- α (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Julander *et al.*, 2011). Por outro lado, altos níveis de IFN- γ presente no soro de pacientes foram associados à doença grave (Bozza *et al.*, 2008).

A resposta imune humoral se desenvolve aproximadamente seis dias após a picada do mosquito infectado com DENV (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Na infecção primária, inicialmente ocorre um aumento dos níveis de imunoglobulinas M (IgM) específicas para antígenos de DENV, as quais geralmente persistem no soro dos indivíduos por 30-90 dias. A partir do décimo dia de infecção há aumento dos níveis IgG específicas, que podem ser detectadas por muitos anos em indivíduos com histórico de dengue (Guzman *et al.*, 2010; Nagesh *et al.*, 2011). Em contra partida, na infecção secundária ocorre um rápido aumento nos títulos de IgG, enquanto que a resposta de IgM surge posteriormente e em baixos níveis (Nagesh

et al., 2011; Murphy & Whitehead, 2011). Portanto, a análise do perfil da resposta de anticorpos (IgM e IgG) em pacientes com dengue podem contribuir para o diagnóstico de infecções primárias ou secundárias (Murphy & Whitehead, 2011).

A maioria dos anticorpos são direcionados contra as proteínas estruturais E e prM/M e contra a NS1 (Kinney & Huang, 2001). A proteína E apresenta-se como um forte imunógeno, capaz de induzir anticorpos com grande capacidade neutralizante bloqueando a ligação da partícula viral às células alvo e a fusão das membranas, viral e endossômica, abortando assim o estabelecimento da infecção (Whitehead *et al.*, 2007; Murphy & Whitehead, 2011; Julander *et al.*, 2011).

Anticorpos contra as proteínas NS não neutralizam a infectividade viral diretamente, porém podem proteger através de outros mecanismos efetores (Kurane *et al.*, 1984; Pierson & Diamond, 2008). Anticorpos anti-NS1 foram capazes de mediar a lise de células infectadas através da ativação de proteínas do complemento, uma vez que a proteína NS1 pode se apresentar ancorada na superfície de células infectadas com DENV (Miller, 2010). Surpreendentemente, foram detectados altos níveis de NS1 no soro dos pacientes com dengue durante o período febril. A proteína NS1 solúvel também mostrou habilidade de ativar diretamente o sistema complemento (Avirutnan *et al.*, 2006). Tal ativação leva a produção do complexo C5b-9 solúvel que pode estar associado aos casos graves de dengue, promovendo o aumento da permeabilidade de células endoteliais (Avirutnan *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que anticorpos anti-NS1 podem apresentar reação cruzada com plaquetas ou causar apoptose em células endoteliais (Lin *et al.*, 2002). Por outro lado, a proteína NS1 tem sido indicada como um antígeno promissor para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue, ativando resposta imune protetora em modelos experimentais (Schlesinger *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007). Sendo assim, a participação da NS1 nesses mecanismos biológicos pode contribuir tanto para a imunopatogênese da doença bem como para a ativação de uma resposta imune protetora.

Anticorpos preexistentes anti-DENV gerados durante a infecção primária e que reconhecem epítomos cruzados presente nos demais sorotipos, parecem ter papéis opostos durante a infecção secundária (Laoprasopwattana *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que tais anticorpos teriam participação no desenvolvimento de quadros graves da doença (Rothman & Ennis, 1999, Kinney & Huang, 2001; Hasteed, 2007). De fato, diversos estudos propõem que na infecção secundária anticorpos preexistentes reconhecem as proteínas E presentes nas partículas virais heterólogas podendo facilitar a entrada do DENV em células que apresentam receptores Fc γ R na superfície (Fig. 1.7) (Halstead 1977; Laoprasopwattana *et al.*, 2007; Mathew & Rothman, 2008; Tan & Alonso, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Tal fenômeno pode contribuir para o aumento da carga viral, um dos fatores de risco observado nos indivíduos com quadros graves da dengue. Essa teoria é amplamente difundida e reconhecida entre os estudiosos da área como aumento da replicação dependente de anticorpos (ADE, do inglês: antibody-dependent enhancement). Entretanto, a relevância desse mecanismo *in vivo* ainda não foi completamente esclarecida (Mathew & Rothman, 2008). Recentemente, foi demonstrado que os anticorpos anti-prM possuem capacidade limitada de neutralização e se ligam nas proteínas prM, não clivadas, presente na superfície viral. Tal ligação, associado à capacidade desses anticorpos de reagirem cruzadamente com os outros sorotipos do DENV, também pode contribuir para o aumento da carga viral em humanos, através da ADE (Dejnirattisai, 2010).

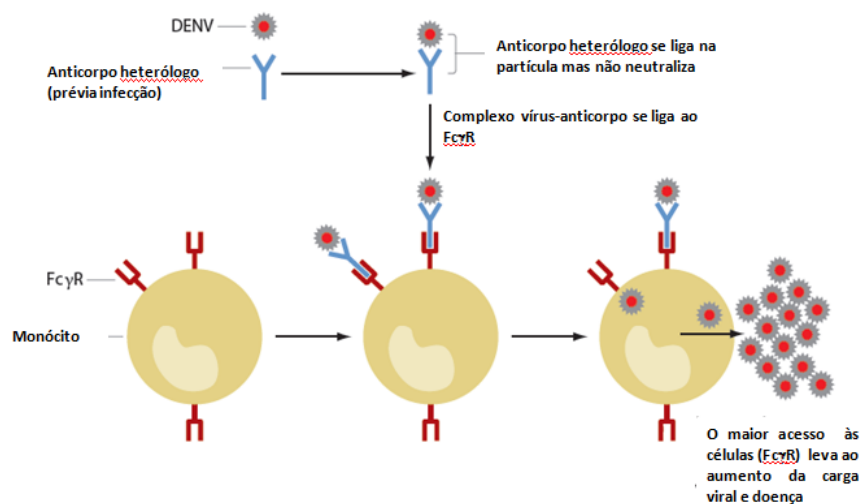


Figura 1.7: Representação esquemática do mecanismo de ADE. (Adaptada de Murphy & Whitehead, 2011).

A infecção primária por DENV, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, também promove o desenvolvimento de uma resposta de células T, CD4⁺ e CD8⁺, específica contra epítomos das proteínas virais (Mathew & Rothman,

2008; Yauch *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Além disso, foi demonstrada a participação das células TCD8⁺ no controle inicial da infecção por DENV (Yauch *et al.*, 2009). Muitos epítomos estimuladores da resposta de células T vêm sendo identificados nas proteínas estruturais, embora a grande maioria desses epítomos esteja presente nas proteínas NS (Imrie *et al.*, 2007; Mathew & Rothman, 2008; Murphy & Whitehead, 2011). Em especial, vários trabalhos têm demonstrado a imunodominância da proteína NS3 que contém diversos epítomos de células T em sua estrutura protéica (Mathew & Rothman, 2008; Duangchinda *et al.*, 2010).

Alguns estudos realizados demonstraram que a infecção por DENV induz uma resposta imune celular de memória específica, tanto com células de pacientes com dengue quanto em animais, e os clones de memória gerados são capazes de reagir contra epítomos homólogos e heterólogos de DENV (van der Most, 2000; van der Most *et al.*, 2003; Bashyam *et al.*, 2006; Mathew & Rothman, 2008; Basu & Chaturvedi, 2008; Mathew & Rothman, 2008; Friberg *et al.*, 2011).

Embora as células T de memória sejam capazes de reagir de forma cruzada contra sorotipos heterólogos do DENV, podendo assim prover imunidade protetora em infecções sequenciais, tal resposta, na verdade, vem sendo associada aos processos imunopatogênicos frente à infecção secundária (Mongkolsapaya *et al.*, 2006; Basu & Chaturvedi, 2008; Martina *et al.*, 2009; Tan & Alonso, 2009; Nielsen, 2009; Murphy & Whitehead, 2011; Friberg *et al.*, 2011). De acordo com a teoria do pecado original, as células T de memória derivadas da infecção primária, que reagem contra os sorotipos heterólogos de DENV durante a infecção secundária, são ativadas antes do estabelecimento de clones específicos contra a infecção corrente. Essa rápida ativação e proliferação de clones heterólogos com baixa afinidade, associada à robusta produção de citocinas e baixa atividade citotóxica, foram relacionadas ao extravasamento plasmático observado em quadros graves da dengue (Mongkolsapaya *et al.*, 2006; Mathew & Rothman, 2008).

A perda da integridade das células endoteliais de um modo geral vem sendo associada à resposta imune anormal, com produção de altos níveis de citocinas e quimiocinas, (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, MCP-1, GM-CSF e INF- γ), e tal efeito vem sendo chamado de “tempestade” ou “Tsunami” de citocinas (*citokine storm*) de citocinas, observada em pacientes com quadros graves

da doença (Basu & Chaturvedi, 2008; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Além disso, estudos também demonstraram níveis elevados de moléculas solúveis no soro de pacientes com dengue grave como sCD4, sCD8, sIL-2, sTNFRs (Mathew & Rothman, 2008).

Sendo assim, a exacerbação da resposta imune em dengue, tanto humoral quanto celular, parece estar fortemente relacionada à patogênese da doença. Outros fatores também poderiam estar envolvidos nas bases fisiopatológicas da doença (Mathew & Rothman, 2008; Basu & Chaturvedi, 2008). Doenças prévias existentes nos pacientes com dengue, como exemplo, asma brônquica, anemia falciforme e diabetes, parecem contribuir para os quadros graves (Guzman & Kouri, 2008). Alguns polimorfismos encontrados em genes que fazem parte do complexo HLA (Human Leukocyte antigen) ou em genes não HLA também foram relacionados à susceptibilidade ou gravidade de infecções com DENV (Chaturvedi *et al.*, 2006; Vejbaesya *et al.*, 2010).

1.7. VACINAS CONTRA A DENGUE

Há na literatura um consenso no que diz respeito à produção de vacinas contra dengue. Acredita-se que uma vacina eficaz e segura deva ser capaz de induzir respostas imunes com níveis de proteção homogêneos e simultâneos contra os quatro sorotipos do DENV, uma vez que tais sorotipos, apesar de relacionados, apresentam antigenicidade diferente e evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que os quadros mais graves da dengue estão relacionados à infecção secundária (Vaughn *et al.*, 2000). Portanto, é desejável que uma vacina tetravalente contra a dengue promova proteção total, pois uma proteção parcial e desbalanceada contra um dos sorotipos de DENV poderia tornar os indivíduos vacinados mais suscetíveis à dengue grave.

Apesar dos esforços de vários grupos de pesquisa, atualmente não há vacinas licenciadas disponíveis para combater a dengue. Vários candidatos vacinais vêm sendo desenvolvidos, contudo, nesses protótipos faltam ainda características necessárias para uma vacinação em massa, como segurança e a ativação de respostas imunes eficientes e balanceadas, capazes de induzir proteção de longo prazo contra os diferentes sorotipos virais circulantes. Dentre tais candidatos destacam-se as vacinas de vírus vivo atenuado e de vírus inativado. Dentre as

vacinas vivas atenuadas, podemos citar as vacinas quiméricas construídas a partir do “esqueleto” de vírus atenuados, tanto do DENV quanto do vírus vacinal da Febre Amarela, que serão detalhadas mais adiante (Guirakhoo *et al.*, 2000; van der Most *et al.*, 2000; Guirakhoo *et al.*, 2001; Caufour *et al.*, 2001; Durbin *et al.*, 2006; Raviprakash *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Além dessas, outras estratégias promissoras incluem vacinas de subunidades, vetorizadas (utilizando outros vírus recombinantes expressando proteínas de DENV) e de DNA (Lazo *et al.*, 2007; Clements *et al.*, 2010; Khanam *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2006a; Costa *et al.*, 2006b). As vacinas de DNA se destacam por induzir uma resposta imune de amplo espectro tanto humoral quanto celular e também serão detalhadas mais a frente (Ulmer *et al.*, 1993; Liu, 2011).

Na década de 40 do século passado, Albert Sabin desenvolveu uma vacina de vírus vivo atenuado (LAV, do inglês: live attenuated virus vaccine) a partir de passagens do DENV1 (cepa Hawaii) em cérebros de camundongo. Tal vacina foi testada em alguns voluntários, mas logo seu processo foi descontinuado (revisado por Raviprakash *et al.*, 2009). A partir de 1971, a Universidade do Hawaii em colaboração com a WRAIR (Walter Reed Army Institute of Research) desenvolveu outras LAVs, porém, ainda baseadas na atenuação viral empírica obtida por passagens em cultura primária de células de rim de cachorro. Concomitante, a Universidade de Mahidol (Bangkok, Tailândia), com apoio da OMS, produziu LAVs por passagens em células de rim de cachorro (PDK) (revisado por Guy & Almond, 2008 & Raviprakash *et al.*, 2009). Coletivamente, tais pesquisas resultaram em várias vacinas candidatas, monovalentes e tetravalentes, que foram avaliadas em ensaios clínicos. Contudo, foram observadas algumas complicações envolvendo alta reatogenicidade ou baixa imunogenicidade, além de interferência viral entre os componentes da mistura viral tetravalente (Barrett, 2001; Kinney & Huang, 2001; Edelman, 2007; Raviprakash *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011).

Com o desenvolvimento da engenharia genética, foram obtidas outras LAVs baseadas em deleções sítio dirigidas e/ou construções de vírus quiméricos. A vacina tetravalente desenvolvida pelo NIH (National Institute of Health) apresenta em sua formulação os sorotipos DENV1 e DENV4 atenuados por deleção de 30 nucleotídeos localizados na região 3' UTR, denominados rDEN1 Δ 30 e rDEN4 Δ 30, respectivamente (Durbin *et al.*, 2005; Durbin *et al.*, 2006). Ao que parece, tal

estratégia não apresentou êxito em relação aos sorotipos DENV2-3. Sendo assim, foram construídas quimeras trocando-se os genes prM e E do rDEN4 Δ 30 atenuado, pelos genes prM e E dos sorotipos 2 ou 3 (Durbin *et al.*, 2006; Blaney *et al.*, 2004). Tais vacinas já vêm sendo avaliadas em ensaios clínicos e deverão ser realizados testes clínicos em nosso país, em colaboração com o Instituto Butantã, São Paulo (SP). (Gay & Almond, 2007; Edelman, 2007; Raviprakash *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). No entanto, vale ressaltar o risco potencial de reversões ou recombinações gênicas encontradas em vacinas atenuadas que podem levar a quadros de infecções graves (Barrett, 2001; Kinney & Huang, 2001; Murphy & Whitehead, 2011).

Outras vacinas quiméricas foram construídas usando o vírus vacinal da febre amarela (YF17D ou YF17DD) como um “esqueleto” que carrega as proteínas estruturais de DENV (Guirakhoo *et al.*, 2000; Guirakhoo *et al.*, 2001; Caufour *et al.*; 2001; Galler *et al.*, 2005). A vacina YF17D foi produzida a partir do processo de atenuação da cepa Asibi, que foi submetida a passagens seriadas em tecidos de embriões de galinha (revisado por Monath *et al.*, 2007). Desde 1936, a vacina YF17D vem sendo amplamente utilizada no mundo inteiro e a partir desta surgiram subcepas vacinais como a vacina YF17DD (passagens 287-289) produzida em BioManguinhos (FIOCRUZ/BRASIL). Vale ressaltar que o vírus vacinal da febre amarela é considerado uma das vacinas mais segura e efetiva usada contra arbovírus e o nosso país é o maior produtor e exportador mundial desta vacina (www.bio.fiocruz.br/index.php/fornecimento-de-vacinas-acessado 26/03/2011; Monath *et al.*, 2007).

A Sanofi Pasteur, em colaboração com a antiga Acambis desenvolveu quatro vacinas quiméricas designadas ChimeriVaxTM - DEN1-4 (CVD1-4), a partir da LAV, YF17D. Cada vacina monovalente foi construída substituindo os genes prM e E do vírus vacinal (YF17D) por genes prM e E de cada sorotipo do DENV separadamente (Guirakhoo *et al.*, 2001). Estudos clínicos demonstraram que uma dose da vacina tetravalente gerou em humanos imunogenicidade com intensidade de baixa a moderada contra os 4 sorotipos do DENV. Entretanto, há claramente um desbalanço na resposta imune induzida, sendo que as vacinas CVD2 e CVD4 se mostraram mais imunogênicas em relação aos outros componentes vacinais. Resultados semelhantes foram observados anteriormente em testes pré clínicos conduzidos em primatas não humanos (Guirakhoo *et al.*, 2004; Murphy & Whitehead, 2011). Em

humanos, essa vacina tetravalente apresentou uma resposta imunogênica contra os quatro sorotipos apenas após o fim do protocolo vacinal, que se consistiu de três doses (0, 4 e 12 meses) administradas em voluntários mexicanos (Murphy & Whitehead, 2011). Evidentemente, há críticas nesse protocolo de vacinação com duração de um ano, o que não se deseja para regiões endêmicas, onde a imunização ineficiente para um ou mais sorotipos virais durante este período pode aumentar os riscos do desenvolvimento de casos mais graves da doença.

No Brasil, o grupo do Dr. Ricardo Galler também construiu vacinas quiméricas FA-dengue baseadas no vírus vacinal YF17DD que foram testadas em ensaios pré clínicos (BioManguinhos-IOC/FIOCRUZ) (Caufour *et al.*, 2001; Galler *et al.*, 2005). Dentre estas vacinas, destacamos o vírus quimérico YF17D-D2 que foi construído conforme descrito anteriormente, usando genes prM e E do DENV2, cepa Nova Guiné C (NGC) (Caufour *et al.*, 2001). Tal vacina foi testada tanto em camundongos quanto em primatas não humanos (Caurfour *et al.*, 2001; Galler *et al.*, 2005). Nesses estudos, a quimera YF17D-D2 foi capaz de induzir uma resposta imune humoral com presença de anticorpos neutralizantes. Camundongos suíços imunizados com três doses da vacina YF17D-D2 e desafiados com doses letais do DENV-2 (NGC) apresentaram taxa de 85% de sobrevivência (Caufour *et al.*, 2001). Por outro lado, nos testes realizados em primatas não-humanos imunizados com YF17D-D2 foi detectada viremia em um dos animais desafiados com DENV2 (Galler *et al.*, 2005).

Apesar dos avanços obtidos com as vacinas quiméricas, existe ainda um grande desafio: produzir uma vacina capaz de gerar uma resposta homogênea, com um número reduzido de doses, contra os quatro sorotipos do vírus da Dengue.

Outras vacinas clássicas, baseadas em vírus inativado, também vêm sendo desenvolvidas. Dentre as vacinas inativadas podemos citar a DENV2 PIV (PIV, do inglês: purified inactivated virus vaccine), cujas partículas virais foram expandidas em células Vero e inativadas por formalina. Esse processo de inativação resultou em perda da imunogenicidade quando comparado com as vacinas vivas atenuadas, pois apesar de induzir títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos e primatas não humanos, tal vacina não foi capaz de proteger completamente os macacos, que apresentaram viremia após o desafio com DENV (Putnak *et al.*, 1996; Raviprakash *et al.*, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Além disso, foi constatada a necessidade de múltiplas doses de reforço da PIV para gerar proteção, o que torna mais difícil

seu uso quando se pensa em áreas hiperendêmicas (Murphy & Whitehead, 2011). Mesmo assim, vários estudos pré clínicos vêm sendo realizados com a PIV, testando adjuvantes e outras vacinas em sistemas de dose e reforço (prime-booster) (Putnak *et al.*, 2005; Raviprakash *et al.*, 2009). Outras construções vacinais vêm sendo desenvolvidas utilizando vetores, como as vacinas baseadas em adenovirus recombinantes (Whitehead *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Raviprakash *et al.*, 2008; Raviprakash *et al.*, 2009; Khanam, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Os vetores adenovirais têm a capacidade de expressar múltiplos antígenos, o que teoricamente facilita o desenvolvimento de vacinas multivalentes. Sendo assim, foram construídas várias vacinas baseadas nesses vetores utilizando genes que codificam as proteínas estruturais e NS (Holman *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Raviprakash *et al.*, 2008; Raviprakash *et al.*, 2009; Khanam, 2009). Essas vacinas foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes e resposta celular específica, no entanto, os animais vacinados não se mostraram totalmente protegidos, apresentando baixa viremia quando desafiados com DENV. Além disso, frequentemente se discute sobre o problema da população humana ter imunidade prévia contra esses vetores, uma vez que tal imunidade eliminaria rapidamente a vacina recombinante, antes de a mesma gerar a resposta imune esperada (Raviprakash *et al.*, 2009). Por outro lado, outros vetores virais, como o MVA (do inglês: modified vaccinia Ankara) ou VEE (do inglês: venezuelan equine encephalitis vírus) estão sendo usados na construção de vacinas contra dengue, já que a população humana não possui anticorpos contra esses vetores (Chen *et al.*, 2007; Raviprakash *et al.*, 2009).

Outros pesquisadores têm investido na produção de vacinas de subunidades baseadas principalmente na proteína E ou no seu domínio III, nas proteínas NS1 e C (Lazo *et al.*, 2007; Clements 2010; Block *et al.*, 2010, Guzman *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2011). Entretanto, múltiplas doses com ou sem adjuvantes são requeridas para indução de proteção (Kochel, 1997; Murphy & Whitehead, 2011). Atualmente, está sendo realizado um ensaio clínico (fase 1) com a vacina monovalente fabricada pela Hawaii Biotec, baseada na proteína recombinante E de DENV1 produzida em células de drosófila (Murphy & Whitehead, 2011).

1.8. VACINAS DE DNA CONTRA DENGUE

1.8.1. Vacinas de DNA

A vacina de DNA apresenta-se como uma eficiente tecnologia usada nos últimos anos no desenvolvimento de vacinas, não somente contra diversos agentes infecciosos, mas também contra doenças autoimunes, câncer e alergias (revisado por Liu, 2011).

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 (Tang *et al.*, 1992; Liu, 2011). Uma vez no interior da célula, mais especificamente no núcleo, o DNA plasmidial, que se apresenta na forma episomal, é transcrito e o RNAm segue para o citoplasma onde ocorre a tradução de cópias da proteína recombinante. A proteína recombinante pode ser expressa no citoplasma ou no RE dependendo da estratégia de clonagem utilizada, proteínas que se encaminham para a via RE-Golgi, podem ser secretadas para o meio extracelular ou serem expressas na superfície celular, caso possuam caudas intracitoplasmáticas ou se associem a âncoras hidrofóbicas (Costa *et al.*, 2007; Liu, 2011). A expressão endógena do antígeno pelas células transfectadas com o DNA plasmidial parece imitar uma infecção viral natural, sendo capaz de gerar tanto uma resposta imune humoral, com produção de anticorpos, como uma resposta celular, com indução de linfócitos T citotóxicos (CTL, do inglês: Cytolytic T-lymphocyte) (Donnelly *et al.*, 1994; Ulmer *et al.*, 1996; Vogel & Sarver, 1995; Liu 2011). A proteína recombinante sofre processamento e os peptídeos antigênicos gerados podem ser apresentados pelos complexos de histocompatibilidade I e II (MHC I e II), ativando assim uma imunidade específica (Fig. 1.8) (Liu, 2011). Sabe-se que as células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs, do inglês: antigen-presenting cells) são capazes de apresentar peptídeos antigênicos através das duas vias mencionadas (MHC-I e II). Outras células, como as musculares, quando transfectadas expressam eficientemente a proteína recombinante que pode ser processada e apresentada via MHC-I. Entretanto, os miócitos não possuem moléculas co-estimuladoras, expressas em células APCs profissionais, necessárias para a completa ativação das células T e, portanto os CTL não podem ser ativados diretamente a partir da expressão do

antígeno pelas células musculares. Por outro lado, as APCs próximas ao local de inoculação também podem ser transfectadas diretamente com DNA plasmidial injetado apresentando assim os peptídeos via MHC I e MHC II. Além disso, estudos mais recentes demonstraram que o antígeno recombinante expresso em células musculares pode ser transferido para células dendríticas derivadas da medula óssea, uma APC profissional, e estas são responsáveis por ativar uma resposta imune de CTL, processo este denominado de cross-priming (Fu *et al.*, 1997; Dupuis *et al.*, 2000; Liu, 2011).

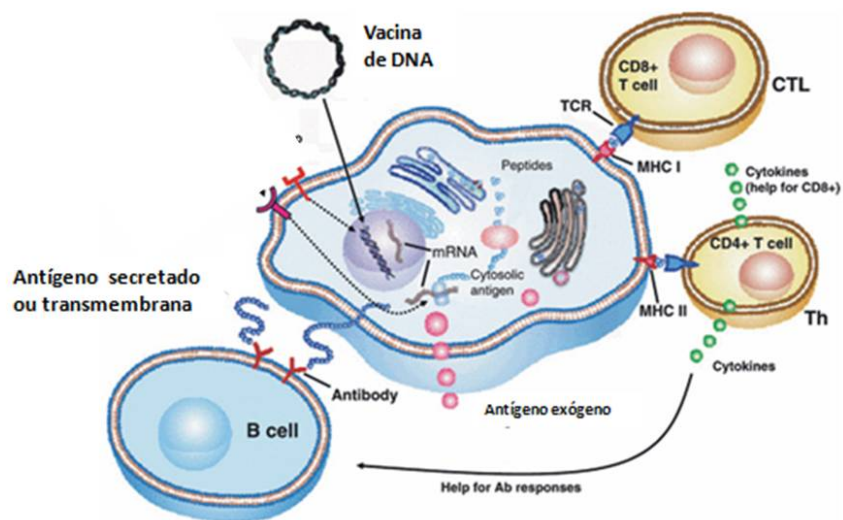


Figura 1.8: Célula transfectada por vacina de DNA. O plasmídeo recombinante é transcrito no núcleo da célula e o RNAm é traduzido no citoplasma gerando as proteínas recombinantes. Estas podem ser processadas e os peptídeos antigênicos apresentados por moléculas do MHC (I e/ou II); ou seguirem pela via de secreção e permanecerem ancoradas à superfície celular; ou secretadas pela célula hospedeira. Adaptada de Liu, 2011.

A indução dos dois braços da resposta imune, humoral e celular, fornece vantagens em comparação às vacinas inativadas e de subunidade que produzem principalmente ou exclusivamente uma resposta de anticorpos. Esta resposta de amplo espectro se compara à resposta induzida por vacinas vivas atenuadas, sem apresentar, contudo, o risco de reversão para forma patogênica do agente infeccioso (Davis & Whalen, 1995; Dertzbaugh, 1998; Liu, 2011). Adicionalmente, uma vantagem de se utilizar vacinas de DNA contra vírus, em relação às vacinas de subunidade, por exemplo, se relaciona à expressão *in situ* das proteínas virais após

a imunização, com modificações pós-tradução que ocorrem durante a infecção natural, como glicosilações, o que leva ao correto enovelamento destas proteínas (Liu, 2011).

A capacidade de ativar uma resposta imune celular pode ser bastante vantajosa no desenvolvimento de vacinas para certas doenças, como quando o agente infeccioso é um patógeno de replicação intracelular, como vírus, visto que CTLs reconhecem e lisam células do hospedeiro infectadas, participando do processo de eliminação da infecção (Ulmer *et al.*, 1996, McCluskie & Davis, 1999). A resposta imune gerada por vacinas de DNA também mostrou ser de longa duração, já que estudos com camundongos imunizados com diversos vetores plasmidiais apresentaram uma produção de anticorpos constantes, sendo estes detectados até 18 meses após a inoculação (Davis *et al.*, 1996; Alves *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2006a).

A utilização de plasmídeos recombinantes representa uma excelente alternativa para o desenvolvimento de novas vacinas devido a sua segurança na manipulação, estabilidade a variações de temperatura, menor custo de produção, além de permitir uma rápida seleção de sequências a serem avaliadas (Chang *et al.*, 2001; Liu, 2011).

De um modo geral, ainda existe a necessidade de se desenvolver estratégias mais eficientes para melhorar a resposta imune gerada por vacinas de DNA em primatas incluindo o homem. Vacinas de DNA inoculadas por via i.m. ou intradérmica utilizadas em estudos clínicos iniciais não se mostraram tão imunogênicas em humanos quando comparada à resposta que as mesmas geraram em camundongos. Uma das dificuldades estaria relacionada à baixa eficiência de transfecção de células hospedeiras em humanos (Liu & Ulmer, 2005). Dessa forma, várias estratégias têm sido testadas com o intuito de potencializar a resposta induzida pelas vacinas de DNA. Dentre estas se destacam os diferentes métodos de inoculação ou “entrega” (*delivery*) das vacinas de DNA como, por exemplo, a eletroporação (Widera *et al.*, 2000). Além disso, co-administração de plasmídeos que codificam citocinas, adição de sequências imunoestimuladoras, adjuvantes e a combinação de vacinas de DNA com outras vacinas em sistemas de dose e reforço (*prime-boost*) podem gerar respostas imunes mais eficientes (Krieg, 2001; Khanam

et al., 2007; Simmons *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2010; Eickhoff *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011).

1.8.2. Vacinas de DNA & dengue

Vários grupos têm analisado o uso da vacina de DNA no controle de flavivírus em geral. Tais estudos demonstraram a indução de uma resposta imune protetora em camundongos, suínos e primatas não-humanos após a vacinação com plasmídeos codificando proteínas estruturais flavivirais completas, incompletas ou somente domínios protéicos (Phillipotts *et al.*, 1996; Kochel *et al.*, 1997; Colombage *et al.*, 1998; Porter *et al.*, 1998; Kochel *et al.*, 2000; Konishi *et al.*, 2000; Raviprakash *et al.*, 2000; Jimenez & Fonseca, 2001; Mota *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2011). Outros estudos também foram realizados utilizando proteínas não estruturais de flavivírus, como o vírus da encefalite japonesa, TBE, hepatite C e DENV (Lin *et al.*, 1998; Encke *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2003; Timofeev *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006a; Costa *et al.*, 2006b; Costa *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos demonstraram que vacinas DNA contendo a sequência completa dos genes que codificam as proteínas prM e E ou a região do domínio III da proteína E dos DENV1-4 foram capazes de induzir uma resposta imune humoral, com a presença de anticorpos neutralizantes em modelos murinos. Entretanto, nestes estudos não foram usados testes de desafios com dose letal de DENV para avaliar eficácia protetora dessas vacinas (Kochel *et al.*, 1997; Raviprakash *et al.*, 2000a; Konishi *et al.*, 2000; Konishi *et al.*, 2005; Ramanathan *et al.*, 2009). Já outros relatos mostraram proteção de 80% em camundongos imunizados com construções baseadas nesses mesmos genes estruturais quando desafiados com doses letais de DENV (Mota *et al.*, 2005; De Paula *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011). Por outro lado, Porter e colaboradores (1998) observaram apenas 60% de sobrevivência nos animais imunizados com plasmídeos que carregam os genes prM-E, usando o mesmo sistema de desafio (Porter *et al.*, 1998). Portanto, os dados na literatura são conflitantes. Além disso, nestes estudos os autores não analisaram a morbidade nos animais que sobreviveram ao desafio, dados estes importantes para uma avaliação final da proteção gerada por estas vacinas.

Várias vacinas de DNA baseadas nos genes prM-E, incluindo algumas supracitadas, foram testadas em primatas não-humanos (*Aotus* e *Rhesus*) e

conferiram proteção parcial nos animais desafiados com DENV (Kochel *et al.*, 2000; Raviprakash *et al.*, 2000b; Putnak *et al.*, 2003; Raviprakash *et al.*, 2003; Blair *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2006). A proteção nos modelos experimentais com primatas não-humanos é geralmente avaliada através do acompanhamento diário da viremia. No estudo de Blair e colaboradores (2006), macacos *Aotus* imunizados com uma vacina de DNA monovalente tipo 3, que contém genes prM-E, foram desafiados com DENV3 e apresentaram média de 2.6 dias de viremia contra 3.6 dias observado nos animais controles (Blair *et al.*, 2006). Outra vacina de DNA (prM-E), construída por Putnak e colaboradores (2003), se mostrou imunogênica tanto em camundongos quanto em macacos (*Rhesus*). Entretanto, foram necessárias várias doses da vacina para a indução de uma resposta protetora, que mostrou ser de curta duração, pois os animais voltaram a ficar suscetíveis ao desafio com DENV sete meses após as imunizações (Putnak *et al.*, 2003).

Diante disso, a necessidade de utilização de novas estratégias para aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA e a duração da resposta imune tornou-se um grande desafio. Alguns estudos vêm empregando novas abordagens como a produção de vacinas de DNA com genes prM-E fusionados a sequência C-terminal de LAMP (do inglês: lysosome-associated membrane protein), que direciona as proteínas sintetizadas para os compartimentos ricos em moléculas de MHC-II, potencializando assim a apresentação do antígeno e conseqüentemente a resposta humoral, com a produção de anticorpos neutralizantes (Raviprakash *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2003; Dhaliya *et al.*, 2009). Além disso, sequências imunoestimuladoras e construções plasmídicas que carregam genes de citocinas, como GM-CSF, foram usadas em experimentos de co-imunização, contribuindo para a indução da resposta imune em camundongos e em macacos (Raviprakash *et al.*, 2001; Raviprakash *et al.*, 2003; Zheng, 2011). Entretanto, apesar do GM-CSF aumentar a resposta imune antígeno específica em modelos murinos, tal aumento não foi observado em ensaios clínicos que usaram vacinas DNA contra outros vírus como o HIV (Liu, 2011). Por outro lado, fêmeas de camundongos Balb/c imunizadas com três doses de uma vacina de DNA monovalente, baseada nos genes estruturais (prM/E) e não-estrutural (NS1) de DENV1, apresentaram 100% de proteção frente ao desafio letal realizado contra o sorotipo homólogo (Zheng *et al.*, 2011).

De um modo geral, também deve ser considerado o desenho das construções das vacinas de DNA propostas. Experimentos utilizando vacinas de DNA construídas com genes incompletos da proteína E do DENV, demonstraram que tais construções se mostraram menos imunogênicas e induziram proteção parcial em camundongos desafiados (RavipraKash *et al.*, 2000; Jimenez & Fonseca, 2001). Nestas abordagens, a expressão da proteína E parece não ter sido muito eficiente o que pode estar relacionado com a ausência de um peptídeo sinal forte que direcione essas proteínas recombinantes para o meio extracelular, aumentando assim a indução da resposta imune humoral (Costa *et al.*, 2007).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo construir e avaliar o potencial protetor de vacinas de DNA contra o vírus da dengue sorotipo 2, utilizando sequências que codificam o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) ou somente seu domínio III, fusionadas a um peptídeo sinal que direciona as proteínas recombinantes para o meio extracelular. Estas vacinas foram testadas em camundongos isoladamente ou em conjunto com vírus quimérico FA-dengue. Além disso, após verificarmos a maior eficiência da vacina de DNA baseada no ectodomínio da proteína E de DENV2, construímos e testamos *in vitro* plasmídeos recombinantes contendo ectodomínios semelhantes aos das proteínas de DENV1, DENV3 e DENV4. Esses dados geraram até o momento um artigo científico e o depósito de uma patente no Brasil e no exterior (Anexos 8.2 e 8.3).

Recentemente, foi realizado o primeiro ensaio clínico (fase 1) com uma vacina de DNA contra DENV (D1ME), construída pelo grupo do Dr. Raviprakash (Beckett *et al.*, 2011). Tal vacina foi administrada em três doses por via intramuscular sem a adição de plasmídeos que codificam citocinas e foi capaz de induzir níveis detectáveis de anticorpos neutralizantes e ativação de resposta celular em aproximadamente 50% dos indivíduos que receberam a dose maior (Beckett *et al.*, 2011). Além disso, a vacina se mostrou segura e com baixa reatogenicidade (Beckett *et al.*, 2011).

Capítulo 2.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial protetor de vacinas de DNA que codificam o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III) de DENV2 ou somente o seu domínio III, em camundongos Balb/c com imunizações simples ou combinadas com o vírus quimérico YF17D-D2.

2.1.1. *Objetivos específicos*

- Construir plasmídeos recombinantes que contêm a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E de DENV2 (pE1D2) ou somente o domínio III desta proteína (pE2D2), fusionadas à sequência sinal t-PA;
- Avaliar a expressão e localização das proteínas recombinantes mediada pelos plasmídeos pE1D2 e pE2D2 em ensaios *in vitro*;
- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes gerada com as vacinas de DNA administradas isoladamente ou combinadas com o vírus quimérico YF17D-D2 (FA-dengue);
- Avaliar a proteção conferida pelos diferentes esquemas de imunizações através de testes de desafios com doses letais de DENV2 por via intracerebral;
- Avaliar a resposta imune celular antígeno-específica induzida pela vacina pE1D2 em diferentes esquemas de imunizações, quanto à produção de IFN- γ por ELISPOT;
- Avaliar o perfil fenotípico de células TCD4 e TCD8 derivadas do baço dos animais imunizados, quanto à porcentagem de células CD62L positivas;
- Construir outros plasmídeos recombinantes contendo as sequências que codificam o ectodomínio da proteína E de DENV1, 3 e 4 e avaliar a capacidade de tais construções mediar a expressão das proteínas recombinantes *in vitro*.

Capítulo 3.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SOROTIPOS VIRAIS E LINHAGENS CELULARES

O DENV2, cepa Nova guiné C (NGC) (GenBank M29095) foi usado em uma primeira etapa, para a obtenção das sequências que codificam o ectodomínio da proteína E ou somente seu domínio III utilizadas na construção dos plasmídeos recombinantes. Tal linhagem também foi neuroadaptada em camundongos, através de passagens em cérebros de camundongos suíços neonatos, e usada nos ensaios de desafio por via intracerebral (i.c.). Para os testes de neutralização por redução de placas (PRNT, do inglês: *plaque reduction neutralization test*) foi utilizado o DENV2 (44/2), uma cepa de referência usada no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV/Biomanguinhos/FIOCRUZ). Ambos os vírus (DENV2 NGC e DENV2 44/2) foram cedidos pelo Dr. Marcos Freire (LATEV).

Em uma segunda etapa, foram construídos novas vacinas de DNA contendo genes sintéticos que codificam os ectodomínios da proteína E dos sorotipos, 1, 3 e 4.

Para propagação viral, ensaios de PRNT e análise das proteínas virais foram utilizadas monocamadas de células epiteliais de rim de macaco verde (Vero, ATCC), cultivadas em meio 199 com sais de Earle completo (Sigma), suplementado com soro fetal bovino (SFB, Invitrogen), e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A análise da expressão *in vitro* de proteínas mediadas pelos plasmídeos recombinantes foi realizada em monocamadas de células de rim de hamster neonato (BHK-21, ATCC) cultivadas em meio DMEM, suplementado com 5% de SFB e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Para a clonagem e amplificação em pequena e grande escala dos plasmídeos recombinantes e controle foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* da cepa DH5- α .

3.2. VETOR PLASMIDIAL

Foi utilizado para a construção dos plasmídeos recombinantes o plasmídeo pcTPA. Este plasmídeo foi construído anteriormente pelo nosso grupo (Costa *et al.*, 2006) a partir do vetor de expressão em células eucarióticas pcDNA3 (Invitrogen),

com a inserção da sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), a jusante da região promotora derivada do citomegalovírus humano (CMV). Além dessa forte região promotora, esse plasmídeo possui: um sítio múltiplo de clonagem; a sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH, do inglês: Bovine Growth Hormone); e o gene que confere resistência a neomicina, para a expressão de proteínas heterólogas em células de mamífero. Adicionalmente, o pcTPA contém uma origem de replicação (Co1E1) em células procarióticas e um gene de resistência a ampicilina para a seleção em bactérias.

3.2.1. Construção dos plasmídeos recombinantes

Inicialmente, foram construídos dois plasmídeos recombinantes, o pE1D2 e o pE2D2, a partir de sequências gênicas derivadas de DENV2. O plasmídeo pE1D2 contém a sequência que codifica o ectodomínio (constituído dos domínios I, II e III) da proteína E de DENV2. Esse seguimento gênico codifica aproximadamente 80 % da sequência N-terminal da proteína E, os 20 % restantes que foram descartados compreende a porção hidrofóbica C-terminal da E. Já o plasmídeo pE2D2 foi construído com a sequência que corresponde apenas ao domínio III da proteína E de DENV2.

Um DNA plasmidial (pYFNsk5) que contém os genes prM e E completos de DENV2 (NGC), cedido pelo Dr. Ricardo Galler, foi utilizado como molde para a amplificação de regiões alvo por PCR. Os oligonucleotídeos usados para a amplificação, bem como a localização no genoma do DENV2 NGC, estão dispostos na tabela 3.1.

Os fragmentos amplificados e o plasmídeo pcTPA foram digeridos com as enzimas *EcoRV* e *XbaI* (Promega). Os insertos e o plasmídeo linearizado foram purificados em resinas (SPIN KIT-Gene Clean), conforme protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida, cada inserto separadamente foi clonado no plasmídeo pcTPA usando o Kit T4 Ready DNA ligase (Amersham Biosciences), de acordo com as especificações do fabricante. As bactérias DH5- α foram transformadas com as novas construções e os clones positivos foram amplificados. O DNA plasmidial das colônias positivas foi isolado pelo método de lise alcalina e purificado em resina usando o Kit Flex-prep (Amersham Biosciences), conforme protocolo do fabricante.

As novas construções obtidas pE1D2 e pE2D2 foram digeridas e sequenciadas (Plataforma Genômica-Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ) com oligonucleotídeos que anelam em diferentes regiões (Tabela 3.1).

Oligonucleotídeos		Região de pareamento
1	5'GGGGGATATCATGCGTTGCATAGGAATATC3'	Senso 937 - 956
2	5'GGGGTCTAGATTAGATAGAACTTCCTTTC3'	Anti-senso 2115 - 2130
3	5'GGGGGATATCGGAATGTCATACTCTATG3'	Senso 1822 - 1839
4	5'ATACGACTCACTATAGGGAG3'	Senso
5	5'AACAGATGGCTGGCAACTAG3'	Anti-senso

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos usados para a clonagem (1-3) ou sequenciamento dos fragmentos clonados (4-5). 1 e 2 ou 1 e 3 foram usados para amplificar a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E DENV2 NGC ou seu domínio III, respectivamente (GenBank M29095). 4 e 5 anelam nas regiões do vetor pcDNA3 que flanqueiam as regiões clonadas.

Posteriormente, foram realizadas outras três clonagens baseadas na sequência que corresponde ao ectodomínio da proteína E dos sorotipos DENV1, DENV3 e DENV4, resultando nos plasmídeos pE1D1, pE1D3 e pE1D4, respectivamente. Os genes incompletos das proteínas E de cada um desses sorotipos foram sintetizados e clonados no plasmídeo PUC57 (GenScript). Em seguida, os três genes foram subclonados no plasmídeo pcTPA, conforme descrito anteriormente.

3.2.2. Extração do DNA plasmidial

Para a produção em grade escala de DNA plasmidial, amostras dos estoques de bactérias transformadas com os plasmídeos, pE1D2, pE2D2 ou pcTPA mantidas em N₂ líquido, foram inoculadas em meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina e cultivadas por uma noite a 37°C sob agitação. No dia seguinte 25mL dessa cultura foi inoculado em 1L de meio TB contendo ampicilina e incubadas novamente por uma noite a 37°C sob agitação. Para a realização deste trabalho foram cultivados 24L de bactérias transformadas com cada um dos plasmídeos. As bactérias foram centrifugadas 6000g e o DNAs plasmidiais foram extraídos por lise alcalina e purificados em colunas de troca iônica, utilizando o kit Endofree QIAGEN giga (tip

10.000), de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente os DNAs foram ressuspensos em água estéril (livre de endotoxinas), digeridos com enzimas de restrição e avaliados em gel de agarose, para determinação de sua integridade e pureza, e quantificados em espectrofotômetro. Os estoques das vacinas de DNA obtidas foram mantidos a -20°C, até o uso. Amostras das vacinas pE1D2 e pE2D2 foram sequenciadas novamente após a amplificação em grande escala, para confirmar a ausência de mutações nos genes clonados.

Os plasmídeos pE1D1, pE1D3 e pE1D4 foram produzidos em média escala e purificados em colunas de troca iônica, utilizando o kit Mid prep QIAGEN, de acordo com o protocolo do fabricante. Esses plasmídeos também foram eluídos em água estéril e avaliados conforme descrito acima.

As etapas de clonagens e purificação dos plasmídeos recombinantes foram realizadas de acordo com as normas de Biossegurança, sob o CQB (105/99), para atividade de pesquisa com organismos geneticamente modificados em regime de contenção, transporte, armazenamento e avaliação de produto (NB-A1).

3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

3.3.1. Transfecção

As células BHK-21 foram usadas em todos os experimentos de transfecções realizados ao longo do trabalho, de acordo com o protocolo estabelecido em nosso laboratório (Costa *et al.*, 2006). Tais células foram mantidas em meio DEMEM (Sigma, USA), conforme descrito no item 3.1., garrafas contendo monocamadas de células era lavada a cada dois dias com solução salina BSS e para o repique das células BHK e obtenção de suspensão celular a monocamada era lavada com solução salina BSS-CMF para posteriormente ser dissociada com tripsina (Invitrogen).

Para os experimentos de transfecção, as células BHK-21 foram plaqueadas em lâmina com 8 poços (LAB-TEK, Nunc, Denmark) contendo 2×10^4 células por poço ou em garrafas de 25 cm² contendo 2×10^5 e incubadas durante uma noite nas mesmas condições de manutenção. No dia seguinte, as células BHK-21 foram transfectadas usando 0,2µg ou 2µg de DNA plasmidial misturado à lipofectamina

(Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante, em cada poço (LAB-TEK) ou garrafa (25 cm²), respectivamente. As transfecções realizadas em lâmina foram usadas para a detecção das proteínas recombinantes por imunofluorescência e em garrafas para os experimentos de marcação metabólica, descrito mais a frente.

3.3.2. Infecção

Culturas de células Vero foram cultivadas em meio 199, conforme descrito no item 3.1., para a manutenção da célula era realizado uma passagem por semana em garrafas de 175 cm². Tanto para o repique quanto para a obtenção de suspensão de células, o tapete celular era dissociado tripsina. Para os experimentos de infecção, células Vero foram plaqueadas em placas com 6 poços (9x10⁵ células/poço). No dia seguinte, as monocamadas formadas foram inoculadas com os vírus, quimérico YF17D-D2 ou DENV2 (44/2) com uma M.O.I. de 0,5 (200µL volume final), ou Mock (meio 199), por 1h a 37°C. Após este período, os sobrenadantes das culturas foram retirados e adicionados 3mL de meio 199 em cada poço. As células infectadas foram incubadas por um período de 48h e as monocamadas com aproximadamente 40% de efeito citopático foram usadas nos experimentos de marcação metabólica.

Suspensões de células Vero também foram usadas nos experimento de redução de placas (PRNT_{50%}), descrito em detalhes no item 3.6.1.

3.3.3. Imunofluorescência

A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada em culturas de células BHK-21 transfectadas com os plasmídeos recombinantes construídos ao longo do trabalho.

Experimentos de imunofluorescência foram realizados em lâmina com 8 poços (LAB-TEK, Nunc, Denmark) conforme descrito no item 3.3.1., após 24 horas de transfecção, a monocamada de células foi fixada com 4% de paraformaldeído, permeabilizada com 0,6% de saponina e bloqueada com 1% albumina de soro bovino (BSA).

Primeiramente, para a detecção das proteínas recombinantes, as células transfectadas com os plasmídeos pE1D2, pE2D2 ou controle pCTPA foram incubadas com fluido ascítico de camundongo anti-DENV2 (ATCC) ou com o anticorpo monoclonal 3H5 anti-DENV2 (ATCC) por 1h a 37°C, nas diluições 1:1500

e 1:500, respectivamente. A monocada de células foi então lavada por 3 vezes com tampão fosfato 0,1M e em seguida incubadas com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína (Southern Biothechnology). As lâminas foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories Inc) e analisadas em microscópio de epifluorescência NIKON ECLIPSE E600.

Em um segundo momento, células BHK-21 foram transfectadas com as construções pE1D1, pE1D3, pE1D4 e controle pcTPA e as proteínas recombinantes foram detectadas em ensaios de imunofluorescência, conforme descrito acima. Foram utilizados como anticorpo primário, soros de macacos imunes contra DENV1, DENV3 e YF17D-D4, cedidos pelo Dr. Marcos Freire (LATEV), seguido de anticorpos anti-IgG humano conjugado a fluoresceína (Southern Biothechnology).

3.3.4. Marcação Metabólica e Imunoprecipitação

Para os ensaios de marcação metabólica, garrafas de 25cm² contendo 2 x 10⁵ células BHK-21 foram transfectadas com 2µg dos plasmídeos pE1D2, pE2D2 ou pcTPA, conforme descrito no item 3.3.1. Em um primeiro experimento, após 16 horas de transfecção, as células foram marcadas metabolicamente por 1:30h usando 80µCi/mL de metionina [³⁵S] preparado em meio RPMI 1640 deficiente de metionina (Sigma). Os sobrenadantes das culturas foram então coletados e armazenados a -70° para posterior análise por imunoprecipitação.

Um segundo experimento foi realizado com amostras de células BHK transfectadas com o plasmídeo pE1D2 ou o controle pcTPA; e células Vero infectadas por 48h com vírus quimérico YF17D-D2, controle DENV2 (44/2) ou Mock (somente células), conforme os item 3.3.1. e 3.3.2, respectivamente. As amostras, células BHK-21 transfectadas e células Vero infectadas, foram então marcadas metabolicamente com 80µCi/mL de metionina por 1:30h. Após este pulso, as culturas foram incubadas por 3:30h com meio completo (meio DMEM para células transfectadas e meio 199 para as células infectadas). Os sobrenadantes e os extratos celulares foram coletados e armazenados para posterior uso nos ensaios de imunoprecipitação.

Os sobrenadantes das culturas e extratos celulares foram imunoprecipitados. Primeiramente, as amostras foram incubadas com soro de camundongo normal

(diluído 1:500) por 2h a 4°C, seguido de adição de proteína A (Invitrogen), para a formação de imunocomplexos inespecíficos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5000g/5 min. e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e incubados durante a noite com fluido ascítico anti-DENV2 (diluição 1:400) a 4°C. No dia seguinte, as amostras foram incubadas com a proteína A por 2h a 4°C, centrifugadas 5000g/5 min. e os imunoprecipitados (proteínas recombinantes ou virais + anticorpo + proteína A) foram lavados com os tampões TNT e TN. As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra, incubadas a 95°C por 5 min. e resolvidas em gel SDS-PAGE (12%). Após a eletroforese das amostras, os géis foram secos e expostos ao filme Kodak para visualização das proteínas marcadas radioativamente.

3.4. IMUNIZAÇÕES DE CAMUNDONGOS

Os experimentos com camundongos foram realizados em conformidade com os princípios éticos da experimentação animal e aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (CEUA - L-067/08).

Grupos de camundongos BALB/c (n=10), machos (SPF), com cerca de 4 semanas de idade, foram imunizados com os diferentes protocolos vacinais, envolvendo as vacinas de DNA contra DENV2 construídas por nós e/ou a vacina quimérica YF17D-D2 contra DENV2 (Caufour et al., 2001). As vacinas de DNA foram usadas isoladamente (imunização simples) ou em combinação com o vírus quimérico (sistema de dose e reforço ou simultânea). Os três protocolos empregados foram descritos abaixo e também foram esquematizados na figura 3.1 e nas tabelas 3.2; 3.3 e 3.4.

3.4.1. Imunização simples (DNA/DNA)

Grupos de animais foram imunizados por via intramuscular (i.m.), nos quadríceps posteriores, utilizando seringa de insulina contendo agulha ultrafina 30G. Os animais foram inoculados com uma ou duas doses dos DNAs plasmidiais diluídos em PBS (uma dose = 100µg de DNA diluído em 100µL de PBS por animal, 50µg de DNA, 50µL/pata), mantendo-se um intervalo de duas semanas entre as doses, nos animais que receberam duas imunizações (Tabela 3.2).

Imunização simples DNA/DNA		Desafio i.c.
Dias		
0	15	30
100µg de DNA (i.m.)	100µg de DNA (i.m.)	X

Tabela 3.2: Esquema de imunização e desafio letal com DENV2. Imunização simples consiste de duas doses de DNA plasmidial mantendo-se um intervalo de duas semanas entre as doses. O desafio i.c. com DENV2 foi administrado duas semanas após a última imunização.

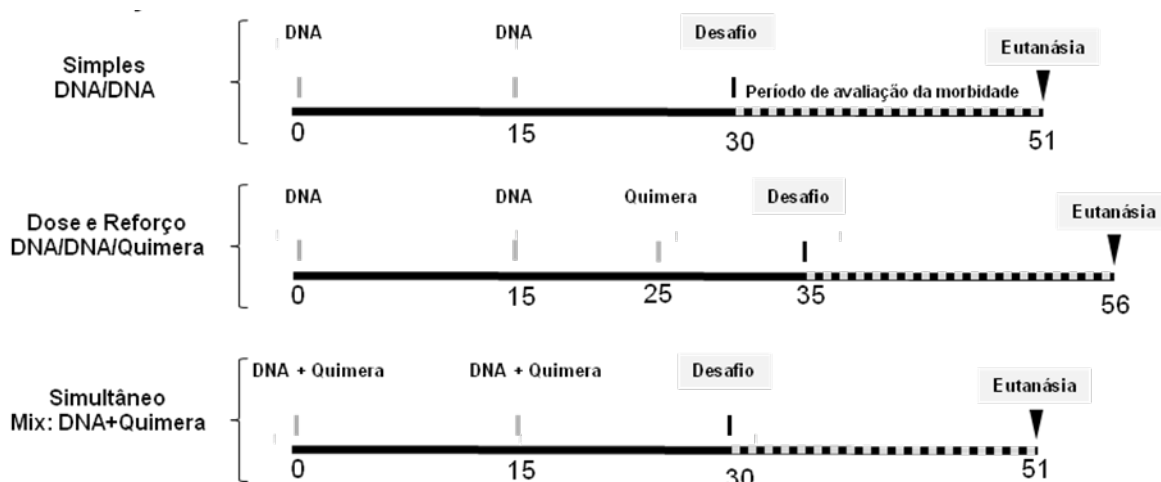


Figura 3.1: Esquemas de imunizações e desafios.

3.4.2. Imunização combinada: DNA plasmidial + Quimera

3.4.2.1. Sistema de dose/reforço (DNA/DNA/Quimera)

Os camundongos foram inoculados com uma ou duas doses das vacinas de DNA, como descrito acima. Dez dias após a última dose de DNA, os animais foram inoculados por via subcutânea (s.c.) usando seringa de insulina com uma dose de 10^5 PFU de vírus quimérico YF17D-D2, nos coxins plantares das patas posteriores. O inóculo da quimera YF17D-D2 foi preparado diluindo-se dez vezes o estoque viral (10^6 PFU/mL) em 100µL de meio 199 completo, sendo inoculados 50µL em cada coxim plantar (Tabela 3.3).

Um grupo de animais participou de um protocolo vacinal invertido (Quimera/DNA/DNA). Neste caso, os camundongos foram imunizados com uma

dose de vírus quimérico YF17D-D2 (10^5 PFU), seguido de duas doses (100µg/dose) de DNA (vacina pE1D2) administradas 15 e 25 dias após a inoculação com vírus YF17D-D2 (Tabela 3.3).

Imunização combinada: dose/reforço			Desafio i.c.	
Dias				
0	15	25	30	35
100µg de pE1D2 (i.m.)	10^5 PFU de YF17D-D2 (s.c.)	-	X	-
100µg de pE1D2 (i.m.)	100µg de pE1D2 (i.m.)	10^5 PFU de YF17D-D2 (s.c.)	-	X
10^5 PFU de YF17D-D2 (s.c.)	100µg de pE1D2 (i.m.)	100µg de pE1D2 - i.m.	-	X
100µg de pE2D2 (i.m.)	100µg de pE2D2 (i.m.)	10^5 PFU de YF17D-D2 (s.c.)	-	X
100µg de pcTPA (i.m.)	100µg de pcTPA (i.m.)	10^5 PFU de YF17D-D2 (s.c.)	-	X
-	-	10^5 PFU de YF17D-D2 (s.c.)		X

Tabela 3.3: Esquema de imunização e desafio letal com DENV2. Imunização combinada sistema de dose/reforço (vacina de DNA/quimera).

3.4.2.2. Imunização simultânea (Mix: DNA + Quimera):

Grupos de camundongos foram imunizados por via i.m. com uma ou duas doses da mistura de DNA plasmidial + quimera YF17D-D2 (uma dose = 100µg de DNA + 10^5 PFU de YF17D-D2 preparados em 100µL (meio 199). A dose foi administrada no músculo (quadríceps posteriores) dividindo-se 50µL da mistura (DNA + quimera) para cada pata. Nos grupos de animais inoculados com duas doses, as imunizações foram administradas com intervalo de duas semanas (Tabela 3.4).

Outro grupo de animais também foi inoculado com duas doses da vacina de DNA e vírus quimérico simultaneamente, porém administrados em vias independentes. O DNA foi inoculado por via i.m. (100µg/dose, 50µL/pata) e o vírus YF17D-D2 foi administrado por via subcutânea (s.c.) com uma dose de 10^5 PFU/100µL (50µL/coxim plantar) (Tabela 3.4).

Imunização simultânea: DNA + Quimera		Desafio i.c.
Dia 0	Dia 15	Dia 30
Mix: 100µg de pE1D2 + 10 ⁵ PFU de YF17D-D2 (i.m.)	-	X
Mix: 100µg de pE1D2 + 10 ⁵ PFU de YF17D-D2 (i.m.)	Mix: 100µg de pE1D2 + 10 ⁵ PFU de YF17D-D2 (i.m.)	X
Simultânea: 100µg de pE1D2 (i.m.) + 10 ⁵ PFU de YF17D-D2 (s.c.)	Simultânea: 100µg de pE1D2 (i.m.) + 10 ⁵ PFU de YF17D-D2 (s.c.)	X
Mix: 100µg de pE2D2 + 10 ⁵ PFU de YF17D-D2 (i.m.)	Mix: 100µg de pE2D2 + 10 ⁵ PFU de YF17D-D2 (i.m.)	X

Tabela 3.4: Esquema de imunização e desafio letal com DENV2. Imunização simultânea (vacina de DNA + quimera).

3.5. DESAFIOS COM DENV2

Camundongos imunizados com os diferentes protocolos de imunização foram desafiados com DENV2 (NGC), adaptado em cérebros de camundongos neonatos, 15 ou 10 dias após a última dose vacinal administrada segundo o esquema da figura 3.1. Para isto, os camundongos imunizados e controles foram anestesiados com Quetamina e Xilasina e desafiados por via i.c. com 4.32 log₁₀ PFU de DENV2 em 30µL de meio 199 com sais de Earle, que corresponde a uma dose letal de 3.8 LD₅₀. O inóculo foi titulado em monocamadas de células Vero, logo após o desafio.

Os animais foram monitorados durante 21 dias após o desafio quanto à mortalidade e morbidade (caracterizada por paralisia dos membros inferiores, alterações na coluna vertebral e morte). A morbidade foi quantificada em uma escala subjetiva de 0 a 3 (grau 0 = ausência de sinais clínicos; grau 1 = paralisia em uma das patas ou alteração da coluna vertebral; grau 2 = paralisia severa em uma das patas e alteração da coluna vertebral ou paralisias severas em ambas as patas traseiras; grau 3 = paralisia severa nas duas patas traseiras e coluna vertebral deformada ou morte).

3.6. ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE

3.6.1. Análise dos níveis de anticorpos neutralizantes por ensaios de redução de placas (PRNT_{50%})

Amostras de sangue de animais vacinados com os vários protocolos de imunização ou controles foram coletadas antes e 21 dias após o desafio com

DENV2. Para a coleta do sangue 24h antes do desafio, os animais foram anestesiados com uma gota de cloridrato de proximetacaína 0,5% (Alcon) e sangrados por via retroorbital com auxílio de pipeta Pasteur. Para a coleta do sangue dos animais que sobreviveram ao desafio com DENV2, os camundongos foram eutanasiados com Quetamina e Xilasina e sangrados por punção cardíaca. Todas as amostras de sangue obtidas foram processadas (5000g/5min) para a obtenção dos soros, que foram armazenados a -70°C até o uso. Antes dos ensaios de PRNT os soros foram descongelados e aquecidos a 56°C por 30 min. para inativação do complemento.

Os ensaios de PRNT foram realizados em células Vero, utilizando placas de 96 poços (Corning), como descrito previamente por Stefano e colaboradores (1999). Os soros foram diluídos seriadamente em 50µL de meio 199 (fator de diluição 2), a partir de 1:5 até 1:640 (limite máximo de detecção determinado pelo nosso teste). Em seguida, foram adicionados 50µL de meio 199 contendo aproximadamente 30 PFU de DENV2 (44/2) em cada poço. A placa foi incubada por 1h a 37°C. Após este período, 50µL de suspensão de células Vero contendo $2,5 \times 10^4$ células, preparadas em meio 199, foram distribuídos por toda placa, sendo esta incubada por mais 3h a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de meio semi-sólido (meio 199 + 3% de carboximetilcelulose) foi adicionado em cada poço. As placas foram incubadas por 7 dias a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Logo após este período as monocamadas de células foram fixadas com solução de formalina a 10% e coradas com cristal violeta a 0,02%. As placas de lise foram contadas manualmente e os títulos de anticorpos neutralizantes foram calculados tomando-se como base a maior diluição do soro capaz de reduzir em 50% o número de placas de lise (PRNT_{50%}), comparadas com o grupo controle (Vero infectadas com vírus DENV2 (44/2)).

3.6.2. Análise da resposta celular

3.6.2.1. Quantificação de células produtoras de IFN-γ através de ensaios de ELISPOT

Os ensaios de ELISPOT foram realizados em grupos de camundongos imunizados (n = 5) através de três diferentes protocolos de vacinação utilizando as vacinas pE1D2 e YF17D-D2, conforme descrito no item 3.4. Amostras de células isoladas do baço de camundongos vacinados e controles foram analisadas em

triplicatas com o Kit BD ELISPOT IFN- γ Mouse gama-Set (BD ELISPOT), conforme as recomendações do fabricante. Para isto, placas de 96 poços (Millipore, Bedford) foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de camundongo (10 μ g/mL, 50 μ L/poço) a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas (PBS) e bloqueadas com meio RPMI suplementado com 1% SFB (200 μ L/poço) por 2h a 37°C. Os baços de animais imunizados e controles foram coletados 10 dias após a última dose administrada e homogeneizados em meio RPMI suplementado com 10% SFB, hemácias foram lisadas e as células viáveis foram contadas, utilizando o corante vital azul de Trypan (Invitrogen). As placas, previamente bloqueadas (RPMI 1% SFB) receberam 100 μ L/poço de suspensão celular (2 x 10⁶ células/mL). Além disso, foram adicionados mais 100 μ L/poço de meio RPMI com 10 μ g/mL do peptídeo sintético SPCKIPFEI (Invitrogen) contido na proteína E de DENV2 (Rothman *et al.*, 1996) ou 4 μ g/mL de concanavalina A (controle positivo). As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO². Após este período, as placas foram lavadas, incubadas com anticorpo de detecção anti-IFN- γ biotilado (10 μ g/mL, 100 μ L/poço) por 2h, novamente lavadas e incubadas com estreptavidina/peroxidase (diluição 1:1000) por 1h. Finalmente, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e reveladas por 20 min. com a adição do substrato AEC (BD/Pharmingen) e peróxido de hidrogênio (Sigma). A reação foi interrompida com a lavagem da placa em água corrente. Os *spots* foram contados no leitor automatizado Immunospot (AMBRIEX, Cellular Technology Ltd., Cleveland, OH), com o programa versão 3 da Plataforma de ELISPOT do PDTIS/FIOCRUZ/RJ, de acordo com Lima-Junior e colaboradores (2008).

3.6.2.2. Citometria de Fluxo

Células mononucleares obtidas do baço de animais vacinados foram analisadas por citometria de fluxo. As células de cada grupo experimental foram agrupadas e bloqueadas com solução de bloqueio PBS/BSA por 30 min. Em seguida, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos: CD4-PE diluído 1:400; CD8-PERCP diluído 1:50 e CD62L-PE/CY7 diluído 1:200, assim como os controles com as respectivas imunoglobulinas específicas diluídas na mesma concentração (BD Pharmingen). Após a marcação, as células foram lavadas em

PBS e fixadas em paraformaldeído 1%. As células marcadas foram analisadas no citômetro Beckmman Coulter Cyan da Plataforma da FIOCRUZ.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (La Jolla, EUA), versão 5.02. Para a análise das taxas de sobrevida e morbidade, as significâncias estatísticas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado, enquanto que as diferenças no grau de morbidade e títulos de PRNT_{50%} foram anvalidados através do teste *Mann-Whitney*. Os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$.

Capítulo 4.

4. RESULTADOS

4.1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES QUE CODIFICAM SEQUÊNCIAS INCOMPLETAS DA PROTEÍNA E DE DENV

Primeiramente foram construídos dois plasmídeos recombinantes o pE1D2 e o pE2D2 (Fig. 4.1a,b). O plasmídeo pE1D2 foi construído com a inserção da sequência que corresponde ao ectodomínio da proteína E de DENV2 (domínios I, II e III) no vetor pcTPA, enquanto que o plasmídeo pE2D2 foi construído com a clonagem da sequência que codifica apenas o domínio III desta proteína. Em ambos os casos, os fragmentos foram clonados “in frame” com a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA, em um único quadro aberto de leitura (Fig. 4.1a,b).

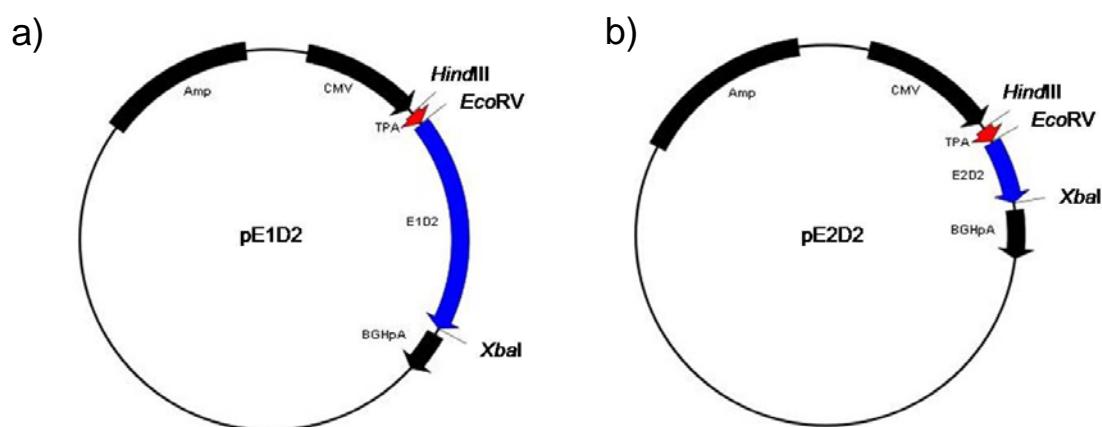


Figura 4.1: Representação esquemática dos plasmídeos recombinantes pE1D2 (a) e pE2D2 (b).

Ambas as sequências incompletas do gene E de DENV (E1D2 e E2D2) foram clonadas à montante a sequência que codifica o peptídeo sinal (t-PA). AMP, gene de resistência à ampicilina; CMV, região promotora derivada do citomegalovírus humano; BGHpA, sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino.

Para confirmar a presença e a posição correta dos insertos nos plasmídeos recombinantes, as construções pE1D2 e pE2D2 foram digeridas com enzimas de restrição específicas, que cortam tanto no inserto quanto no vetor pcTPA. Conforme o esperado, a digestão do pE1D2 com *HindIII* gerou dois fragmentos de 5968pb e 680pb, e a digestão do pE2D2 com *NcoI* produziu fragmentos de 3345pb, 1683pb e 735pb (Fig. 4.2a,b).

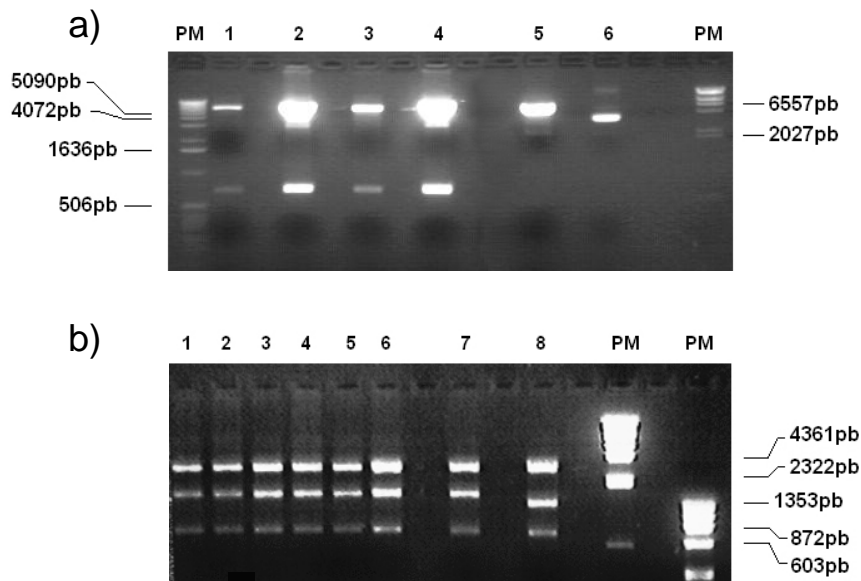


Figura 4.2: Géis de agarose 1% com os plasmídeos recombinantes digeridos com enzimas de restrições específicas. (a) PM - 1Kb Ladder; 1 a 4 - clones de pE1D2 digeridos com a enzima *HindIII*; 5 - pcTPA digerido com *HindIII*; 6 - pcTPA não digerido; PM - λ HindIII; (b) 1 a 7 - clones de pE2D2 digeridos com *NcoI*; 8 - pcTPA digerido com *NcoI*; PM - λ HindIII; PM - ϕ X174 / *HaeIII*.

Além disso, as enzimas *EcoRV* e *XbaI* usadas na clonagem digeriram corretamente os plasmídeos recombinantes pE1D2 e pE2D2, liberando insertos com pesos moleculares esperados (1194pb e 309pb), respectivamente (Fig. 4.3).

Essas vacinas de DNA foram sequenciadas, confirmando a inserção correta dos fragmentos heterólogos, com ausência de mutações e em quadro aberto de leitura com a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA.

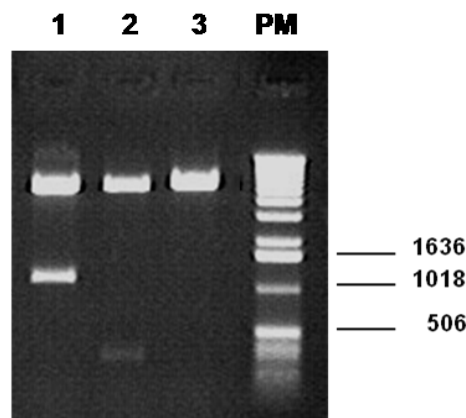


Figura 4.3: Gel de agarose 1% com os plasmídeos recombinantes digeridos com enzimas de restrições *EcoRV* e *XbaI*. Linhas, 1- pE1D2; 2- pE2D2; 3 pcTPA; PM – 1Kb ladder.

4.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO *IN VITRO* DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.2.1. Imunofluorescência

A expressão *in vitro* das proteínas recombinantes foi analisada em células BHK-21 transfectadas com os plasmídeos pE1D2 e pE2D2, bem como com o plasmídeo controle pcTPA. As células foram incubadas com fluido ascítico anti-DENV2, que reconhece vários epítomos presente na proteína E de DENV2, e com anti-IgG de camundongo conjugado à fluoresceína. Os resultados revelaram intensa marcação das proteínas recombinantes no citoplasma de células transfectadas, tanto com o plasmídeo pE1D2 quanto com o plasmídeo pE2D2 (4.4a,b). Além disso, tais proteínas também foram detectadas no citoplasma das células transfectadas quando o anticorpo monoclonal 3H5, que reconhece um epítipo neutralizante localizado no domínio III da proteína E, foi utilizado (Fig. 4.4d,e). Como esperado, não foi detectada marcação positiva nas células transfectadas com o plasmídeo controle pcTPA, utilizando estes mesmos anticorpos (Figuras 4.4c,f).

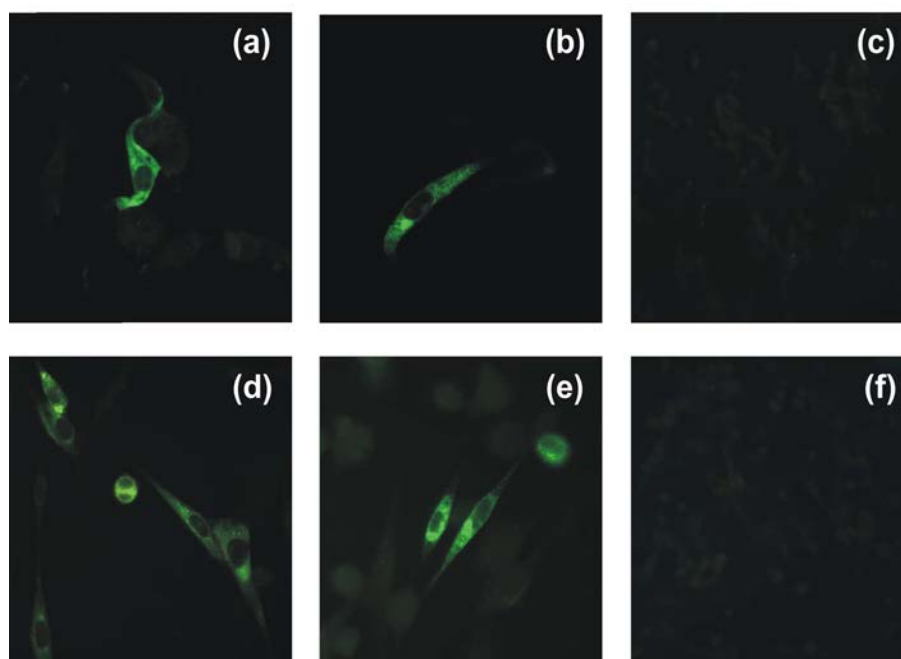


Figura 4.4: A análise da expressão *in vitro* de proteínas recombinantes. Células BHK foram transfectadas com plasmídeos pE1D2 (a, d), pE2D2 (b, e) e pcTPA (c, f). As células foram incubadas com fluido ascítico anti-DENV2 (a-c) ou o anticorpo monoclonal 3H5 anti-DENV2 (d-f). Ampliação 1000x (a, b, d, e) e 400x (c, f).

4.2.2. Imunoprecipitação de proteínas recombinantes

Células transfectadas com os plasmídeos pE1D2, pE2D2 ou pcTPA (controle) foram marcadas metabolicamente com metionina radioativa. Os sobrenadantes dessas culturas foram coletados após um pulso de 1:30h e as proteínas recombinantes marcadas radioativamente foram imunoprecipitadas utilizando fluido ascítico, que reconhece proteínas gerais de DENV2, e proteína A Sepharose. As proteínas recombinantes presentes nos sobrenadantes de células transfectadas com os plasmídeos pE1D2 e pE2D2 apresentaram peso molecular esperado, aproximadamente 44 KDa e 12 KDa, respectivamente. Como esperado, não houve marcação específica no sobrenadante de células transfectadas com o plasmídeo controle (Fig. 4.5).

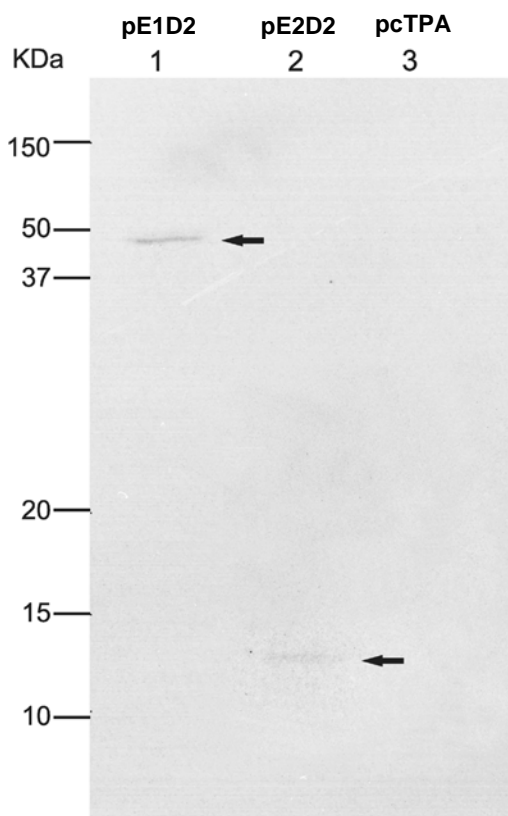


Figura 4.5: SDS-PAGE com as proteínas recombinantes secretadas por células BHK transfectadas com os plasmídeos pE1D2, pE2D2 ou pcTPA. As células foram marcadas metabolicamente com metionina [³⁵S] e os sobrenadantes das culturas (1:30h de incubação) foram coletados e imunoprecipitados com fluído ascítico anti-DENV2 + proteína A. Linhas 1-3 sobrenadantes das células transfectadas com pE1D2 (1); pE2D2 (2) e pcTPA (3). As setas indicam as proteínas recombinantes com PM esperado.

Adicionalmente, foi realizado um outro experimento de imunoprecipitação envolvendo amostras de células transfectadas com o plasmídeo pE1D2 e o plasmídeo controle pcTPA, além de células Vero infectadas com os vírus quimérico (YF17D-D2) e DENV2 (44/2), bem como células Vero não infectadas (Mock). Este experimento difere do primeiro no que se refere ao tempo de coleta do sobrenadante. Primeiramente foi dado um pulso de 1:30h com meio contendo metionina radioativa nas culturas celulares. Ao final deste período o meio de cultura foi trocado por um meio sem aminoácidos marcados com radioatividade e as células foram incubadas por mais 3:30h. Os sobrenadantes e os extratos foram coletados e imunoprecipitados isoladamente com fluido ascítico anti-DENV2 e proteína A, conforme descrito previamente (Fig. 4.6).

A proteína recombinante, que corresponde ao ectodomínio da proteína E de DENV2 (PM ~ 44 KDa), foi detectada no sobrenadante e no extrato de células transfectadas com o plasmídeo pE1D2. Como esperado, não foram detectadas marcações específicas nas células transfectadas com o plasmídeo controle pcTPA (Fig. 4.6). A proteína E de DENV2 (PM ~ 55 KDa) foi detectada no sobrenadante e no extrato de células Vero infectadas com a quimera YF 17D-D2, apresentando peso molecular esperado (Fig. 4.6). A proteína prM de DENV2 (PM 19-26 KDa) também foi observada no extrato dessas células infectadas com o vírus quimérico (Fig. 4.6b). Além disso, algumas proteínas não estruturais de FA foram detectadas nos extratos de células infectadas com a quimera FA/dengue, como a NS1 (PM 45-48 KDa), NS3 (PM ~ 70 KDa) e NS5 (PM ~ 105 KDa), embora fracamente quando comparadas às marcadas no extrato de células infectadas com DENV2-44/2 (Fig. 4.6b). Como esperado, células não infectadas (Mock) não apresentaram marcações específicas (Fig. 4.6).

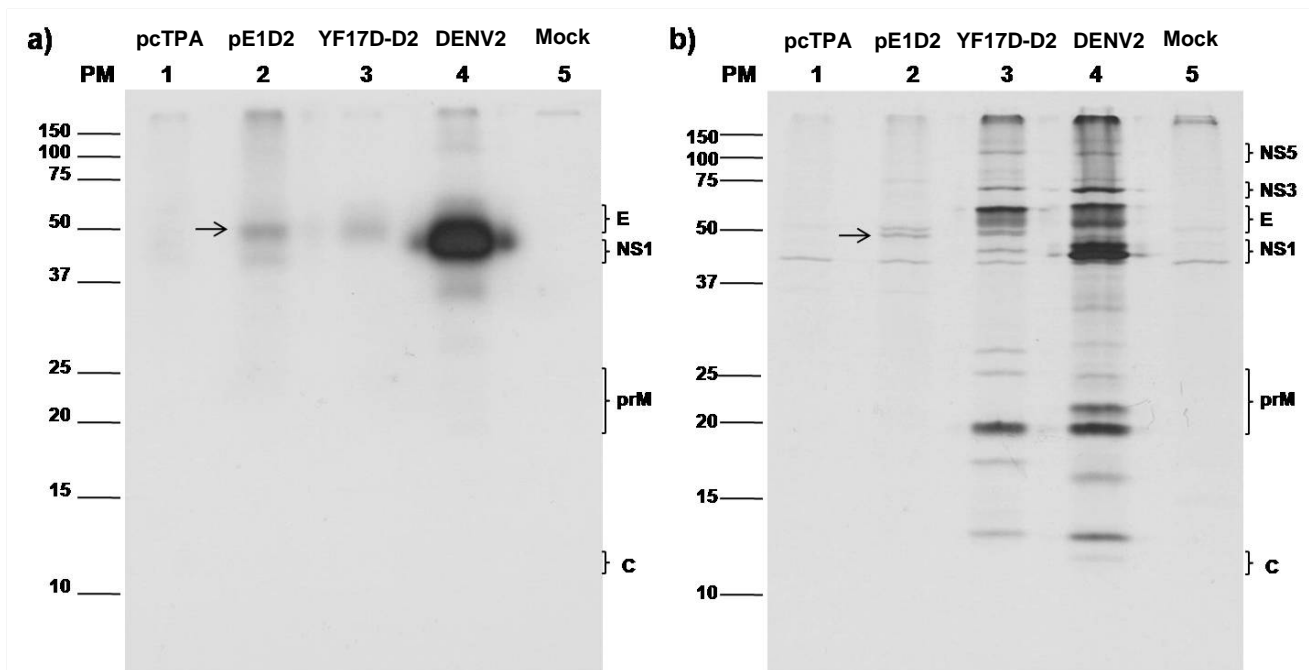


Figura 4.6: SDS-PAGE de proteínas recombinantes e virais marcadas metabolicamente com metionina [³⁵S] e imunoprecipitadas com fluido ascítico anti-DENV2. (a) Sobrenadante das culturas, (b) extratos celulares. Linhas: 1 células transfectadas com pcTPA; 2 células transfectadas com pE1D2; 3 células infectadas com vírus quimérico YF17D-D2; 4 células infectadas com vírus DENV2 44/2; 5 mock.

4.3. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA PELAS VACINAS DE DNA (IMUNIZAÇÃO SIMPLES: DNA/DNA) PE1D2 OU PE2D2 EM CAMUNDONGOS BALB/C

Grupos de camundongos Balb/c foram imunizados por via i.m. com duas doses de DNA plasmidial (pE1D2 ou pE2D2), e desafiados por inoculação intracerebral com uma dose letal DENV2 NGC. Além disso, grupos de animais controles (não vacinados ou inoculados com o vetor pcTPA) também foram desafiados com DENV2. Os animais desafiados foram monitorados diariamente durante 21 dias quanto ao desenvolvimento de paralisia dos membros posteriores, alterações na coluna vertebral e morte. Os dados descritos a seguir e resumidos nas Figuras 4.7 e 4.8 referem-se a dois experimentos de desafio realizados independentemente e nas mesmas condições experimentais (n total = 20 animais).

Todos os animais vacinados com o plasmídeo pE1D2 sobreviveram ao teste de desafio, enquanto que 45% dos animais imunizados com o plasmídeo pE2D2 morreram (Fig. 4.7b). Estas diferenças foram estatisticamente significativas ($p = 0,0027$). Por outro lado, apenas 15% e 10% dos animais dos grupos controles (não

imunizados [Mock] ou inoculadas com o pcTPA, respectivamente) sobreviveram ao desafio (Fig. 4.7b). Os dois grupos de animais vacinados, pE1D2 ou pE2D2, apresentaram diferenças significativas nas taxas de sobrevivência quando comparados aos grupos controles ($p < 0,0001$).

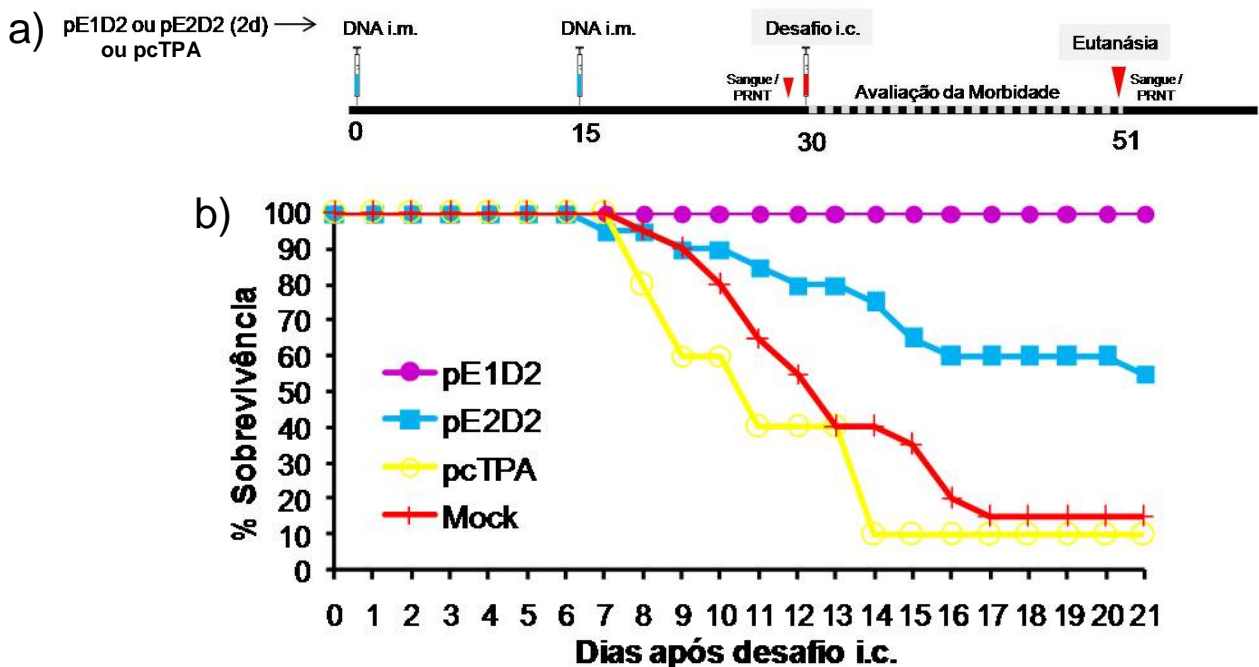


Figura 4.7: Porcentagem de sobrevivência dos camundongos Balb/c imunizados com pE1D2 e pE2D2 e desafiados com DENV2. Em (a) esquema de imunização e desafio. Os camundongos foram imunizados por via i.m. com duas doses de DNA e desafiados quatro semanas após a primeira inoculação do plasmídeo. Os dados representam a compilação de dois experimentos independentes, com grupos de 10 animais em cada teste (b) ($n = 20$).

Além disso, os animais controles apresentaram fortes sinais clínicos da infecção, iniciando no oitavo dia após o desafio e alcançou os níveis máximos de morbidade nos dias seguintes (100% e 90% em camundongos não imunizados ou inoculados com pcTPA, respectivamente) (Fig. 4.8a). Em contra partida, apenas 10% dos camundongos imunizados com a vacina pE1D2 apresentaram morbidade (Fig.4.8a) com menores graus de morbidade (Fig. 4.8b). Por outro lado, 65% dos animais inoculados com pE2D2 mostraram sinais clínicos da infecção, que surgiram entre o sétimo e o décimo segundo dia após a infecção por DENV2 (Fig.4.8a), sendo que 45% destes camundongos apresentaram morbidade alta (grau 3) (Fig. 4.8b). Os grupos de camundongos imunizados com pE1D2 ou pE2D2, quando comparados entre si, apresentaram diferenças estatísticas significativas, tanto nas taxas de

morbidade ($p < 0,0001$), quanto nos graus de gravidade da infecção ($p = 0,0002$) (Fig. 4.8). Entretanto, ambos os grupos de animais vacinados e desafiados com DENV apresentaram graus de morbidade significativamente menores, quando comparados aos graus de gravidade encontrados nos animais controles inoculados com o plasmídeo pcTPA e desafiados ($p < 0,0001$ para o pE1D2 e $p = 0,0051$ para o pE2D2) (Fig. 4.8b).

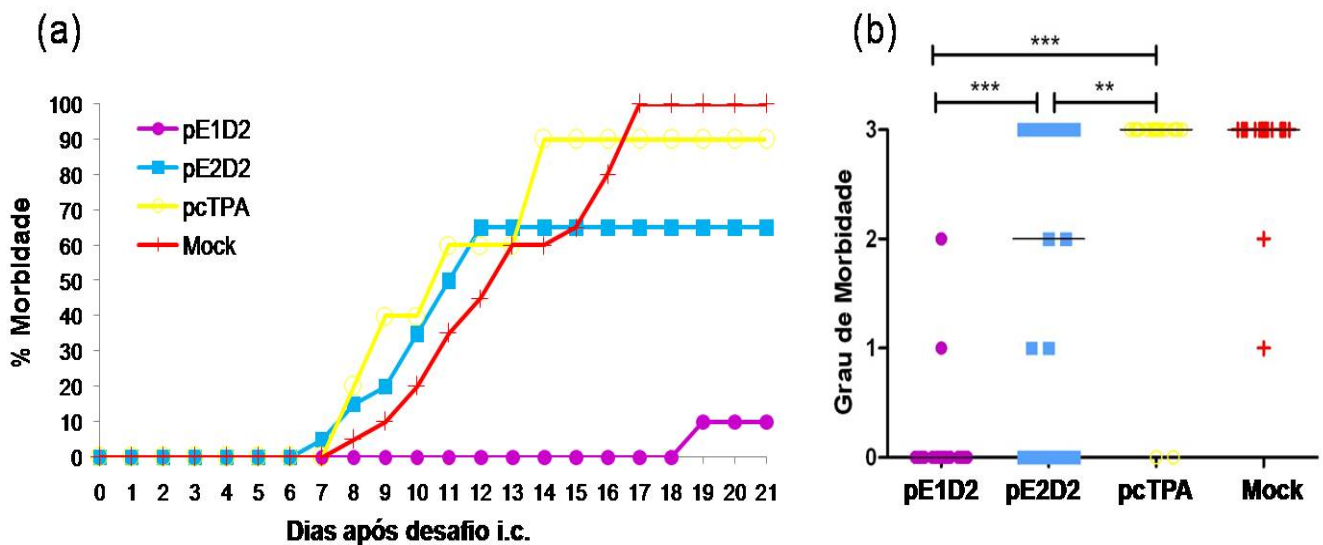


Figura 4.8: Avaliação do percentual (a) e grau (b) de morbidade em camundongos vacinados com pE1D2, pE2D2 e controles após o desafio letal com DENV2. Os animais foram monitorados diariamente quanto o surgimento de sinais clínicos (paralisia das patas traseiras, alterações na coluna vertebral e mortes) (a). A análise semi-quantitativa dos graus de morbidade (b) foram realizadas utilizando uma escala subjetiva de 0 a 3 (0 = ausência de sinais clínicos, grau 1 = paralisia em uma das patas ou alteração da coluna vertebral; grau 2 = paralisia severa em uma das patas e alteração da coluna vertebral ou paralisias severas nas patas traseiras; Grau 3 = paralisia severa nas duas patas traseiras e coluna vertebral deformada ou morte). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os animais vacinados e os camundongos controles inoculados com o plasmídeo pcTPA (*, $p = 0,0051$; **, $p = 0,0002$; ***, $p < 0,0001$). Os dados representam a compilação de dois experimentos independentes, com grupos de 10 animais em cada teste ($n = 20$).

4.3.1. Avaliação da presença de anticorpos neutralizantes no soro de animais imunizados com as vacinas de DNA antes e após o desafio com DENV2

A resposta imune humoral foi avaliada quanto à presença de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos Balb/c imunizados com as vacinas de DNA pE1D2 ou pE2D2, antes e após o desafio letal com DENV2. As amostras de soro de todos os animais vacinados e controles foram coletadas duas semanas após a segunda dose de DNA e 21 dias após a infecção por DENV2, dos animais que sobreviveram ao teste de desafio. O título de anticorpos neutralizantes foi obtido através de ensaios de redução de placas (PRNT_{50%}) utilizando o DENV2 (44/2).

Camundongos imunizados com a vacina pE1D2 apresentaram elevados títulos de anticorpo neutralizantes significativamente maiores quando comparados aos detectados nos animais inoculados o plasmídeo pE2D2 ($p = 0,0029$) (Fig. 4.9b). Além disso, o desafio com o vírus DENV2 NGC induziu um aumento significativo nos níveis de anticorpos neutralizantes nos camundongos imunizados com o plasmídeo pE1D2, em que a maioria (95%) alcançou o título de neutralização máxima medido ($1 \geq 640$) utilizado em nossos testes. Por outro lado, os animais vacinados com o pE2D2 e que sobreviveram ao desafio (11 camundongos) apresentaram uma variação nos títulos de anticorpos neutralizantes após a infecção com DENV2 e apenas seis camundongos (55%) mostraram o título máximo ($1 \geq 640$) (Fig. 4.9b). Como esperado, as amostras de soro pré-imune e soros de camundongos inoculados somente com o vetor pcTPA não apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes detectáveis contra DENV2 (dados não mostrados).

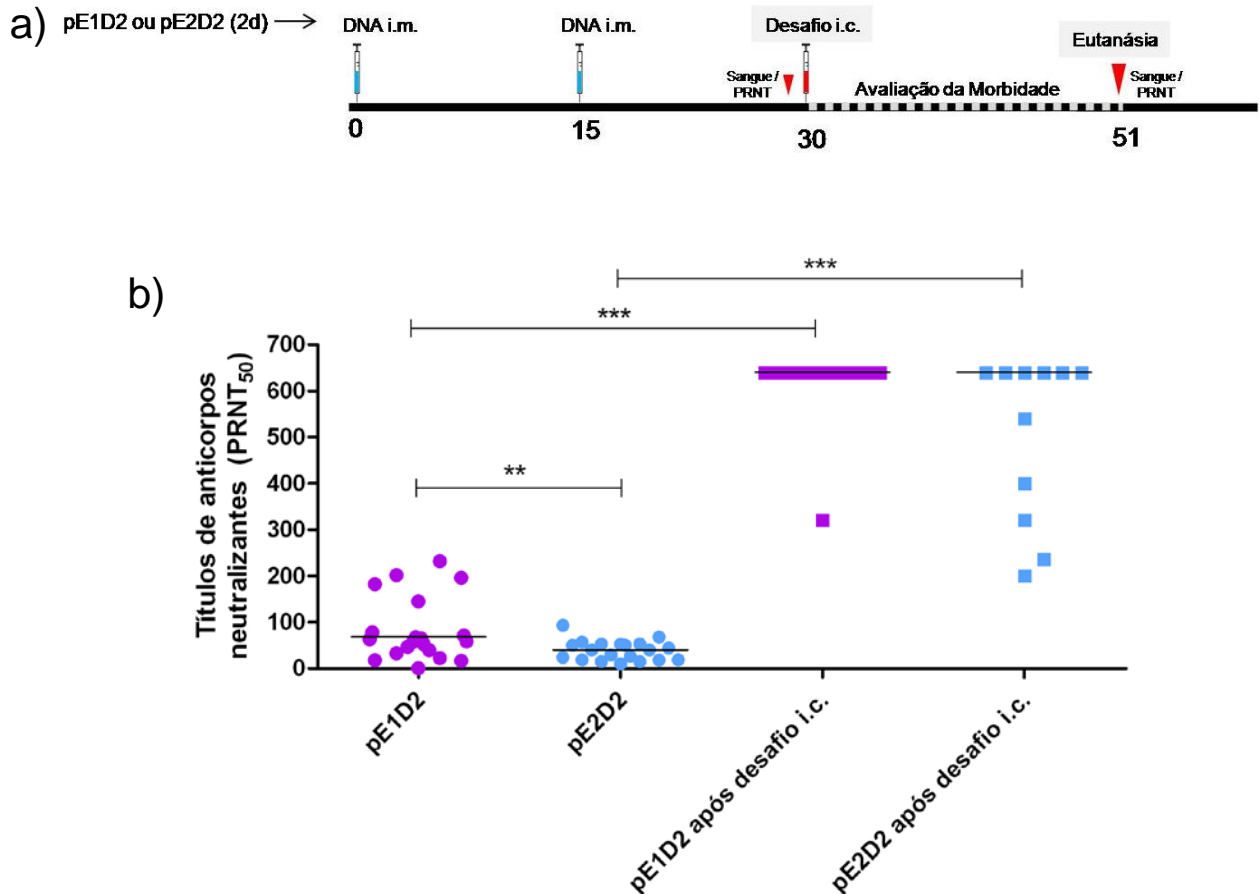


Figura 4.9: Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV2 por ensaios de redução de placas (PRNT_{50%}). Esquema de imunização e coleta de sangue, antes e após o desafio com DENV2 (a); titulação de anticorpos neutralizantes foi realizada em amostras de soro de camundongos imunizados com pE1D2 ou pE2D2 (n = 20) (b). Os asteriscos indicam diferenças que são estatisticamente significativas entre os animais imunizados pE1D2 ou pE2D2 antes do desafio com DENV2 (**, p = 0,0029) ou entre os camundongos vacinados antes e depois do desafio com o vírus (***, p <0,0001).

4.4. EFICÁCIA PROTETORA DA VACINA DE DNA PE1D2 EM TESTES DE IMUNIZAÇÕES COMBINADAS COM O VÍRUS QUIMÉRICO YF17D-D2

Primeiramente foram realizados testes de imunização combinada em um sistema de dose (pE1D2) e reforço (YF17D-D2). Todos os animais vacinados e controles foram desafiados com uma dose letal de DENV2 e avaliados diariamente durante 21 dias após a infecção. Os resultados de sobrevivência e graus de morbidade estão descritos abaixo e resumidos na figura 4.10.

Os grupos de camundongos imunizados com uma ou duas doses da vacina pE1D2 seguido de reforço com a vacina YF17D-D2 ou aquele imunizado com uma

dose de vírus quimérico (YF17D-D2) seguido de duas inoculações com a vacina pE1D2 (protocolo vacinal invertido) apresentaram 100% de sobrevivência frente ao desafio letal com DENV2, semelhante ao observado nos animais que receberam apenas duas doses da vacina de DNA pE1D2 (Fig. 4.10b). A porcentagem de sobrevivência desses grupos vacinados quando comparada a taxa observada nos grupos controles (animais não imunizados ou inoculados com o vetor pcTPA e desafiados) foi estatisticamente significativa ($p < 0.0001$). Os grupos de animais imunizados com uma dose única da vacina pE1D2 ou da vacina YF17D-D2, apresentaram 70% ou 60% de sobrevivência, respectivamente (Fig. 4.10b). Além disso, os animais imunizados com uma dose da quimera também se mostraram significativamente menos protegidos em relação aos camundongos imunizados com a mesma vacina combinada com o plasmídeo pE1D2 (dose/reforço) ($p = 0,0004$) (Fig. 4.10b). Os animais imunizados com duas doses do plasmídeo controle pcTPA seguido de uma dose da vacina YF17D-D2 (pcTPA/quimera) apresentaram 80% de sobrevivência (Fig. 4.10b). Entretanto, 80% desses animais revelaram diferentes graus de morbidade, sendo que a maioria destes (50%) mostrou o grau máximo de morbidade (grau 3) e o restante (30%) apresentou variações entre os graus 1 e 2 (Fig. 4.10c). Em contra partida, os grupos de animais imunizados com protocolos de dose e reforço (DNA/quimera ou quimera/DNA) revelaram uma ausência total de sinais clínicos após a infecção por DENV2 (Fig. 4.10c). Esses resultados foram significativamente diferentes quando comparados aos vários grupos controles (Fig. 4.10c).

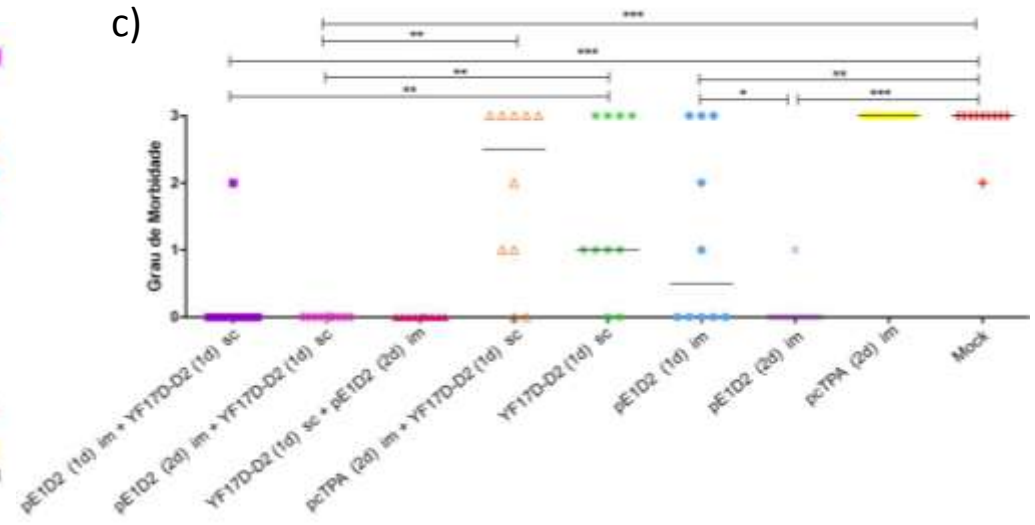
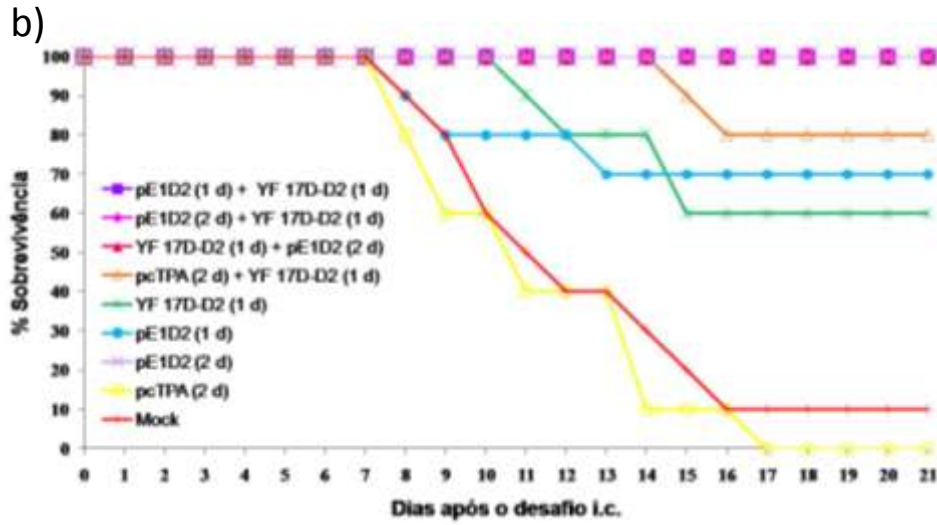
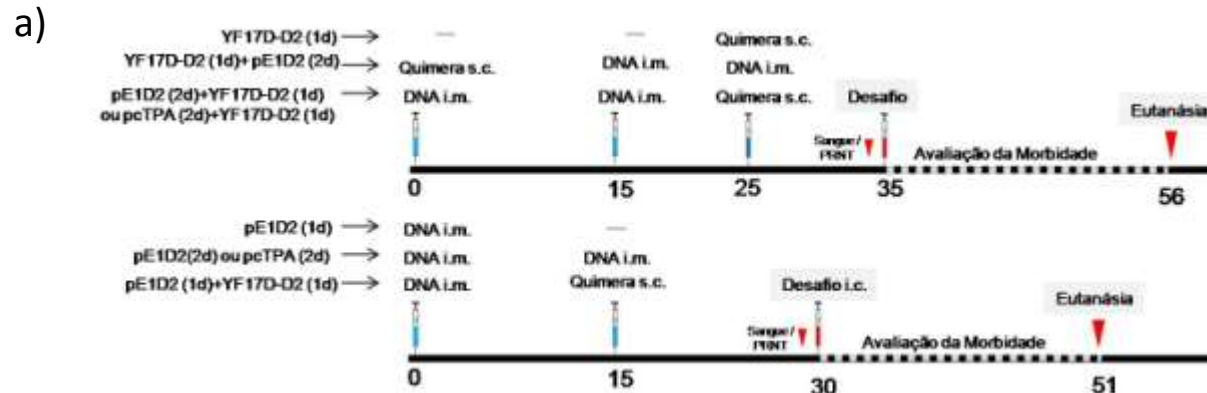


Figura 4.10: Avaliação da proteção induzida pelas vacinas pE1D2 e YF17D-D2 combinadas em um sistema de dose/reforço em camundongos Balb/c frente ao desafio letal com DENV2. Esquema de imunização e desafio (a). A porcentagem de sobrevivência (b) e os graus de morbidade (c) foram avaliados diariamente ao longo de 21 dias nos animais vacinados e controles (n = 10). Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas em (b) (*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,0001).

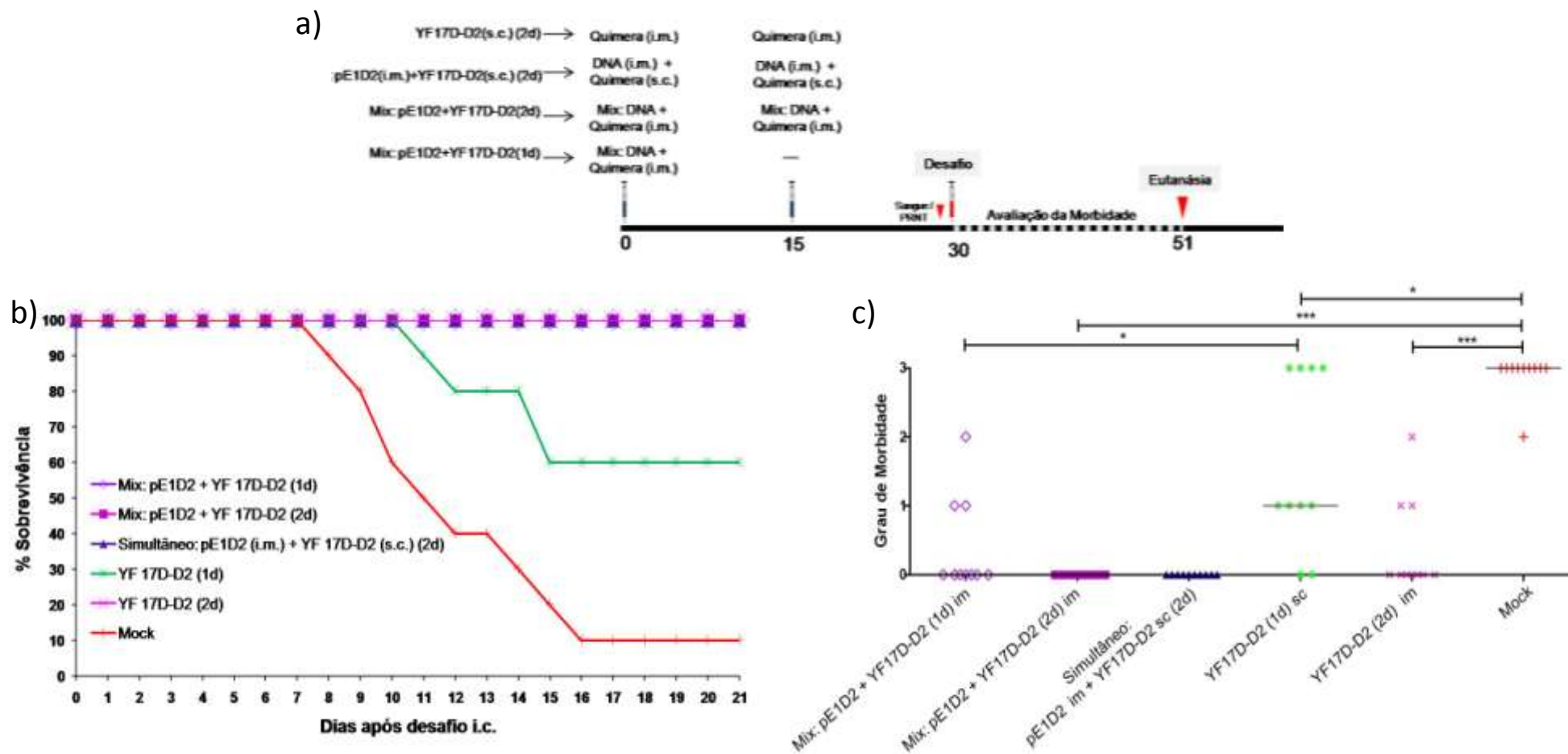


Figura 4.11: Avaliação da proteção induzida pelas vacinas pE1D2 e YF17D-D2 combinadas simultaneamente em camundongos Balb/c frente ao desafio com DENV2. Esquema de imunização e desafio (a). Avaliação da proteção quanto à porcentagem de sobrevivência (b) e graus de morbididade (c). Todos os grupos testados ($n = 10$) foram desafiados por via i.c. com dose letal de DENV2 e em seguida foram acompanhados por 21 para a detecção de sinais clínicos da doença. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas em (b) (*, $p < 0,05$; ***, $p = 0,0002$).

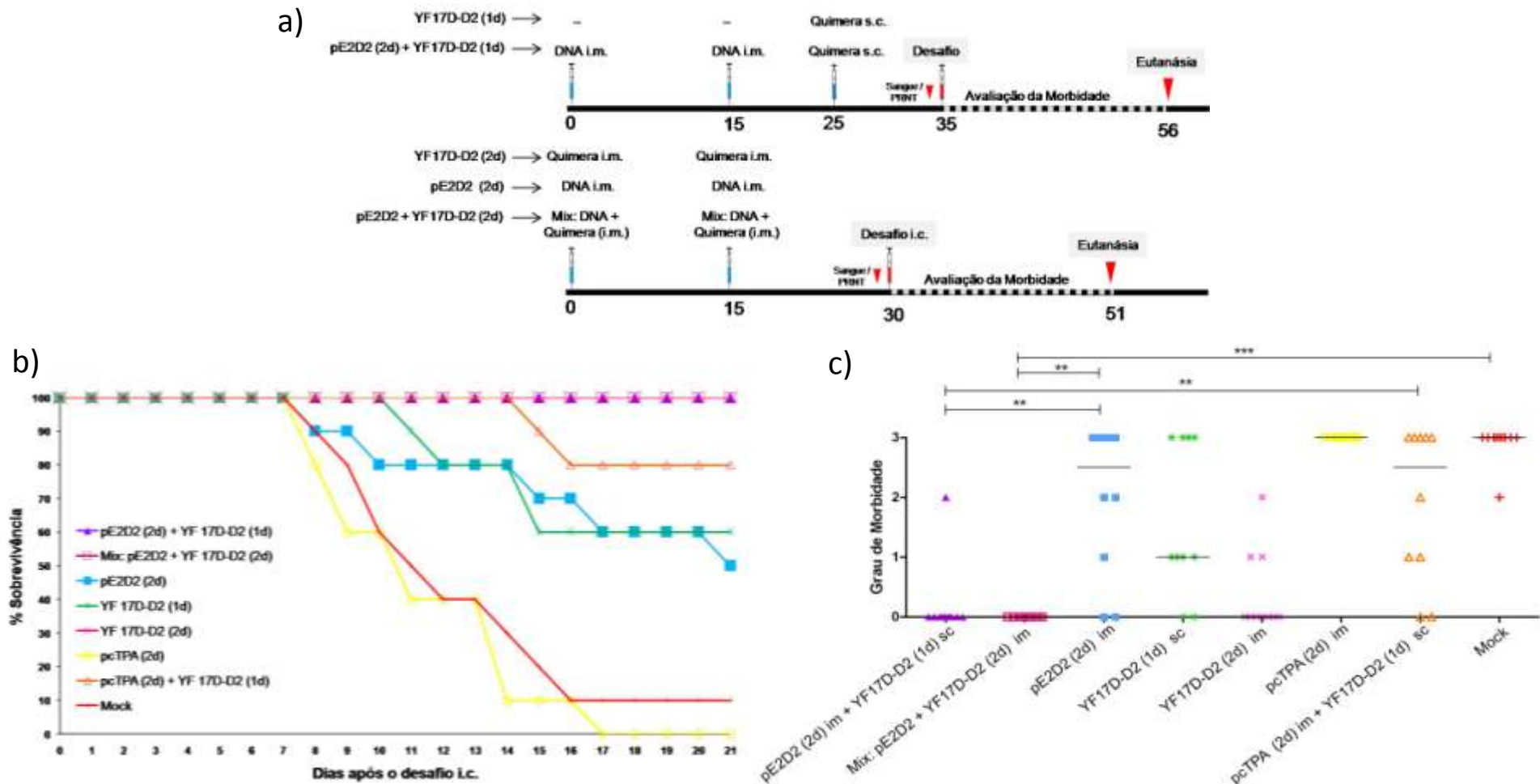


Figura 4.16: Avaliação da proteção quanto à porcentagem de sobrevivência (b) e grau de morbidade (c) nos animais imunizados com a vacina pE2D2 combinada com vírus quimérico YF17D-D2. Em (a) esquema de imunização e desafio. Os animais ($n = 10$) foram imunizados isoladamente com as vacinas pE2D2 ou YF17D-D2 ou combinada no sistema de dose/reforço ou mix. Todos os grupos testados foram desafiados com uma dose letal de DENV2 e avaliados por 21 dias para a detecção de sinais clínicos da infecção, quantificados em uma escala subjetiva de 0 a 3 conforme já descrito. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas em (b) (**, $p < 0,005$); ***, $p = 0,0002$).

Posteriormente, foi testado um novo protocolo de imunização envolvendo as vacinas pE1D2 e YF17D-D2. Estas vacinas foram administradas simultaneamente em um mix: pE1D2 + YF17D-D2 por via i.m., ou pE1D2 administrado por via i.m. e o vírus quimérico YF17D-D2 administrado por via s.c (Fig. 4.11).

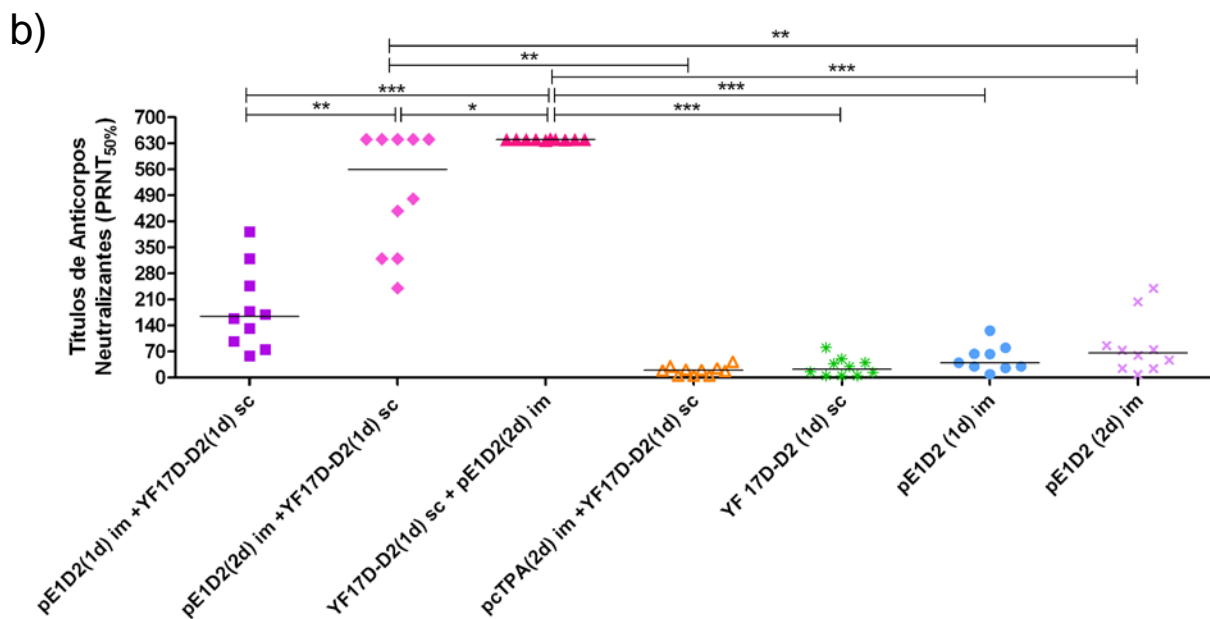
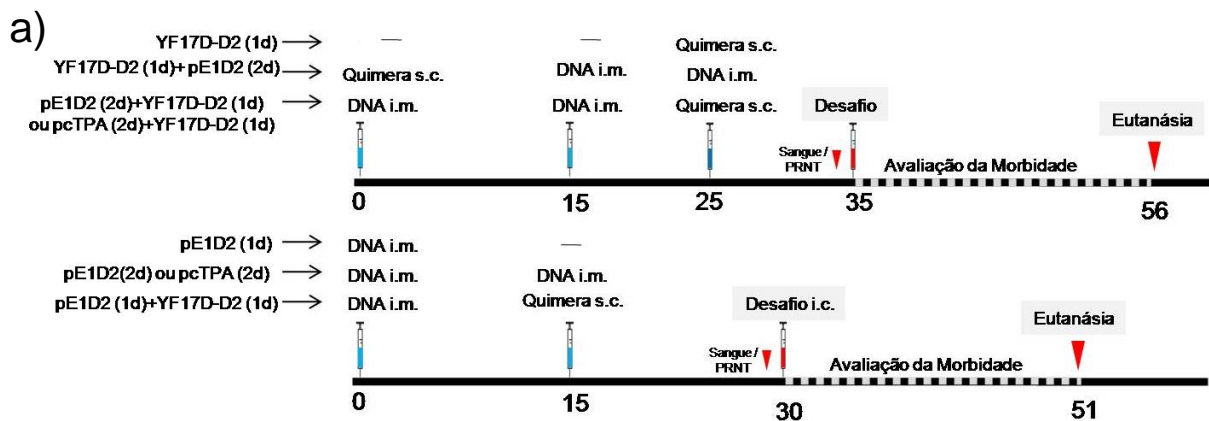
Grupos de animais imunizados com uma ou duas doses do mix (pE1D2 + YF17D-D2) ou inoculados também por via i.m. com duas doses de YF17D-D2, apresentaram 100% de sobrevivência após o desafio com DENV2 (Fig. 4.11b). Nesses quatro grupos a porcentagem de sobrevivência foi estatisticamente significativa ($p = 0,0004$; $p < 0.0001$) quando comparados ao grupos controles, imunizado com uma dose da quimera YF17D-D2 ou não imunizados, respectivamente.

Entretanto, apenas os animais imunizados com duas doses do mix (pE1D2 + YF17D-D2) apresentou ausência total de sinais clínicos da doença após o desafio intracerebral com DENV2, enquanto que 30% dos animais imunizados com 1 dose do mix (pE1D2 + YF17D-D2) ou 2 doses da quimera apresentaram morbidade que variou entre os graus 1 e 2 (Fig.4.11c).

4.4.1. Avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes presente no soro de camundongos vacinados com diferentes protocolos de imunização combinada utilizando as vacinas PE1D2 e YF17D-D2

Os camundongos Balb/c imunizados com a vacina pE1D2 combinada com o vírus quimérico YF17D-D2 e animais controles foram avaliados individualmente quanto aos títulos de anticorpos neutralizantes presente no soro desses animais, coletado 24 horas antes do desafio letal com DENV2. A quantificação dos anticorpos neutralizantes também foi realizada através de ensaios de PRNT, conforme descrito anteriormente e os dados obtidos foram resumidos nas figuras 4.12 e 4.13.

Primeiramente, foram avaliados os animais imunizados com o protocolo vacinal de dose/reforço (Fig. 4.12b). Os camundongos vacinados com duas doses da vacina pE1D2 seguida de reforço YF17D-D2 apresentaram altos títulos de anticorpos neutralizantes no soro, sendo que 50% destes animais alcançaram o título de neutralização máxima ($1 \geq 640$) utilizada em nossos testes e o restante mostraram títulos que variaram de 240 a 480. Todos os camundongos imunizados com o protocolo invertido (uma dose de quimera seguida de duas doses de DNA) apresentaram títulos de neutralização máxima ($1 \geq 640$) que se mostraram significativamente mais elevados ($p < 0,05$) em relação ao grupo imunizado com duas doses DNA e reforço quimera. Já os animais imunizados com uma dose de cada vacina pE1D2/YF17D-D2 apresentaram títulos significativamente menores de anticorpos neutralizantes quando comparados aos grupos imunizados com três doses de (DNA/DNA/quimera) ou de (quimera/DNA/DNA), $p < 0,001$ ou $p = 0.0001$, respectivamente (Fig. 4.12b). Por outro lado, as vacinas combinadas (dose/reforço), independente do número de doses administradas induziram títulos significativamente maiores de anticorpos neutralizantes quando comparados às mesmas vacinas administradas isoladamente ou ao grupo controle (pcTPA/YF 17D-D2) (Fig. 4.12b).



Figuras 4.12: Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV2 presente nos soros de animais imunizados com as vacinas pE1D2 e YF17D-D2 combinadas em um sistema de dose/reforço (b). Em (a) esquema de imunização e desafio. A titulação de anticorpos neutralizantes foi realizada por PRNT nas amostras de soro dos camundongos imunizados e controles (n = 10) coletadas 24 horas antes do desafio letal com DENV2. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas *, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$; ***, $p = 0,0001$).

Adicionalmente, 90% dos animais imunizados com duas doses do mix (pE1D2 + YF17D-D2) apresentaram altos títulos de anticorpos neutralizantes ($1 \geq 640$), significativamente maior ($p = 0,0038$) do que os níveis encontrados nos animais imunizados com duas doses de vírus quimérico YF17D-D2 (Fig. 4.13b). Tais títulos foram significativamente maiores do que os encontrados nos soros de animais imunizados com apenas uma dose do mix ($p = 0,0063$) (Fig. 4.13b). Por outro lado,

uma dose do mix (pE1D2 + YF17D-D2) foi significativamente mais eficiente em induzir uma resposta de anticorpos neutralizantes do que 1 dose da vacina quimérica administrada isoladamente ($p = 0,0071$) (Fig. 4.13b).

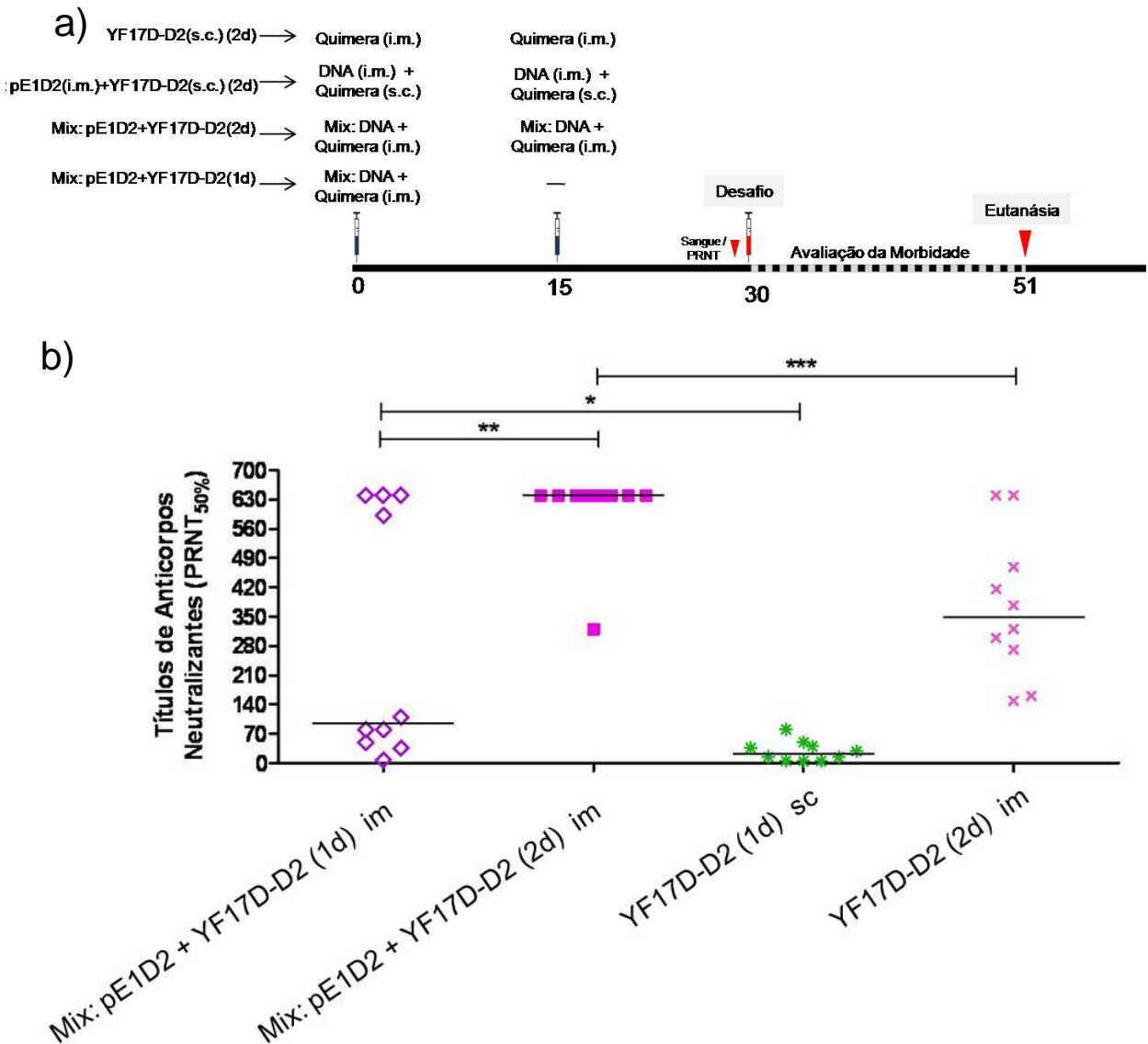


Figura 4.13: Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV2 presente nos soros de animais imunizados simultaneamente (Mix) com as vacinas pE1D2 e YF17D-D2 (b). Em (a) esquema de imunização e desafio. As amostras de soro de camundongos imunizados e controles ($n = 10$) foram coletadas 24 horas antes do desafio letal com DENV2 e avaliadas nos ensaios de PRNT. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (*, $p = 0,0071$; **, $p = 0,0063$; ***, $p = 0,0038$).

4.4.2. Avaliação da resposta imune celular quanto à produção de IFN- γ induzida nos camundongos vacinados com os diferentes esquemas de imunização

Como demonstrado previamente, a vacina de DNA pE1D2 administrada em camundongos Balb/c, isoladamente ou em combinação (dose/reforço ou mix) com o vírus quimérico YF17D-D2, foi capaz de induzir uma resposta imune humoral com a presença de anticorpos neutralizantes específicos e gerar 100% de proteção nos animais imunizados e desafiados por via i.c. com dose letal de DENV2 NGC. Sendo assim, com o objetivo de avaliar a resposta imune celular, especificamente quanto à presença de células TCD8⁺ secretoras de IFN- γ , grupos de camundongos foram vacinados, utilizando os protocolos de imunização simples ou combinada conforme descrito no item 3.4.

Esplenócitos dos camundongos coletados dez dias após a última inoculação foram incubados com o peptídeo sintético SPCKIPFEI, que compreende um epítipo presente na proteína E de DENV2 responsável por ativar células TCD8⁺ antígeno específicas. Tal ativação foi avaliada quanto à produção de IFN- γ por células formadoras de *spots* em ensaios de ELISPOT. As amostras de células obtidas do baço de animais imunizados com duas doses da vacina pE1D2 foram reativas ao peptídeo SPCKIPFEI e secretaram IFN- γ , (SFC: 187 ± 136 , os valores correspondem a média e o desvio padrão, respectivamente) (Fig. 4.14a). Como esperado, as células obtidas de animais inoculados com o plasmídeo controle pcTPA reagiram fracamente ao mesmo peptídeo testado (SFC: 8 ± 2 ; $p = 0,0079$) (Fig. 4.14a). Adicionalmente, esplenócitos obtidos de animais imunizados com as vacinas pE1D2 e YF17D-D2 combinadas em um sistema de dose e reforço ou em imunizações simultâneas (mix) também reagiram especificamente contra o epítipo da proteína E com produção de IFN- γ (SFC: 228 ± 116 e 135 ± 133 , respectivamente) (Fig. 4.14a).

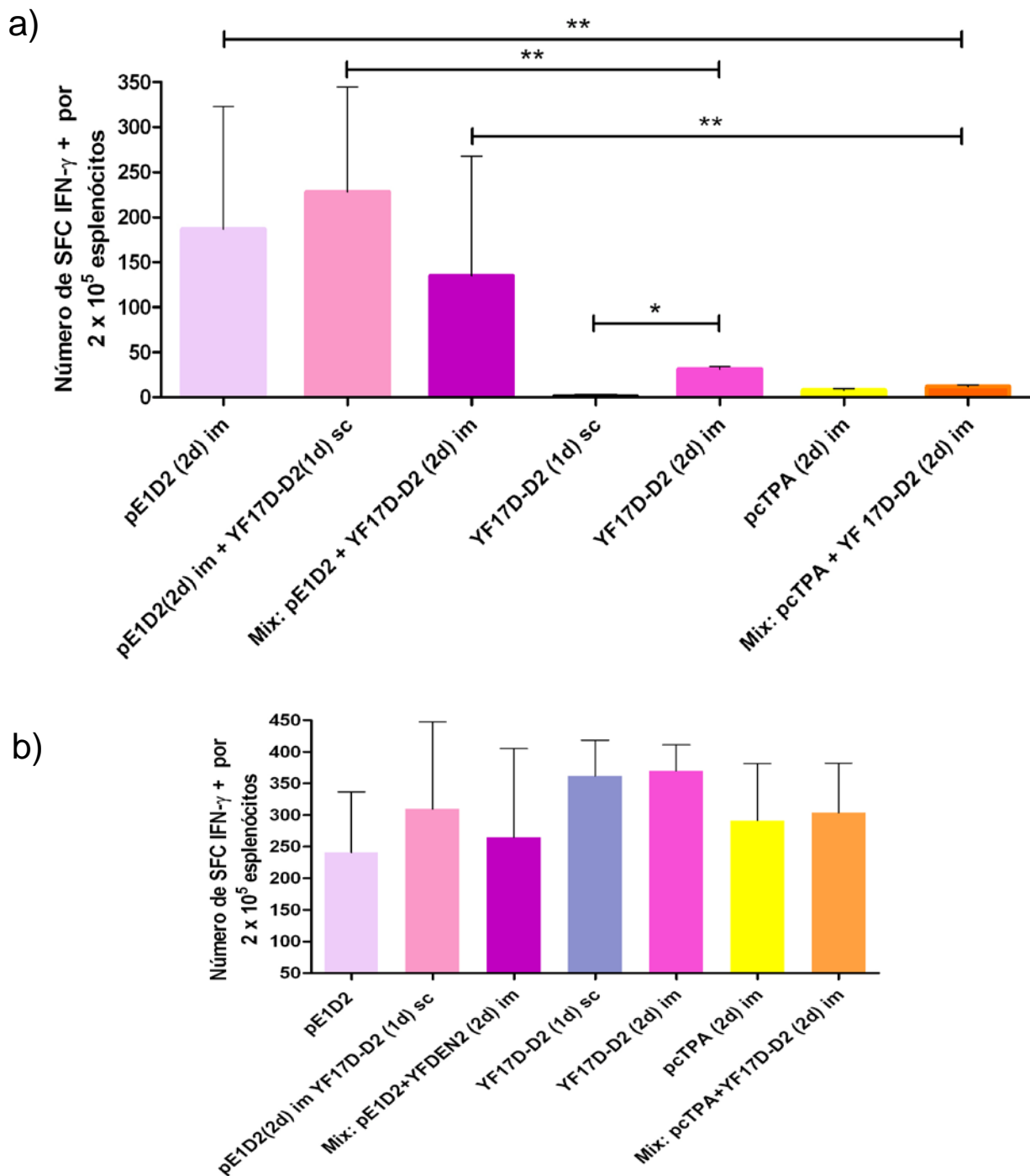


Figura 4.14: Produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos vacinados utilizando o peptídeo SPCKIPFEI (epítipo presente na proteína E de DENV2) como antígeno estimulante (a) ou concanavalina A (ConA) como controle positivo (b). O baço dos animais vacinados e controles ($n = 5$) foi coletado 10 dias após a última imunização e processados individualmente. Os esplenócitos foram incubados em triplicata com o peptídeo sintético SPCKIPFEI (específico para TCD8+). Os resultados representam o número de spots produzidos por SFC em 2×10^5 células. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (*, $p = 0,0119$; **, $p = 0,0079$).

Não foram encontradas diferenças estatísticas quanto a produção de SFC/IFN- γ entre os grupos imunizados com a vacina de DNA pE1D2 em imunização simples ou combinada com o vírus quimérico, embora todos tenham apresentado números de SFC mais elevados em relação aos grupos controles (pcTPA ou mix pcTPA+ YF17D-D2, $p = 0,0079$) (Fig. 4.14a). Por outro lado, o esquema de dose/reforço induziu significativamente mais SFC/IFN- γ ($p = 0,0079$) do que o grupo imunizado com duas doses da vacina quimérica YF17D-D2 (SFC: 31 ± 3) (Fig. 4.14a). Os animais imunizados com duas doses da vacina quimérica (YF17D-D2) apresentaram um número maior de SFC/IFN- γ quando comparado ao grupo vacinado com apenas uma dose da quimera (dados significativos $p = 0,0119$) (Fig. 4.14a). Os esplenócitos de todos os animais responderam inespecificamente com produção de SFC/IFN+ na presença da ConA, sem diferenças significativas entre os grupos, demonstrando a viabilidade das células durante o experimento (Fig. 4.14b).

4.4.3. Avaliação da expressão do receptor CD62L na superfície de TCD4+ e TCD8+ derivadas do baço de animais vacinados

Esplenócitos coletados dos animais imunizados com as vacinas pE1D2 e YF17D-D2, administradas isoladamente ou combinadas, foram avaliados quanto à presença de células TCD4+ ou TCD8+ com marcação positiva para CD62L. As células foram agrupadas pelas diferentes imunizações e incubadas com anticorpos específicos anti-CD4+, anti-CD8+ e anti-CD62L+ conjugados a diferentes fluoróforos. Os animais vacinados com duas doses do vírus quimérico YF17D-D2 apresentaram aproximadamente 35% de TCD4+ e 26% de TCD8+ com marcação positiva para CD62L (Fig. 4.15). Por outro lado, os animais imunizados com duas doses da vacina de DNA pE1D2 apresentaram um percentual menor de células marcadas com CD62L (aproximadamente 23% de TCD4+ e 12% TCD8+) (Fig. 4.15). As vacinas pE1D2 e YF17D-D2 combinadas (sistema de dose/reforço ou mix), também mostraram um menor número de células TCD4+ ou TCD8+ marcadas com anticorpos anti-CD62L (aproximadamente 20% TCD4+/12% TCD8+ e 25% TCD4+/16% TCD8+, respectivamente) quando comparadas aos animais vacinados apenas com a quimera YF 17D-D2 (Fig. 4.15). Tais dados sugerem uma maior ativação destas células provenientes dos animais imunizados com a vacina de DNA, isolada ou em conjunto, com o vírus quimérico YF17D-D2, quando comparadas às

células dos camundongos inoculados somente com o vírus quimérico, uma vez que o CD62L é um receptor que se perde durante o processo de ativação e divisão celular.

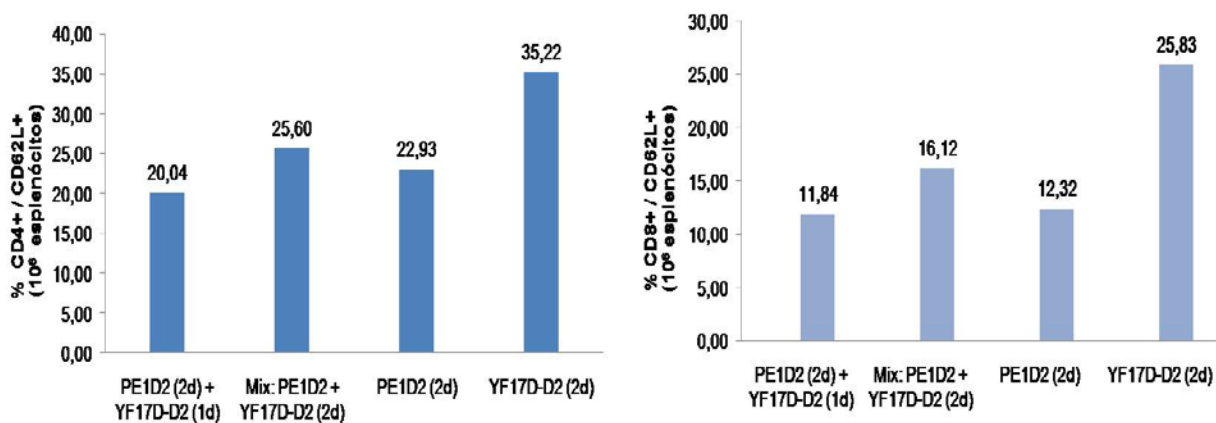


Figura 4.15: Porcentagem de células TCD4+/CD62L+ e TCD8+/CD62L+ presente no baço dos animais vacinados. As células foram agrupadas de acordo com as imunizações (n = 5), incubadas com os anticorpos anti-CD4; anti-CD8; anti-CD62L. As células foram quantificadas no citômetro Cyan e as porcentagens da populações celulares foram avaliadas no programa Summit 4.3.

4.5. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA PELA VACINA DE DNA PE2D2 EM TESTES DE IMUNIZAÇÕES COMBINADAS COM O VÍRUS QUIMÉRICO YF17D-D2

Como demonstrado previamente no item 4.3., a vacina pE2D2 foi menos imunogênica em camundongos imunizados exclusivamente com duas doses de DNA quando comparada aos animais imunizados com o plasmídeo pE1D2. Entretanto, quando a vacina pE2D2 foi combinada com a vacina YF17D-D2, em um sistema de dose/reforço ou em um mix (imunização simultânea), 100% dos animais sobreviveram ao desafio letal com DENV2 (Fig. 4.16b). Tais vacinas combinadas foram significativamente mais protetoras ($p = 0,0004$) que as mesmas, pE2D2 (duas doses) ou YF17D-D2 (uma dose), administradas isoladamente. Além disso, apenas um animal (10%) imunizado com duas doses de pE2D2 e reforço YF17D-D2 apresentou sinais clínicos da infecção com grau 2 de morbidade (Fig. 4.16c). Por outro lado, 100% dos animais imunizados com duas doses do mix (pE2D2 + YF17D-D2) mostraram ausência total de sinais clínicos da infecção (Fig. 4.16c).

4.5.1. Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes presente no soro de camundongos imunizados com a vacina PE2D2 combinada com o vírus quimérico YF17D-D2

Os soros de camundongos Balb/c imunizados com a vacina pE2D2 combinada com o vírus quimérico YF17D-D2 em um sistema de dose/reforço foram avaliados individualmente quanto à presença de anticorpos neutralizantes, antes do desafio letal com DENV2 (Fig.4.17).

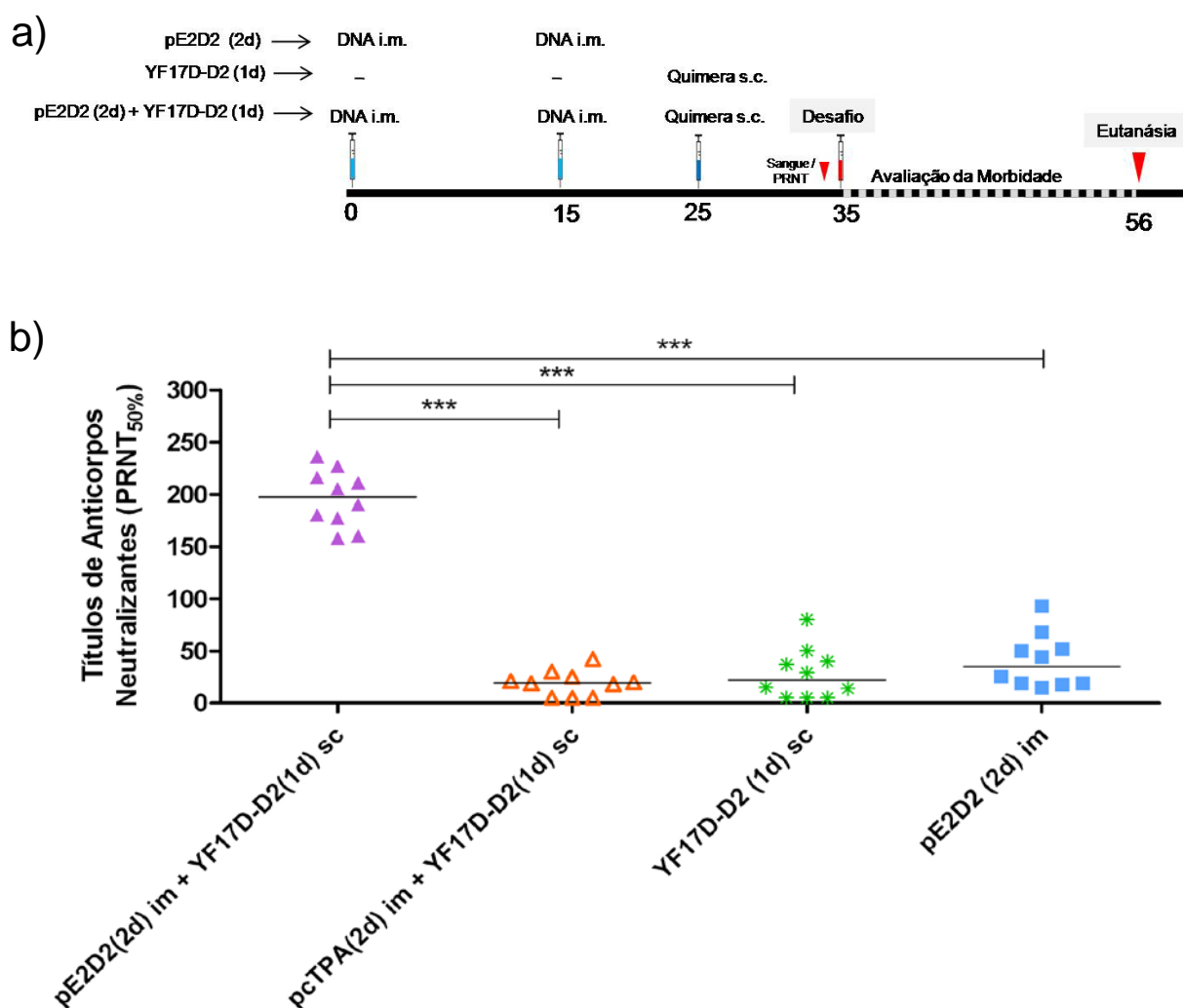


Figura 4.17: Detecção dos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV2 presente nos soros de animais imunizados com as vacinas pE2D2 combinada com a vacina YF17D-D2 (b). Em (a) esquema de imunização e desafio. As amostras de soro de camundongos imunizados e controles (n = 10) foram coletadas 24 horas antes do desafio letal com DENV2 e avaliados nos ensaios de PRNT. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (***, p < 0,0001).

Os títulos de anticorpos neutralizantes variaram de 160 a 240 nos animais imunizados com duas doses de pE2D2 e reforço com YF17D-D2 (Fig. 4.17b). Além disso, esses títulos foram significativamente maiores quando comparados aos grupos de animais inoculados somente com duas doses do plasmídeo pE2D2 ou uma dose do vírus quimérico YF17D-D2 ($p < 0,0001$) (Fig. 4.17b).

4.6. COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM OS DIVERSOS PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO

Os resultados obtidos com os diversos esquemas de imunização realizados neste trabalho foram listados resumidamente na tabela 4.1.

A vacina de DNA pE1D2 se mostrou mais imunogênica induzindo altos níveis de proteção (100% de sobrevivência/grau de morbidade = $0,1 \pm 0,3$, média e desvio padrão, respectivamente) nos animais imunizados frente ao desafio letal com DENV2, quando comparada ao plasmídeo pE2D2 (50% de sobrevivência/grau de morbidade = $2,0 \pm 1,2$). A vacina YF17D-D2 também gerou altos níveis de proteção (100% de sobrevivência/grau de morbidade $0,4 \pm 0,7$). Entretanto, a proteção total com 100% de sobrevivência e ausência de qualquer sinal clínico da infecção por DENV2 foi observada apenas nos grupos imunizados com a combinação da vacina de DNA e vírus quimérico.

O sistema de dose/reforço administrado em três doses (pE1D2/pE1D2/YF17D-D2 ou YF17D-D2/pE1D2/pE1D2), induziu 100% de proteção nos animais imunizados frente ao desafio letal com DENV2. Além disso, esse esquema de imunização gerou altos títulos de anticorpos neutralizantes e uma maior ativação de células produtoras de IFN. Os camundongos imunizados com a combinação simultânea das vacinas (pE1D2+YF17D-D2), com duas doses deste mix administrado por via i.m., mantendo-se um intervalo de duas semanas entre as doses, apresentaram 100% de proteção após desafio letal com DENV2. Resultado semelhante foi observado nos animais imunizados simultaneamente com tais vacinas administradas por diferentes vias, ou seja, com o DNA e a quimera inoculados por via i.m. e s.c., respectivamente e ao mesmo tempo. Como podemos observar as duas vacinas, pE1D2 e YF 17D-D2 combinadas foram potencialmente mais protetoras e duas doses do mix (pE1D2+YF17D-D2) foi suficiente para induzir 100% de proteção nos animais. A vacina de DNA pE2D2 combinada com a vacina YF17D-D2, no esquema de imunização simultânea (duas doses do mix), induziu

100% de proteção nos animais desafiados com DENV2, evidenciando assim o efeito sinérgico da combinação das vacinas de DNA e o vírus quimérico FA-dengue.

4.7. CONSTRUÇÃO DE NOVOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES COM A CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS QUE CODIFICAM O ECTODOMÍNIO DA PROTEÍNA E DE DENV1, 3 e 4.

Uma vez que a vacina de DNA pE1D2 que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E DENV2 se mostrou mais eficiente e protetora, que a vacina pE2D2 (domínio III da proteína E), foram construídos novos plasmídeos contendo esse segmento gênico proveniente dos outros sorotipos virais. Os plasmídeos recombinantes pE1D1, pE1D3 e pE1D4 foram construídos a partir da clonagem de sequências sintéticas que correspondem ao ectodomínio da proteína E de DENV1, DENV3 e DENV4, respectivamente, fusionadas à sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA. Os clones positivos foram digeridos com enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI*, e os fragmentos gerados apresentaram pesos moleculares esperados (5385pb e 1263pb), confirmando a presença dos insertos em cada construção (Fig. 4.18). Além disso, as três novas vacinas de DNA obtidas (pE1D1, pE1D3 e pE1D4) foram sequenciadas e as sequências heterólogas apresentaram ausência de mutações e em quadro de leitura aberto com a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA.

4.7.1. Análise da expressão das proteínas recombinantes mediada pelos plasmídeos pE1D1, pE1D3 e pE1D4

Monocamadas de células BHK-21 foram transfectadas com os novos plasmídeos construídos, conforme descrito anteriormente. As proteínas recombinantes foram detectadas no citoplasma das células transfectadas com os plasmídeos pE1D1, pE1D3 e pE1D4, utilizando soros de macacos imunes contra DENV1, DENV3 e quimera YF 17D-D4, respectivamente (Fig. 4.19).

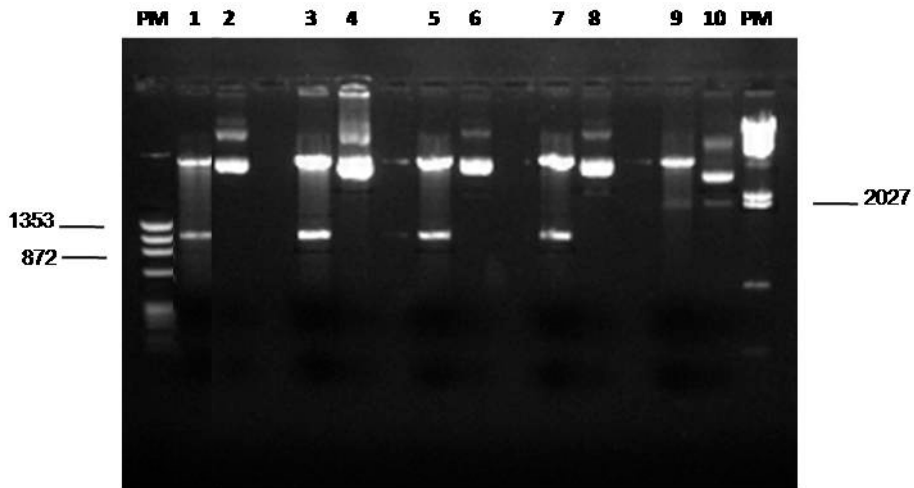


Figura 4.18: Gel de agarose 1% com os 4 plasmídios recombinantes digeridos com enzimas de restrições específicas. Os plasmídeos foram construídos com a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E dos 4 sorotipos. PM - ϕ X174/*Hae*III; linhas: 1 - pE1D1 digerido; 2 - pE1D1 não digerido; 3 - pE1D2 digerido com as enzimas *Eco*RV e *Xba*I, conforme descrito anteriormente; 4 - pE1D2 não digerido; 5 - pE1D3 digerido; 6 - pE1D3 não digerido; 7- pE1D4 digerido; 8 - pE1D4 não digerido; 9 - pcTPA digerido; 10 - pcTPA, não digerido; PM - λ HindIII.

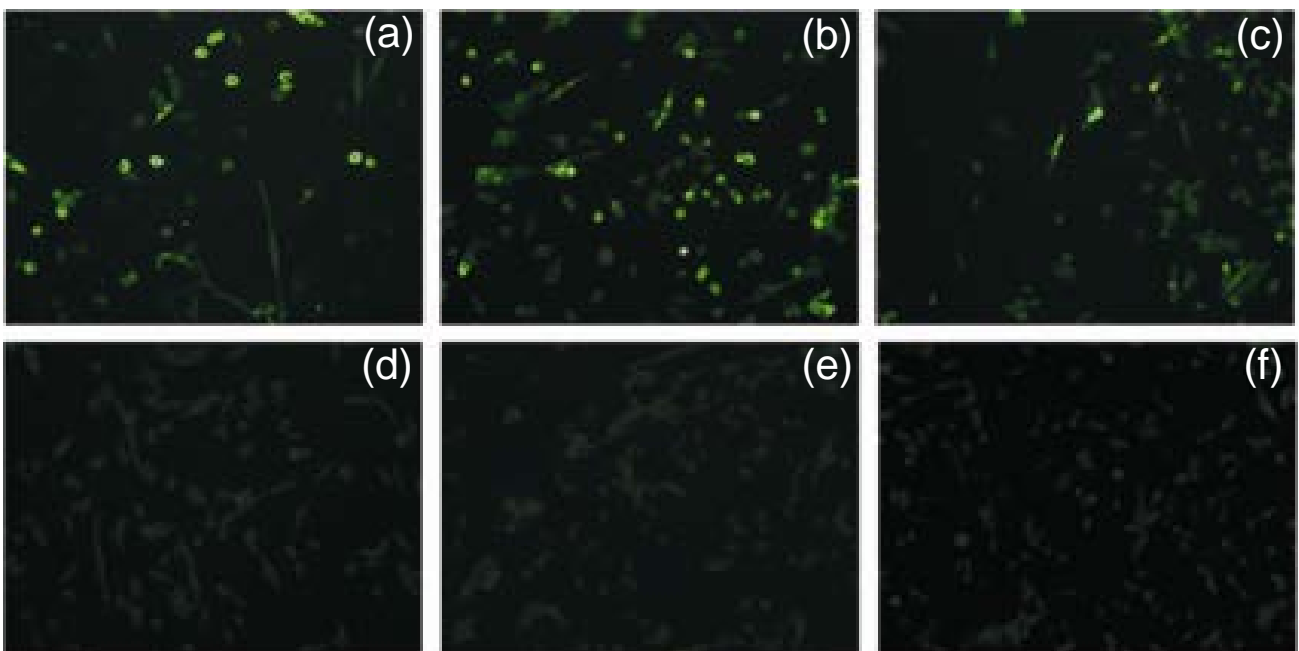


Figura 4.19: Detecção das proteínas recombinantes em de células BHK-21 transfectadas com os plasmídeos pE1D1 (a), pE1D3 (b) e pE1D4 (c). As células foram incubadas com soros de macaco imunes contra DENV1(a) contra DENV3 (b) e contra a quimera YF17D-D4 (c). As células transfectadas com o plasmídeo controle pcTPA também foram marcadas com os respectivos soros imunes citados (d-f). Aumento 200X.

Capítulo 5.

5. DISCUSSÃO

A dengue é provavelmente uma das doenças humanas causadas por flavivírus mais importante em um contexto mundial. Somente neste ano, já foram registrados mais de 250.000 casos notificados de dengue em nosso país (Ministério da Saúde, 2011).

Apesar dos esforços de grupos de pesquisas que trabalham em várias frentes do desenvolvimento de vacinas contra dengue, atualmente não há uma vacina comercialmente disponível, capaz de gerar proteção contra os quatro sorotipos de DENV. Neste sentido, a minha tese teve como objetivo desenvolver vacinas de DNA contra dengue e avaliar a resposta imune gerada por tais vacinas em modelo murino. Além disso, foram testados vários esquemas de imunizações envolvendo imunizações simples (DNA/DNA) ou combinada (DNA + vírus quimérico), com a finalidade de potencializar a resposta imune gerada pelas vacinas de DNA e alcançar um protocolo vacinal com um número reduzido de doses administradas.

Inicialmente, nós construímos duas vacinas de DNA baseadas na sequência que codifica o ectodomínio (domínios I, II e III) da proteína E de DENV2 (pE1D2) ou apenas seu domínio III (pE2D2), fusionadas à sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA. A glicoproteína E foi escolhida por ser o principal constituinte protéico presente na superfície viral, que interage com receptores na membrana plasmática de células hospedeiras, sendo, portanto, responsável por mediar os mecanismos de entrada do vírus nestas células (Chang *et al.*, 2001). Sendo assim, esta proteína é apontada como o principal imunógeno para o desenvolvimento de vacinas contra flavivírus, uma vez que ela induz a produção de anticorpos neutralizantes que se ligam a epítomos específicos presentes na proteína E, impedindo assim a infecção viral (Hechal, 1985; Rothman *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2004). Por esse motivo, vários grupos de pesquisa, incluindo o nosso, vêm utilizando a proteína E como um importante alvo para a produção de vacinas contra dengue (Kochel *et al.*, 2000; PutnaK *et al.*, 2003; Beckett *et al.*, 2011).

A análise da expressão *in vitro* das proteínas recombinantes, utilizando células BHK-21 transfectadas com os plasmídeos pE1D2 ou pE2D2, avaliadas por imunofluorescência, revelou uma intensa marcação no citoplasma destas células quando tratadas com fluido ascítico anti-DENV2. Tais resultados indicam que os dois plasmídeos foram capazes de mediar corretamente à expressão das proteínas recombinantes em células de mamífero, uma vez que os anticorpos utilizados

reagem contra epítomos presentes na proteína do envelope viral, descritos anteriormente em outros trabalhos com marcações de diferentes células infectadas com DENV2 (Kurane *et al.*, 1990; Putnak *et al.*, 2003; Chambers *et al.*, 2003). Além disso, as proteínas recombinantes expressas pelas células transfectadas também reagiram com o anticorpo monoclonal 3H5 (Henchal *et al.*, 1982), que reconhece especificamente um epítomo neutralizante presente no domínio III da proteína E de DENV2 (Henchal *et al.*, 1982; Sukupolvi-Petty *et al.*, 2007). Portanto, tal epítomo se encontra preservado nas proteínas recombinantes, sugerindo o correto enovelamento destas proteínas.

As vacinas de DNA pE1D2 e pE2D2 foram construídas com inserção da sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio do tecido humano (t-PA), clonado a jusante das sequências codantes incompletas derivadas do gene E, para que as proteínas recombinantes fossem secretadas para o meio extracelular. Tal sequência sinal também foi utilizada na construção de outras vacinas de DNA, incluindo algumas produzidas pelo nosso grupo. Nestes trabalhos, o t-PA mediou com sucesso à secreção dos antígenos recombinantes que induziram uma resposta de anticorpos robusta (Costa *et al.*, 2006a; Costa *et al.*, 2006b; Costa *et al.*, 2007). Em concordância com estes relatos, nós também observamos a secreção das proteínas recombinantes *in vitro* mediada por ambos os plasmídeos, pE1D2 e pE2D2. Este resultado demonstra que o desenho de nossas construções funcionou como esperado, levando a secreção do antígeno alvo, fato este importante uma vez que já foi demonstrado que a magnitude da resposta imune humoral induzida por vacinas de DNA é altamente influenciada pela capacidade do antígeno expresso ser secretado (Boyle *et al.*, 1997; Inchausp *et al.*, 1997). Além disso, a expressão das proteínas recombinantes também foi confirmada indiretamente *in vivo*, através da detecção de anticorpos neutralizantes contra DENV2 presentes no soro de camundongos imunizados com as duas diferentes vacinas de DNA, pE1D2 ou pE2D2.

5.1. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA PELAS VACINAS DE DNA

O potencial imunogênico das vacinas de DNA foi avaliado através de um protocolo de imunização em camundongos Balb/c que já havia sido padronizado anteriormente pelo nosso grupo com outras vacinas de DNA. Para isto, os animais

foram vacinados, por via intramuscular (i.m.), com duas doses das vacinas de DNA, pE1D2 ou pE2D2, mantendo-se um intervalo de duas semanas entre as imunizações. A via i.m. foi escolhida por ser capaz de induzir eficientemente uma resposta imune robusta nesses animais, descrita por diversos autores (Konishi *et al.*, 2000; De Paula *et al.*, 2008), incluindo os trabalhos do nosso grupo com outro plasmídeo que contém o gene que codifica a proteína NS1 de DENV2 fusionado ao t-PA (pcTPANS1), cuja construção foi semelhante à utilizada com os plasmídeos pE1D2 e pE2D2 (Costa *et al.*, 2006a; Costa *et al.*, 2006b; Costa *et al.*, 2007). Nestes trabalhos, de um modo geral, o uso de duas doses das vacinas de DNA foi suficiente para induzir respostas imunes desejáveis em camundongos (Costa *et al.*, 2006a, Putnak *et al.*, 2003). No caso da vacina pcTPANS1, os animais inoculados com três doses de DNA apresentaram somente um aumento transitório nos níveis de anticorpos, com uma redução significativa nas semanas seguintes alcançando títulos semelhantes ao observado em camundongos imunizados com apenas duas doses de DNA (Costa *et al.*, 2006a). Consequentemente optamos por utilizar este mesmo protocolo de imunização.

A análise da resposta imune humoral induzida nos camundongos vacinados com o plasmídeo pE1D2 revelou níveis de anticorpos neutralizantes significativamente mais elevados, quando comparados aos detectados nos animais imunizados com a vacina pE2D2. Tais resultados revelaram que a expressão somente do domínio III se mostrou imunogênica, uma vez que os camundongos inoculados pE2D2 apresentaram níveis detectáveis de anticorpos neutralizantes. Entretanto, ela parece não ser suficiente para a indução de uma resposta imune com magnitude semelhante ao que foi observado quando usamos o segmento maior da proteína E. O plasmídeo pE1D2 contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínios I, II e III), o que parece ser importante para a geração de altos níveis de anticorpos neutralizantes, pelo menos no contexto de vacinas de DNA testadas no nosso estudo. De fato, foi demonstrado que os domínios I e II também contêm epítomos que geram anticorpos capazes de interferir com a infecção do vírus em cultura de células (Roehrig *et al.*, 1998) e, portanto, eles poderiam contribuir para os níveis mais altos de anticorpos neutralizantes detectados nos camundongos imunizados com a vacina pE1D2. Além disso, Wahala & colaboradores (2009) recentemente caracterizaram propriedades funcionais e a especificidade de ligação de anticorpos presente no soro de pacientes convalescentes acometidos de dengue

e demonstraram que os anticorpos contra o domínio III têm um papel pequeno na neutralização viral. Os autores sugerem, portanto, que epítomos presentes em outros locais da proteína E de DENV são os principais responsáveis para a neutralização do vírus em humanos (Wahala *et al.*, 2009).

Adicionalmente, no plasmídeo pE1D2 foi clonada somente a sequência que codifica os domínios I, II e III (ectodomínio), sem as regiões de haste e âncora da proteína E. Tais regiões, que estão localizadas na extremidade C-terminal da proteína E, foram retiradas por serem constituídas de sequências de aminoácidos altamente hidrofóbicos (Allison *et al.*, 1999; Lindenbach & Rice, 2001) que poderiam interferir na expressão e/ou secreção das proteínas recombinantes, especialmente em sistemas heterólogos. De fato, inicialmente pretendíamos incluir outras vacinas de DNA nestes estudos contendo a sequência que codifica a proteína E completa, com ou sem a proteína prM. Entretanto, encontramos dificuldades para clonar estes genes, que codificam proteínas altamente hidrofóbicas, e todos os clones obtidos apresentaram mutações. Tal fato deve ter ocorrido devido a um “vazamento” no promotor, derivado do citomegalovírus humano (CMV), que controla a expressão das proteínas recombinantes nos plasmídeos pE1D2 e pE2D2. Este promotor não deveria ser ativo em células procarióticas, uma vez que é específico para células de mamífero. Entretanto, acreditamos que o insucesso de tais construções, que continham deleções no início do gene, está relacionado a uma expressão, ao menos basal, das proteínas recombinantes que por conterem sequências muito hidrofóbicas podem ser tóxicas para a bactéria utilizada para as clonagens.

Outras vacinas de DNA também baseadas no gene incompleto da proteína E de DENV já foram desenvolvidas para a indução de resposta imune contra dengue (Kochel *et al.*, 1997; Raviprakash *et al.*, 2000; Jimenez *et al.*, 2001). Entretanto, estas construções vacinais utilizaram o peptídeo sinal natural da proteína E, localizado na porção C-terminal da proteína prM de DENV, e não foi observada proteção total nos animais imunizados com tais vacinas de DNA, provavelmente devido à falta de um peptídeo sinal eficaz, pelo menos no contexto das vacinas de DNA. Por outro lado, alguns autores utilizaram a sequência t-PA fusionada ao gene incompleto da proteína E do vírus da encefalite japonesa e observaram que tal vacina de DNA conferiu maior proteção quando comparado a outros plasmídeos testados (Ashok & Rangarajan, 2002). A maioria das vacinas de DNA contra a dengue e outros flavivírus é baseada nos genes completos das proteínas estruturais

prM e E (Phillpotts *et al.*, 1996; Colombage *et al.*, 1998; Konishi *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000; Raviprakash *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2001; Putnak *et al.*, 2003), pois há relatos de que a co-expressão de ambas as proteínas seria importante para o correto enovelamento da proteína E (Lindenbach & Rice, 2001). No entanto, essas proteínas contêm regiões hidrofóbicas que podem interferir com a sua expressão e/ou secreção, conforme discutido acima. De fato, alguns estudos com vacinas de DNA que codificam as sequências completas das proteínas prM e E mostraram indução de baixos títulos de anticorpos neutralizantes e proteção parcial, mesmo após várias doses de DNA administradas (Raviprakash *et al.*, 2000; Konishi *et al.*, 2000). Para contornar tal dificuldade, os pesquisadores vêm empregando outras estratégias como: o uso de sequências que sinalizam para os compartimentos lisossomais (aumento da apresentação de antígenos por via do MHC-II) (Raviprakash *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2003; Dhaliya *et al.*, 2009); plasmídeos que carregam sequências imunoestimuladoras (Poter *et al.*, 1998; Raviprakash *et al.*, 2003) e/ou genes de citocinas (Raviprakash *et al.*, 2001; Raviprakash *et al.*, 2003); esquema de imunização com dose e reforço (prime/booster) (Simmons *et al.*, 2001; Mellado-Sánchez *et al.*, 2005; Khanam *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2010). Além dessas dificuldades encontradas, recentemente Dejnirattisai & colaboradores (2010) mostraram que anticorpos monoclonais humanos contra a proteína prM não somente exibem uma limitada capacidade de neutralização do DENV, mas também podem aumentar a infecção no fenômeno de ADE. Na verdade, parece que a combinação da clivagem parcial da prM, encontrada nas partículas virais, em conjunto com uma forte reação cruzada entre os sorotipos de DENV faz com que a resposta anti-prM leve ao aumento da infecção viral (Dejnirattisai *et al.*, 2010). Portanto, o uso da proteína E sem a prM, como fizemos no presente trabalho, pode ser mais apropriado para o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da dengue, evitando assim o risco do aumento da replicação viral.

A imunização com o plasmídeo pE2D2, que codifica apenas o domínio III da proteína E de DENV2, induziu baixos níveis de anticorpos neutralizantes em camundongos e proteção incompleta frente ao desafio letal de DENV2. Por outro lado, outros trabalhos, usando vacinas de DNA que codificam o domínio III da proteína E dos quatro sorotipos de dengue demonstraram resultados diferentes. Ramanathan & colaboradores (2009) mostraram que tais vacinas podem induzir respostas imunes contra todos os sorotipos do vírus, com produção de anticorpos

neutralizantes. No entanto, neste estudo, os níveis de anticorpos neutralizantes não foram avaliados por ensaios PRNT tradicionais, como realizado em nosso trabalho, e os camundongos não foram desafiados com DENV a fim de avaliar a proteção (Ramanathan *et al.*, 2009). Por outro lado, Mota & colaboradores (2005), utilizando uma combinação tetravalente das vacinas de DNA que codificam o domínio III dos sorotipos 1-4, revelou uma proteção frente o desafio por DENV. No entanto, os autores usaram modelos de desafio indireto, com camundongos recém nascidos inoculados com DENV previamente incubado com amostras de soro derivadas de animais imunizados com tais vacinas, e os resultados podem ser diferentes quando se utilizam animais adultos (Mota *et al.*, 2005). Além disso, a resposta imune humoral induzida por essas vacinas foi de baixa magnitude, avaliada pelo teste ELISA, e os anticorpos neutralizantes não foram quantificados (Mota *et al.*, 2005).

A eficácia protetora das nossas vacinas de DNA foi avaliada em testes de desafio por via i.c., com uma dose letal de DENV2 neuroadaptado em cérebro de camundongo neonato. Embora, este modelo de desafio com inoculação por via i.c. seja diferente do que ocorre durante a infecção natural em seres humanos, ele é amplamente utilizado para testar vacinas contra o vírus da dengue e nos permite fazer comparações com diversos estudos (Kochel *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1998; Jimenez *et al.*, 2001; Caufour *et al.*, 2001; Clements *et al.*, 2010; Valdés *et al.*, 2009).

Em concordância com os títulos de anticorpos neutralizantes presentes nos animais imunizados com a vacina pE1D2, este grupo também apresentou altos níveis de proteção. Todos os camundongos Balb/c vacinados com tal vacina sobreviveram ao desafio letal com DENV2 e somente 10% dos animais apresentaram morbidade. Por outro lado, a proteção conferida pelo plasmídeo pE2D2 foi apenas parcial, uma vez que a maioria dos animais imunizados (65%) apresentou sinais clínicos frente ao desafio por DENV2 e 45% destes animais morreram nos dias seguintes com a evolução da infecção. A imunidade pré-existente em camundongos vacinados com pE1D2 provavelmente é a base para a proteção observada, no entanto o aumento significativo dos títulos de anticorpos após a inoculação do vírus, que indica a ativação de uma memória imunológica com rápida e forte resposta imune secundária, também deve ter contribuído para esta proteção. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação direta entre os graus de morbidade observada após o desafio nos animais imunizados com o pE2D2 e os títulos de anticorpos neutralizantes. Trabalhos prévios mostraram que imunizações

com anticorpos monoclonais que possuem forte atividade neutralizante *in vitro* contra DENV, induziram níveis diferentes de proteção *in vivo* (Shrestha *et al.*, 2010). Estes estudos sugerem que os níveis de anticorpos neutralizantes não são o único parâmetro a ser investigado, pois a estequiometria da ligação dos anticorpos também pode ser importante para a proteção (Shrestha *et al.*, 2010).

5.2. AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO INDUZIDA PELAS VACINAS DE DNA COMBINADAS COM O VÍRUS QUIMÉRICO YF17D-D2

Na busca de estratégias que visam o aumento de uma resposta imune protetora e de memória prolongada, nós combinamos, pela primeira vez na literatura, as vacinas de DNA construídas no presente trabalho com o vírus quimérico YF17D-D2, em diferentes protocolos de imunização. Tais vacinas foram administradas em um sistema de dose (DNA) e reforço (quimera) ou vice e versa; ou em imunizações simultâneas (DNA + quimera).

Avaliando separadamente o desempenho da vacina de DNA pE1D2 e da vacina quimérica YF17D-D2 testadas em camundongos Balb/c, observamos que duas doses de tais vacinas administradas isoladamente foram capazes de induzir 100% de sobrevivência, nos animais desafiados com uma dose letal de DENV2. Além disso, apenas 10% e 30% dos camundongos imunizados com pE1D2 ou YF17D-D2 apresentaram sinais clínicos da infecção, respectivamente. Apesar da elevada proteção induzida pela vacina pE1D2 observada nos nossos estudos pré-clínicos, estudos clínicos utilizando vacinas de DNA contra dengue e outros patógenos mostraram que tais vacinas não foram tão imunogênicas em humanos quando comparada à resposta imune induzida pelas mesmas em camundongos (Beckett *et al.*, 2011; Liu & Ulmer, 2005; Liu, 2011). Paralelamente, as vacinas quiméricas FA-dengue (CVD1-4), desenvolvidas pela Sanofi Pasteur e que já estão sendo testadas em ensaios clínicos em uma formulação tetravalente, não induziram uma resposta imune balanceada contra os quatro sorotipos de DENV (Guy & Almond, 2009). Cerca de 80-100% dos voluntários imunizados com três doses da vacina tetravalente (CVD1-4), administradas durante um intervalo de um ano, soroconverteram contra os quatro sorotipos de DENV apenas no final do protocolo vacinal (Lang, 2009; Murphy & Whitehead, 2011). Tal fato é preocupante quando se pensa em vacinar uma população que vive em regiões endêmicas, como a brasileira, que pode ser tornar mais susceptível ao desenvolvimento de dengue

grave caso seja infectada durante o período entre as imunizações, quando a proteção não é completa contra os quatro sorotipos virais.

Por outro lado, nos nossos estudos observamos que as vacinas monovalentes pE1D2 e YF17D-D2 combinadas geraram respostas imunes com maior magnitude do que as mesmas administradas isoladamente. A quimera YF17D-D2 produzida no Brasil, assim como a vacina da Sanofi Pasteur, foi construída substituindo os genes que codificam as proteínas estruturais prM e E do vírus vacinal da febre amarela pelos genes prM e E de DENV2, formando assim um vírus que contém o “esqueleto” de FA carregando as proteínas prM e E de DENV2 (Caufour *et al.*, 2001). Conforme o esperado, a proteína E de DENV2 foi detectada no extrato e sobrenadante da cultura de células Vero infectadas com a quimera YF17D-D2, sendo reconhecida por fluido ascítico anti-DENV2. Estes resultados mostraram que os epítomos antigênicos presentes na proteína E foram conservados na quimera YF17D-D2, e que as partículas virais foram liberadas para o meio extracelular durante a infecção, como demonstrado anteriormente por Caufour & colaboradores (2001).

As imunizações de camundongos no sistema de dose e reforço, independente do número de doses ou sequência de inoculações (DNA/quimera ou quimera/DNA) induziu 100% de sobrevivência após o desafio letal com DENV2. Além disso, todos os animais que receberam duas doses das vacinas de DNA e uma dose da quimera (DNA/DNA/quimera ou quimera/DNA/DNA) se mostraram completamente protegidos, sem apresentar qualquer sinal clínico da infecção. A imunização simultânea das vacinas pE1D2 e YF17D-D2 também gerou uma proteção de 100% nos animais, sem qualquer morbidade no caso dos animais vacinados com duas doses desta formulação.

O sinergismo da resposta imune gerada com a vacina de DNA e vírus quimérico também pode ser observado quando utilizamos o plasmídeo pE2D2, que não se mostrou tão protetor em inoculações simples (DNA/DNA), administrado em conjunto com o vírus YF17D-D2, tanto no sistema de dose e reforço quanto em imunizações simultâneas. Estas imunizações também induziram níveis elevados de proteção nos animais desafiados com DENV2. Apesar da vacina pE2D2 isoladamente não ter induzido níveis satisfatórios de proteção, quando comparada ao pE1D2, não podemos descartar completamente o seu uso em combinação com o vírus quimérico YF17D-D2 que se mostrou protetor. Neste caso, o uso do domínio III

para o reforço da resposta imune humoral contra a proteína E poderia ser vantajoso, uma vez que esta região contém poucos epítomos não neutralizantes que podem influenciar no fenômeno de ADE (Guzman *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, a grande maioria dos autores que trabalha na busca de uma vacina protetora contra a dengue acredita que os anticorpos neutralizantes são o principal componente da resposta imune protetora (RavipraKash, 2000; Whitehead *et al.*, 2007; Tan & Alonso, 2009). Estudos realizados em áreas endêmicas relataram que a transferência materna de anticorpos aos recém-nascidos, por mães imunes à dengue, é responsável por proteger as crianças da infecção por DENV e a duração desta proteção, aproximadamente até os seis meses de idade, se correlaciona com a presença de anticorpos neutralizantes detectados no soro de tais crianças (Kliks *et al.*, 1988; RavipraKash, 2000; Murphy & Whitehead, 2011). Além disso, a imunização passiva com vários anticorpos monoclonais neutralizantes induz proteção parcial em camundongos frente ao desafio com DENV, demonstrado em diferentes modelos experimentais (Lai *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Shrestha *et al.*, 2010). Em nosso estudo, a combinação das vacinas de DNA com o vírus quimérico gerou níveis elevados de anticorpos neutralizantes, significativamente maiores do que as mesmas vacinas administradas isoladamente, avaliados por ensaios de PRNT_{50%}. Além disso, relatos anteriores mostraram que três doses da quimera YF17D-D2 induziu níveis menores de anticorpos neutralizantes em camundongos suíços, aproximadamente 1:420, também avaliados por PRNT_{50%} (Caufour *et al.*, 2001). Por outro lado, todos os camundongos imunizados com o sistema de dose e reforço invertido (YF17D-D2/pE1D2/pE1D2) apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes maiores ou igual a 1:640, limite máximo de detecção determinado por nossos testes, sendo que estes níveis foram significativamente maiores do que os encontrados nos animais imunizados com duas doses de pE1D2 seguido de reforço (YF17D-D2). Apesar da diferença observada entre estes dois grupos de dose/reforço, 50% dos animais que receberam o protocolo direto (DNA/DNA/quimera) alcançaram os títulos \geq 1:640 de anticorpos neutralizantes, limite máximo detectado em nossos testes.

Trabalhos anteriores mostraram que a imunização com o mesmo antígeno apresentado de diferentes maneiras para o sistema imune do hospedeiro, como na estratégia de dose e reforço (prime-booster) heterólogo, induz respostas imunes

mais robustas. Alguns destes estudos utilizaram diferentes abordagens vacinais com vírus recombinantes, vírus inativados ou atenuados (Sedegah *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011) e vacinas de subunidades (Simmons *et al.*, 2001; Coban *et al.*, 2004) contra diversos patógenos, incluindo o vírus da dengue, e observaram a indução de altos títulos de anticorpos em camundongos e primatas não humanos. Outros relatos também evidenciaram a ativação de células T de memória após as imunizações no sistema de dose e reforço (Woodland, 2004; Khanam *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Simmons *et al.*, 2010; Rigato *et al.*, 2011).

Além disso, foi demonstrado que a imunização simultânea com diferentes tipos de vacinas também aumenta sinergicamente à resposta imune (Konish *et al.*, 2003; Imoto *et al.*, 2007). Estudo prévio, utilizando a estratégia de imunização simultânea envolvendo uma vacina de DNA tetravalente contra dengue, baseada nos genes das proteínas prM/E, misturada à vacina recombinante D2EPs (proteínas recombinantes prM/E de DENV2), ou a vacina comercial JEVAX (vírus da encefalite japonesa inativado) e inoculadas por via i.m. com um injetor a jato livre de agulhas, mostrou que ambas as misturas induziram aumento da resposta de anticorpos neutralizantes (Imoto & Konishi, 2007). Entretanto não foram realizados testes de desafio diretos para avaliar o potencial protetor destes anticorpos *in vivo* (Imoto & Konishi, 2007). Além disso, testes de imunizações simultâneas envolvendo vacina de DNA inoculada por via i.m. e vacina recombinante administrada por via s.c., também aumentaram sinergicamente a resposta de anticorpos neutralizantes em camundongos (Konishi *et al.*, 2003). Em nosso protocolo de imunização simultânea, 90% dos animais imunizados com duas doses do mix pE1D2 + YF17D-D2 apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes maiores ou igual a 1:640. Tal resultado é bastante interessante, uma vez que foram necessárias apenas duas inoculações, enquanto que no protocolo de dose/reforço para se alcançar resultado semelhante foram necessárias três inoculações vacinais. Vários pesquisadores têm explorado os títulos limites de anticorpos neutralizantes e suas correlações com a ausência ou atenuação da doença após a infecção por DENV (Rhoehrig *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2008). Porém tal associação ainda não está completamente compreendida, muito provavelmente por que o outro braço da resposta imune adaptativa, a celular, deve participar juntamente com os anticorpos na geração de uma resposta imune protetora contra dengue. De fato, alguns autores vêm

demonstrando a contribuição da resposta imune celular no combate a infecção por DENV (van der Most 2000; Hsieh *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2009; Yauch *et al.*, 2009). Yauch & colaboradores (2009) mostraram que camundongos imunizados com alguns epítomos derivados de proteínas do DENV imunodominantes para células TCD8+ apresentaram diminuição da carga viral, frente ao desafio com DENV. Além disso, no mesmo estudo, a depleção de células TCD8+ resultou em aumento da replicação viral (Yauch *et al.*, 2009). Adicionalmente, camundongos imunizados por via intraperitoneal com uma dose de DENV2, que induz uma resposta imune contra os epítomos naturais de proteínas virais, foram depletados de células TCD8+ e os testes de desafio intracerebral revelaram uma diminuição de 50% nos níveis de proteção quando comparados aos animais controles não depletados (Gil *et al.*, 2009). Em geral, a atividade antiviral das células TCD8+ é mediada pela produção de citocinas, incluindo IFN- γ e TNF- α e morte de células infectadas (Hsieh *et al.*, 2006; Yauch *et al.*, 2009). Além disso, Shresta & colaboradores (2004) demonstraram que camundongos deficientes em IFNs são mais suscetíveis à infecção por dengue e propuseram que o IFN do tipo 1 é fundamental para a resposta rápida inicial contra a dengue e que o IFN- γ é necessário para a diminuição da carga viral durante a infecção primária por DENV.

A resposta imune celular dos animais imunizados com as vacinas pE1D2 ou YF17D-D2, utilizando diferentes protocolos de inoculação, foi avaliada especificamente quanto à presença de células TCD8+ antígeno específicas e secretoras de IFN- γ , por ensaios de ELISPOT. Os esplenócitos foram estimulados com o epítomo específico para células TCD8+ presente na proteína estrutural E de DENV2 (resíduos 331 a 339, SPCKIPFEI, HLA H-2k^d), descrito por Rothman & colaboradores (1996) e também testados em outros trabalhos (Rothman *et al.*, 1996; van der Most *et al.*, 2000). Os animais imunizados com a vacina de DNA pE1D2 apresentaram um número bem maior de células formadoras de spot (SFC INF- γ +), estimuladas especificamente contra o peptídeo SPCKIPFEI, do que o observado em animais vacinados apenas com o vírus quimérico YF17D-D2. Além disso, esta diferença aumentou quando essas duas vacinas foram combinadas em um sistema de dose e reforço. O aumento sinérgico da resposta imune celular, principalmente de células TCD8+, já foi mostrado em outros trabalhos que utilizaram a estratégia de dose/reforço heterólogo (Woodland, 2004; Rigato *et al.*, 2011).

Quando analisamos o perfil fenotípico de células T derivadas do baço de animais vacinados com protocolos simples ou combinados, observamos que os camundongos imunizados com a vacina PE1D2, administrada isoladamente ou em combinação (PE1D2/YF17D-D2), apresentaram um menor percentual de linfócitos TCD4⁺ ou TCD8⁺ marcados com CD62L em comparação aos animais inoculados somente com a vacina YF17D-D2. O receptor CD62L tem sido utilizado muitas vezes para discriminar células de memória central ou efetora, mas é necessário a marcação conjunta de outros receptores, como o CD44, para fechar tais perfis celulares (Gerberick *et al.*, 1997). As células virgens têm alta expressão da molécula CD62L, bem como as células de memória central (CD62L^{hi}). Entretanto, esta molécula é perdida durante a fase efetora, com a intensa divisão de células CD62L^{hi} direcionando para um perfil CD62L^{lo} (Schlub *et al.*, 2010). Sendo assim, nossos resultados sugerem que a vacina de DNA pode influenciar aumentando o número de células T ativadas.

Atualmente, a vacina quimérica tetravalente (CVD1-4) desenvolvida pela Sanofi Pasteur está em fase avançada nos testes clínicos com chances de entrar no mercado, mesmo tendo ainda alguns desafios a alcançar como a diminuição do tempo para se conseguir uma resposta balanceada contra os quatro sorotipos de DENV. Diante disso, não podemos descartar a possibilidade da administração de reforço com a vacina de DNA, pE1D2, nos indivíduos que não alcançaram soroconversão contra um ou mais sorotipos de DENV. Nossos resultados apontam que a administração da quimera YF17D-D2 seguida de reforço com a vacina pE1D2 induziu títulos de anticorpos neutralizantes significativamente mais altos. Além disso, a mistura vacina de DNA e vírus quimérico YF17D-D2, em uma mesma formulação, destaca-se como um potente mecanismo indutor da resposta imune, tanto humoral quanto celular, induzindo proteção completa nos camundongos vacinados com apenas duas doses deste *mix*. Ao que parece duas doses da vacina YF17D-D2 induz títulos maiores de anticorpos neutralizantes, em relação à vacina de DNA, entretanto com uma pequena ativação da resposta imune celular. Por outro lado, a vacina de DNA, pE1D2, ativou os dois braços da resposta imune e quando combinada ao vírus quimérico promoveu um melhor desempenho da resposta celular.

Diante destes resultados, pretendemos dar continuidade aos nossos estudos testando a vacina de DNA monovalente, pE1D2, isoladamente ou em combinação simultânea com a vacina quimérica YF17D-D2 em primatas não humanos.

5.3. VACINAS DE DNA TETRAVALENTES

As evidências descritas na literatura mostram que uma vacina contra a dengue deverá ter em sua constituição antígenos que sejam capazes de promover uma proteção contra os quatro sorotipos do DENV simultaneamente. Sendo assim, nós construímos outras três vacinas de DNA monovalentes, pE1D1, pE1D3 e pE1D4, baseadas no ectodomínio da proteína E de DENV1, DENV3 e DENV4, respectivamente, como descrito para a construção PE1D2. Nós escolhemos o ectodomínio para a construção destas vacinas tetravalentes, uma vez que os testes realizados com o pE1D2 mostraram ser esta vacina significativamente mais protetora, quando comparada ao pE2D2, que codifica somente no domínio III da proteína E. As novas construções foram avaliadas *in vitro* e foram capazes de mediar a expressão das proteínas recombinantes em células de mamífero. As 4 vacinas de DNA monovalentes pE1D1-4 serão avaliadas futuramente, individualmente e em uma composição vacinal tetravalente, em modelo murino e em primatas não humanos.

Capítulo 6

6. CONCLUSÕES

- Ambas as vacinas de DNA, pE1D2 e pE2D2 foram capazes de mediar a expressão *in vitro* das proteínas recombinantes;
- As duas proteínas recombinantes apresentaram pelo menos um epítipo neutralizante preservado, reconhecido pelo anticorpo monoclonal 3H5, específico contra a proteína E de DENV2;
- A sequência t-PA funcionou como peptídeo sinal nas construções pE1D2 e pE2D2 direcionando a secreção das proteínas recombinantes para o meio extracelular;
- A vacina pE1D2 foi mais imunogênica do que a vacina pE2D2, induzindo níveis de anticorpos neutralizantes significativamente mais elevados nos camundongos imunizados;
- Todos os camundongos imunizados com o plasmídeo pE1D2 sobreviveram aos testes de desafio letal com DENV2, sendo este plasmídeo significativamente mais protetor do que o pE2D2;
- A imunização combinada (vacina de DNA e vírus quimérico YF17D-D2) induziu um aumento sinérgico da resposta imune, com produção de altos níveis de anticorpos neutralizantes nos animais vacinados;
- Todos os animais vacinados com os diferentes esquemas de imunização combinada, independente do número de doses administradas, sobreviveram aos testes de desafio intracerebral com DENV2;
- Os sistemas dose/reforço (pE1D2/pE1D2/YF17D-D2) e mix (duas doses: pE1D2 + YF17D-D2 ou pE2D2 + YF17D-D2) induziram proteção total (ausência de sinal clínico da infecção) nos animais vacinados e infectados com uma dose letal de DENV2;
- A vacina de DNA pE1D2 administrada em doses simples ou combinada com o vírus quimérico YF17D-D2 induziu um número maior de células formadoras de *spots* (IFN- γ +) do que o vírus quimérico administrado isoladamente;
- O baço dos animais imunizados com a quimera YF17D-D2 apresentou um maior percentual de células TCD62L+ em comparação ao observado nos camundongos imunizados com o plasmídeo pE1D2 combinado ou não com a quimera;

- As novas vacinas de DNA construídas, pE1D1, pE1D3 e pE1D4, foram capazes de mediar corretamente a expressão das proteínas recombinantes *in vitro*;

Capítulo 7

7. PERSPECTIVAS

Dando continuidade aos nossos estudos, pretendemos avaliar as novas vacinas de DNA, construídas com os ectodomínios da proteína E dos outros sorotipos virais, com imunizações isoladas ou combinando os quatro plasmídeos em camundongos. Além disso, pretendemos avaliar o potencial imunogênico e protetor da vacina pE1D2, que gerou os melhores resultados em camundongos, em testes com primatas não humanos. Tais testes serão realizados com a vacina de DNA isoladamente ou em uma formulação combinada de pE1D2 e YF17D-D2 (mix).

Capítulo 8

8. REFERÊNCIAS

- Alisson SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX. Mapping of Functional Elements in the Stem-Anchor Region of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Protein E. *J Virol.* 1999; 73: 5605-12.
- Alves AM, Lásaro MO, Almeida DF, Ferreira LC. DNA immunisation against the CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Vaccine.* 2000; 19(7-8):788-95.
- Ashok MS, Rangarajan PN. Protective efficacy of a plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein fused to tissue plasminogen activator signal sequences: studies in a murine intracerebral virus challenge model. *Vaccine.* 2002; 20: 1563-70.
- Assenberg R, Mastrangelo E, Walter TS, Verma A, Milani M, Owens RJ, Stuart DI, Grimes JM, Mancini EJ. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. *J Virol.* 2009; 83(24):12895-906.
- Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul SN, Yenchitsomanus PT, Mongkolsapaya J, Kasinrerak W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, Vasanawathana S, Bhakdi S, Malasit P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006; 193(8):1078-88.
- Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143(2):345-56.
- Balmaseda A, Hammond SN, Pérez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, Harris E. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(6):1059-62.
- Barreto ML, Teixeira MG. Dengue fever: a call for local, national, and international action. *Lancet.* 2008;372(9634):205.
- Barrett AD. Current status of flavivirus vaccines. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951:262-71.

- Bashyam HS, Green S, Rothman AL. Dengue virus-reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *J Immunol.* 2006; 176(5):2817-24.
- Basílio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA, Paes MV. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005; 9(4):341-7.
- Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008; 53(3):287-99.
- Beasley DW, Barrett AD. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J Virol.* 2002; 76(24):13097-100.
- Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, Danko JR, Tamminga C, Simmons M, Wu SJ, Sun P, Kochel T, Raviprakash K, Hayes CG, Porter KR. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine.* 2011;29(5):960-8.
- Bielefeldt-Ohmann H. Pathogenesis of dengue virus diseases: missing pieces in the jigsaw. *Trends Microbiol.* 1997;5(10):409-13.
- Blair PJ, Kochel TJ, Raviprakash K, Guevara C, Salazar M, Wu SJ, Olson JG, Porter KR. Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. *Vaccine.* 2006; 24(9):1427-32.
- Blaney JE Jr, Hanson CT, Firestone CY, Hanley KA, Murphy BR, Whitehead SS. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71(6):811-21.
- Block OK, Rodrigo WW, Quinn M, Jin X, Rose RC, Schlesinger JJ. A tetravalent recombinant dengue domain III protein vaccine stimulates neutralizing and enhancing antibodies in mice. *Vaccine.* 2010; 28(51):8085-94.
- Boyle JS, Koniaras C, Lew AM. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol.* 1997; 9: 1897-906.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis.* 2008; 8:86.

- Cabrera-Hernandez A, Thepparit C, Suksanpaisan L, Smith DR. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *J Med Virol.* 2007; 79(4):386-92.
- Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira II, Jabor AV, Bonaldo MC, Freire MS, Galler R. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res.* 2001; 79:1-14.
- Chambers TJ, Liang Y, Droll DA, Schlesinger JJ, Davidson AD, et al. Yellow Fever Virus/Dengue-2 Virus and Yellow Fever Virus/Dengue-4 Virus Chimeras: Biological Characterization, Immunogenicity, and Protection against Dengue Encephalitis in the Mouse Model. *J Virol.* 2003; 77: 3655–3668.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. & Rice, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Ver. Microbiol.* 1990; 44: 649-688.
- Chang GJ, Davis BS, Hunt AR, Holmes DA, Kuno G. Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951:272-85.
- Chang GJ, Hunt AR, Davis B. A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice. *J Virol.* 2000; 74: 4244-52.
- Chang, G.J. Molecular biology of dengue viruses. 1997. In: *Dengue and dengue hemorrhagic fever.* Gubler, D.J. Kuno, G., eds. Cambridge: CAB International, pp 175-198.
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 47(2):155-66.
- Chen L, Ewing D, Subramanian H, Block K, Rayner J, Alterson KD, Sedegah M, Hayes C, Porter K, Raviprakash K. A heterologous DNA prime-Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle boost dengue vaccine regimen affords complete protection from virus challenge in cynomolgus macaques. *J Virol.* 2007; 81(21):11634-9.
- Chen Z, Liu LM, Gao N, Xu XF, Zhang JL, Wang JL, An J. Passive protection assay of monoclonal antibodies against dengue virus in suckling mice. *Curr Microbiol.* 2009; 58(4):326-31.
- Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. 2010; *Vaccine.* 28: 2705-15.

- Clyde K, Harris E. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol.* 2006; 80(5):2170-82.
- Coban C, Philipp MT, Purcell JE, Keister DB, Okulate M, Martin DS, Kumar N. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in nonhuman primates by a combination of DNA and protein immunizations. *Infect Immun.* 2004;72:253-9.
- Colombage G, Hall R, Paty M, Lobigs M. DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with PrM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the Flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. *Virology.* 1998; 250: 151-163.
- Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS 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.* 2007; 358: 413-23.
- Costa SM, Freire MS, Alves AM. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine.* 2006b; 24: 4562-4.
- Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhao AT, Barth OM, et al. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine.* 2006a; 24: 195-205.
- Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol.* 2001; 75: 4040-7.
- Davis HL, Mancini M, Michel ML, Whalen RG. DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine.* 1996;14(9):910-5.
- Davis HL, McCluskie MJ. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes Infect.* 1999; 1(1):7-21.
- Davis HL, Whalen RG. DNA-based immunization. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 1995; 5:368-87.
- De Melo FL, Romano CM, de Andrade Zanotto PM. Introduction of dengue virus 4 (DENV-4) genotype I into Brazil from Asia? *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):e390.

- De Paula SO, Lima DM, de Oliveira França RF, Gomes-Ruiz AC, et al. A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *Arch Virol.* 2008; 153: 2215-23.
- Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirirakul N, Fitton P, Vasanawathana S, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science.* 2010; 328: 745-8.
- Dertzbaugh MT. Genetically engineered vaccines: an overview. *Plasmid.* 1998;39:100-13.
- Dhalia R, Maciel M Jr, Cruz FS, Viana IF, Palma ML, August T, Marques Jr ET. Membrane and envelope virus proteins co-expressed as lysosome associated membrane protein (LAMP) fused antigens: a potential tool to develop DNA vaccines against flaviviruses. *An Acad Bras Cienc.* 2009; 81(4):663-9.
- Ding H, Tsai C, Gutiérrez RA, Zhou F, Buchy P, Deubel V, Zhou P. Superior neutralizing antibody response and protection in mice vaccinated with heterologous DNA prime and virus like particle boost against HPAI H5N1 virus. *PLoS One.* 2011; 6(1):e16563.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. Immunization with DNA. *J Immunol Methods.* 1994; 176(2):145-52.
- Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, Mongkolsapaya J, Screaton G. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(39):16922-7.
- Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, Otten GR, Ulmer JB, Donnelly JJ, Ott G, McDonald DM. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol.* 2000; 165(5):2850-8.
- Durbin AP, McArthur JH, Marron JA, Blaney JE, Thumar B, Wanionek K, Murphy BR, Whitehead SS. rDEN2/4Delta30(ME), a live attenuated chimeric dengue serotype 2 vaccine is safe and highly immunogenic in healthy dengue-naïve adults. *Hum Vaccin.* 2006; 2(6):255-60.
- Durbin AP, Whitehead SS, McArthur J, Perreault JR, Blaney JE Jr, Thumar B, Murphy BR, Karron RA. rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4

- vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. *J Infect Dis.* 2005; 191(5):710-8.
- Edelman R. Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis.* 2007; 45: 56-60.
- Eickhoff CS, Vasconcelos JR, Sullivan NL, Blazevic A, Bruna-Romero O, Rodrigues MM, Hoft DF. Co-administration of a plasmid DNA encoding IL-15 improves long-term protection of a genetic vaccine against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e983.
- Encke J, zu Putlitz J, Geissler M, Wands JR. Genetic immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural proteins of the hepatitis C virus in a murine model. *J Immunol.* 1998; 161(9):4917-23.
- Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe.* 2009;5(4):318-28.
- Figueiredo RMP, Naveca FG, Bastos MS, Melo MN, Viana SS, Mourão MPG, Costa CA, Farias IP. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(4): 667–669.
- Friberg H, Burns L, Woda M, Kalayanarooj S, Endy TP, Stephens HA, Green S, Rothman AL, Mathew A. Memory CD8+ T cells from naturally acquired primary dengue virus infection are highly cross-reactive. *Immunol Cell Biol.* 2011; 89(1):122-9.
- Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ, Liu MA. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med.* 1997; 3(6):362-71.
- Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, Motta MC, Bonaldo MC, Coutinho ES, Freire MS. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(12):1835-46.
- Gao G, Wang Q, Dai Z, Calcedo R, Sun X, Li G, Wilson JM. Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Hum Gene Ther.* 2008; 19(9):927-36.
- Gerberick GF, Cruse LW, Miller CM, Sikorski EE, Ridder GM. Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells

- following allergen and irritant treatment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 146(1):1-10.
- Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ.* 2002; 324(7353):1563-6.
- Gil L, López C, Blanco A, Lazo L, Martín J, Valdés I, Romero Y, Figueroa Y, Guillén G, Hermida L. The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol.* 2009 Feb;22(1):23-30.
- Gomes AL, Wee LJ, Khan AM, Gil LH, Marques ET Jr, Calzavara-Silva CE, Tan TW. Classification of dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. *PLoS One.* 2010; 5 (6):e11267.
- Goncalvez AP, Purcell RH, Lai CJ. Epitope determinants of a chimpanzee Fab antibody that efficiently cross-neutralizes dengue type 1 and type 2 viruses map to inside and in close proximity to fusion loop of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. *J Virol.* 2004; 78(23):12919-28.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480-96.
- Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002;33(4):330-42.
- Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, Georgakopoulos K, Catalan J, Ocran S, Soike K, Ratterree M, Monath TP. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol.* 2001; 75(16):7290-304.
- Guirakhoo F, Pugachev K, Zhang Z, Myers G, Levenbook I, Draper K, Lang J, Ocran S, Mitchell F, Parsons M, Brown N, Brandler S, Fournier C, Barrere B, Rizvi F, Travassos A, Nichols R, Trent D, Monath T. Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J Virol.* 2004; 78(9):4761-75.
- Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M, Arroyo J, Georgakopoulos K, Catalan J, Monath TP. Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol.* 2000; 74(12):5477-85.
- Gupta AK, Lad VJ, Koshy AA. Survival of mice immunized with monoclonal antibodies against glycoprotein e of Japanese encephalitis virus before or after

- infection with Japanese encephalitis, west nile, and dengue viruses. *Acta Virol.* 2008; 52(4):219-24.
- Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Indian J Dermatol.* 2010; 55(1):68-78.
- Guy B, Almond JW. Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008; 31(2-3):239-52.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12):S7-16.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102(6):522-3.
- Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med.* 1977;146:201-17.
- Halstead SB. Dengue. *Lancet.* 2007; 370(9599):1644-52. Review.
- Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31: 830-6.
- Henchal EA, McCown JM, Burke DS, Seguin MC, Brandt WE. Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 1985; 34: 162-9.
- Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, Chang DM, Tai TY, Lai JH. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. *J Immunol.* 2005;174(12):8163-72.
- Holman DH, Wang D, Raviprakash K, Raja NU, Luo M, Zhang J, Porter KR, Dong JY. Two complex, adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14(2):182-9.
- Hsieh MF, Lai SL, Chen JP, Sung JM, Lin YL, Wu-Hsieh BA, Gerard C, Luster A, Liao F. Both CXCR3 and CXCL10/IFN-inducible protein 10 are required for resistance to primary infection by dengue virus. *J Immunol.* 2006; 177(3):1855-63.

- Hu D, Di B, Ding X, Wang Y, Chen Y, Pan Y, Wen K, Wang M, Che X. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virology*. 2011; 8(1):47.
- Imoto J, Konishi E. Dengue tetravalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine*. 2007; 25(6):1076-84.
- Imrie A, Meeks J, Gurary A, Sukhbataar M, Kitsutani P, Effler P, Zhao Z. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. *J Virol*. 2007; 81(18):10081-91.
- Inchauspe G, Vitvitski L, Major ME, Jung G, Spengler U, et al. Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol*. 1997; 16: 185-95.
- Irie K, Mohan PM, Sasaguri Y, Putnak R, Padmanabhan R. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). *Gene*. 1989; 75: 197-211.
- Jacobs MG, Robinson PJ, Bletchly C, Mackenzie JM, Young PR. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J*. 2000;14(11):1603-10.
- Jimenez RO, Fonseca BAL. Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice. *Vaccine*. 2001; 19: 648-654.
- Julander JG, Perry ST, Shresta S. Important advances in the field of anti-dengue virus research. *Antivir Chem Chemother*. 2011; 21(3):105-16.
- Khanam S, Pilankatta R, Khanna N, Swaminathan S. An adenovirus type 5 (AdV5) vector encoding an envelope domain III-based tetravalent antigen elicits immune responses against all four dengue viruses in the presence of prior AdV5 immunity. *Vaccine*. 2009; 27(43):6011-21
- Khanam S, Rajendra P, Khanna N, Swaminathan S. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. *BMC Biotechnol*. 2007;7:10.

- King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, Innis BL. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999; 30(4):718-28.
- Kinney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology*. 2001;44(2-3):176-97.
- Kliks SC, Nimmannitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*. 1988; 38(2):411-9.
- Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, et al. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 1997; 15: 547-552.
- Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, Hayes C. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 1997; 15(5):547-52.
- Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, et al. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine*; 2000; 18: 3166-73.
- Konishi E, Terazawa A, Imoto J. Simultaneous immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own abilities to induce neutralizing antibody in mice. *Vaccine*. 2003; 21(17-18):1826-32.
- Konishi E, Yamaoka M, Kurane I, Mason PW. A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus pre-membrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine*. 2000; 18: 1133-9.
- Krieg AM, Davis HL. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther*. 2001; 3(1):15-24.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. *Cell*. 2002; 108: 717-725.
- Kurane I, Hebblewaite D, Brandt WE, Ennis FA. Lysis of dengue virus-infected cells by natural cell-mediated cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol*. 1984; 52(1):223-30.

- Kurane I, Kontny U, Janus J, Ennis FA. Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Arch Virol.* 1990; 110: 91-101.
- Lai CJ, Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Donau O, Engle RE, Purcell RH. Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody and protection against DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys by passively transferred humanized antibody. *J Virol.* 2007; 81(23):12766-74.
- Lang J. Recent progress on sanofi pasteur's dengue vaccine candidate. *J Clin Virol.* 2009; 46(2):S20-4.
- Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Ennis FA, Rothman AL, Green S. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis.* 2007; 195(8):1108-16.
- Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sánchez J, López C, Silva R, Guillén G, Guzmán MG. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine.* 2007; 25(6):1064-70.
- Lee E, Weir RC, Dalgarno L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. *Virology.* 1997;232(2):281-90.
- Lima DM, de Paula SO, França RF, Palma PV, Morais FR, Gomes-Ruiz AC, de Aquino MT, da Fonseca BA. A DNA vaccine candidate encoding the structural prM/E proteins elicits a strong immune response and protects mice against dengue-4 virus infection. *Vaccine.* 2011 Jan 17;29(4):831-8. Epub 2010 Nov 27.
- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Chiu SC, Lin YS. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* 2002; 169(2):657-64. Erratum in: *J Immunol* 2002; 169(4):2215.
- Lin YL, Chen LK, Liao CL, Yeh CT, Ma SH, Chen JL, Huang YL, Chen SS, Chiang HY. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol.* 1998; 72(1):191-200.
- Lindenbach BD, Rice CM (2001) *Flaviviridae: the viruses and their replication.* In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields' Virology.* Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins. pp. 991-1042.

- Liu MA, Ulmer JB. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet.* 2005; 55:25-40.
- Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev.* 2011; 239(1):62-84.
- Liu WT, Lin WT, Tsai CC, Chuang CC, Liao CL, Lin HC, Hung YW, Huang SS, Liang CC, Hsu HL, Wang HJ, Liu YT. Enhanced immune response by amphotericin B following NS1 protein prime-oral recombinant *Salmonella* vaccine boost vaccination protects mice from dengue virus challenge. *Vaccine.* 2006; 24(31-32):5852-61.
- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Amara A. 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. *J Biol Chem.* 2005; 280(25):23698-708.
- Lu Y, Raviprakash K, Leao IC, Chikhlikar PR, Ewing D, et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. *Vaccine.* 2003; 21: 2178-89.
- Mackenzie J. Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic.* 2005; 6(11):967-77.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(4):564-81.
- Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2008; 225:300-13.
- Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. *FEBS J.* 2007; 274(12):2986-3002.
- Mellado-Sánchez G, García-Cordero J, Luria-Pérez R, Lázaro-Olan L, Santos-Argumedo L, Gutiérrez-Castañeda B, Estrada-García I, Cedillo-Barrón L. DNA priming E and NS1 constructs--homologous proteins boosting immunization strategy to improve immune response against dengue in mice. *Viral Immunol.* 2005;8:709-21.
- Miller N. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther.* 2010; 12: 31-8.
- Ministério da Saúde 2011. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_janeiro_e_março_13_04.pdf

- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 6986-91.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004; 427(6972):313-9.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol*. 2005; 79(2):1223-31.
- Monath TP, Teuwen D, Cetron MS. Yellow fever. In Plotkin S, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 4^a Ed. Philadelphia: Saunders, 2007. P. 1-218.
- Mondini A, de Moraes Bronzoni RV, Nunes SH, Chiaravalloti Neto F, Massad E, Alonso WJ, Lázaro ES, Ferraz AA, de Andrade Zanotto PM, Nogueira ML. Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban dengue 3 outbreak in São Paulo, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(5):e448.
- Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol*. 2007; 81(13):7136-48.
- Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, Khemnu N, Tangthawornchaikul N, Chotiyarnwong P, Sae-Jang K, Koch M, Jones Y, McMichael A, Xu X, Malasit P, Screaton G. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol*. 2006; 176(6):3821-9.
- Mota J, Acosta M, Argotte R, Figueroa R, Méndez A et al. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine*. 2005 23: 3469-76.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005; 3(1):13-22.
- Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:587-619.
- Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv*. 2011; 29(2):239-47.
- Nagesh K, Tripathi, Ambuj Shrivastava, Paban K. Dash and Asha M. Jana Detection of Dengue Virus Methods in Molecular Biology. 2011; 665, 51-64.
- Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virol J*. 2009; 6:211.

- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG (2007) Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica* 22: 358-63.
- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 2007;22(5):358-63.
- Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhão AT, Mota EM, Basílio-de-Oliveira CA, Schatzmayr H, Barth OM, Alves AM. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. *Lab Invest*. 2009; 89(10):1140-51.
- Passos SR, Bedoya SJ, Hökerberg YH, Maia SC, Georg I, Nogueira RM, Souza RV, Marzochi KB. Clinical and laboratory signs as dengue markers during an outbreak in Rio de Janeiro. *Infection*. 2008; 36(6):570-4.
- Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11(4):369-77.
- Phillipotts RJ, Venugopal K, Brooks T. Immunization with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol*. 1996; 141: 743-749.
- Pierson TC, Diamond MS. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med*. 2008; 10:e12.
- Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, et al. (1998) Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immunostimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol* 143: 997-1003.
- Purdy DE, Chang GJ. Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. *Virology*. 2005; 333(2):239-50.
- Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, Sadoff JC, Eckels KH. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis*. 1996; 174(6):1176-84.
- Putnak R, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Hough HS, Chen RC, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garçon N, Gheysen D, Kanesa-Thanan N, McDonnell M, Humphreys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine*. 2005; 23(35):4442-52.

- Putnak R, Fuller J, Vanderzanden L, Innis BL, Vaughn DW. Vaccination of Rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68: 469-476.
- Qi RF, Zhang L, Chi CW. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008; 40(2):91-101.
- Ramanathan MP, Kuo YC, Selling BH, Li Q, Sardesai NY et al. Development of a novel DNA SynCon tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. *Vaccine.* 2009; 27: 6444-53.
- Raviprakash K, Defang G, Burgess T, Porter K. Advances in dengue vaccine development. *Hum Vaccine.* 2009; 5(8):520-8.
- Raviprakash K, Ewing D, Simmons M, Porter KR, Jones TR, Hayes CG, Stout R, Murphy GS. Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. *Virology.* 2003; 315(2):345-52.
- Raviprakash K, Kochel TJ, Ewing DTJ, Simmons M, Phillips I, et al.; Immunogenicity of dengue virus type I DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein. *Vaccine.* 2000; 18: 2426-2434.
- Raviprakash K, Marques E, Ewing D, Lu Y, Phillips I, et al. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology.* 2001; 290: 74-82.
- Raviprakash K, Porter KR, Kochel TJ, Ewing D, Simmons M, et al. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in Rhesus macaques. *J Gen Virol.* 2000; 81: 1569-1667.
- Raviprakash K, Wang D, Ewing D, Holman DH, Block K, Woraratanadharm J, Chen L, Hayes C, Dong JY, Porter K. A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in rhesus monkeys against all four serotypes of dengue virus. *J Virol.* 2008 Jul;82(14):6927-34.
- Rigato PO, de Alencar BC, de Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araújo AF, Machado AV, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O, Rodrigues MM. Heterologous Plasmid DNA Prime-Recombinant Human Adenovirus 5 Boost Vaccination Generates a Stable Pool of Protective Long-Lived CD8+ T Effector Memory Cells

- Specific for a Human Parasite, *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2011; 79(5):2120-30.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998; 352(9132): 971-7.
- Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67(16):2773-86.
- Rodriguez-Barraquer I, Cordeiro MT, Braga C, de Souza WV, Marques ET, Cummings DA. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(1):e935.
- Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology*. 1998; 246: 317-28.
- Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61(5):720-4.
- Ross TM. Dengue virus. *Clin Lab Med*. 2010; 30(1):149-60.
- Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 1999; 257(1):1-6.
- Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*. 2004; 113(7):946-51.
- Samsa MM, Mondotte JA, Iglesias NG, Assunção-Miranda I, Barbosa-Lima G, Da Poian AT, Bozza PT, Gamarnik AV. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog*. 2009; 5(10):e1000632.
- Schatzmayr & Cabral. A virologia no Estado do Rio de Janeiro: uma visão global. In *Epidemias modernas: dengue e Aids*. 2009; p.37, pp111
- Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol*. 1987; 68 (3):853-7.
- Schlub TE, Badovinac VP, Sabel JT, Harty JT, Davenport MP. Predicting CD62L expression during the CD8+ T-cell response in vivo. *Immunol Cell Biol*. 2010; 88(2):157-64. Epub 2009 Oct 27.
- Sedegah M, Jones TR, Kaur M, Hedstrom R, Hobart P, Tine JA, Hoffman SL. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:7648-53.

- Shrestha S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, Harris E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol.* 2004; 78(6):2701-10.
- Shrestha S, Sharar KL, Prigozhin DM, Snider HM, Beatty PR, Harris E. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J Immunol.* 2005 Sep 15;175(6):3946-54.
- Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA et al. (2010) The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog.* 6: e1000823.
- Simmons M, Burgess T, Lynch J, Putnak R. Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy. *Virology.* 2010; 396(2):280-8.
- Simmons M, Murphy GS, Kochel T, Raviprakash K, Hayes CG. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(5):420-6.
- Simmons M, Porter KR, Hayes CG, Vaughn DW, Putnak R. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in rhesus macaques. *J Virol.* 2006; 80(19):9577-85.
- Stephenson. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull World Health Organ.* 2005; 83(4):308-14.
- Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol.* 2006; 87(10):2755-66.
- Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Purtha WE, Oliphant T, Nybakken GE, Schlesinger JJ, Roehrig JT, Gromowski GD, Barrett AD, Fremont DH, Diamond MS. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol.* 2007; 81(23):12816-26.
- Tan GK, Alonso S. Pathogenesis and prevention of dengue virus infection: state-of-the-art. *Curr Opin Infect Dis.* 2009; 22(3):302-8.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992;356:152-154.
- Teixeira MG, Barreto ML. Diagnosis and management of dengue. *BMJ.* 2009; 339:b4338.

- Teixeira MG, Costa Mda C, Barreto F, Barreto ML. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;1:S7-18.
- Teoh BT, Sam SS, Abd-Jamil J, AbuBakar S. Isolation of ancestral sylvatic dengue virus type 1, Malaysia. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(11):1783-5.
- Thomas SJ, Hombach J, Barrett A. Scientific consultation on cell mediated immunity (CMI) in dengue and dengue vaccine development. *Vaccine*. 2009; 27(3):355-68.
- Timofeev AV, Butenko VM, Stephenson JR. Genetic vaccination of mice with plasmids encoding the NS1 non-structural protein from tick-borne encephalitis virus and dengue 2 virus. *Virus Genes*. 2004; 28(1):85-97.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 1993; 259(5102):1745-9.
- Ulmer JB, Sadoff JC, Liu MA. DNA vaccines. *Curr Opin Immunol*. 1996; 8(4):531-6.
- Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 2006; 87(9):2605-14.
- Valdés I, Bernardo L, Gil L, Pavón A, Lazo L et al. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology*. 2009; 394: 249-58.
- van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol*. 2000; 74: 8094-101.
- van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R. Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Int Immunol*. 2003; 15: 119-25.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000; 181(1):2-9.
- Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Endy TP, Mammen MP, Green S, Libraty DH, Ennis FA, Rothman AL, Stephens HA. TNF and LTA gene, allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *J Infect Dis*. 2009; 199(10):1442-8.

- Vogel FR, Sarver N. Nucleic acid vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8(3):406-10.
- Wahala WM, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM (2009) Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* 392: 103-13.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 518-28.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(7):518-28.
- WHO, Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. 2009
- WHO, Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: World Health Organization. 1997
- Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ, Ulmer JB. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol.* 2000; 164(9):4635-40.
- Woodland DL. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol.* 2004; 25(2):98-104.
- Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou HY, Huang JL, Shiao MF, Sytwu HK. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine.* 2003; 21(25-26):3919-29.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000; 6(7):816-20.
- Yauch LE, Prestwood TR, May MM, Morar MM, Zellweger RM et al. CD4+ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol.* 2010; 185: 5405-16.
- Yauch LE, Zellweger RM, Kotturi MF, Qutubuddin A, Sidney J, Peters B, Prestwood TR, Sette A, Shresta S. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol.* 2009; 182(8):4865-73.

- Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(3):1053-7.
- Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol.* 2003;10(11):907-12.
- Zheng Q, Fan D, Gao N, Chen H, Wang J, Ming Y, Li J, An J. Evaluation of a DNA vaccine candidate expressing prM-E-NS1 antigens of dengue virus serotype 1 with or without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in immunogenicity and protection. *Vaccine.* 2011; 29(4):763-71.

Capítulo 9

9. ANEXOS

9.1. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

9.1.1. Ampicilina (1000X) (1mL)

100 mg de ampicilina

1mL de água deionizada

Esterelizar por filtração (membrana de 0,22 µm)

9.1.2. Gentamicina (100X) (1mL)

1 ampola (80mg gentamicina) – 2mL (

Adicionar 18mL água bidestilada estéril

Estocar a 4°C

9.1.3. Meio 199 com sais de Earle (100mL) (Manutenção das células Vero)

10mL de meio 199 com sais de Earle 10X (Sigma)

2,5% de NaHCO_3 4,4%, pH 7,0

5% de SFB

1% Gentamicina

Completar volume com água bidestilada

Todo material foi usado foi previamente esterelizado

9.1.4. Meio 199 com sais de Earle (100mL) (etapa de neutralização - PRNT)

10mL de meio 199 com sais de Earle 10X (Sigma)

0,5% de NaHCO_3 4,4%, pH 7,0

2,5% de HEPES (2,5 mM)

5% de SFB

1% Gentamicina

Completar volume com água bidestilada

9.1.5. Meio 199 com sais de Earle, 3% carboximetilcelulose (100mL) (PRNT)

10mL de meio 199 com sais de Earle 10X (Sigma)

2,5% de NaHCO_3 4,4%, pH 7,0

5% de SFB

1% Gentamicina

3% de Carboximetilcelulose (CMC)
Completar volume com água bidestilada

9.1.6. Meio DMEM (1L)

10g de DEMEM (Sigma)
2,2g de $\text{Ca}(\text{HCO}_2)_2$
2g HEPES
Dissolver em volume menor de água deionizada
Ajustar o pH 7,4
Completar o volume com água deionizada
Esterilizar por filtração (membrana de 0,22 μm)

9.1.7. Meio LB (*Luria Bertani*) (1L) (Meio de manutenção - bactérias)

10g de triptona
5g de extrato levedura
10g NaCl
Completar volume com água deionizada
Esterilizar por autoclavação a 120°C por 15 min.

9.1.8. Meio TB (1L) (1L) (Meio de expansão em larga escala - bactérias)

12g de triptona
24g de extrato levedura
10g NaCl
4mL de glicerol
Completar volume com água deionizada para 900mL
Esterilizar por autoclavação a 120°C por 15 min.
No momento do uso, adicionar 100mL de solução 0,17M de KH_2PO_4 e 0,72M de K_2HPO_4 , previamente esterilizado por autoclavação

9.1.9. PBS 1X (1L)

8g NaCl
0,2g KCl
1,44g Na_2HPO_4
0,24g KH_2PO_4

Ajustar o pH 7,4

Completar volume com água deionizada

9.1.10. Quetamina/Xilasina (1mL)

150µL de quetamina 10%

40 µL de xilasina 10%

Completar volume com solução salina estéril comercial

9.1.11. Solução salina BSS (1L)

8g de NaCl

0,4g de KCl

0,012g de CaCl₂

0,154 de MgSO₄.7H₂O

0,39g de Na₂HPO₄.12H₂O

0,15g de KH₂PO₄

1,1g de glicose

0,0025g de vermelho de fenol

Ajustar para pH7,4

Completar o volume com água deionizada

Esterilizar por filtração (membrana 0,22µm)

9.1.12. Solução salina BSS-CMF (1L)

8g de NaCl

0,4g de KCl

0,1g de Na₂SO₄

0,39g de Na₂HPO₄.12H₂O

0,15g KH₂PO₄

1,1g de glicose

0,0025g de vermelho de fenol

Ajustar para pH7,4

Completar o volume com água deionizada

Esterilizar por filtração (membrana 0,22µm)

9.1.13. *Tripsina (100mL)*

10mL de tripsina-EDTA 10X (Invitrogen)

Completar volume com tampão BSS-CMF

Esterilizar por filtração (membrana 0,22µm)

9.1.14. *Tampão de lavagem TNT (100mL) (Imunoprecipitação)*

5mL de Tris-HCl 1M, pH 7,5

15mL de NaCl 1M

0,2mL de EDTA 0,5 M

0,25mL Triton X-100

0,1mL de PMSF 20 mg/ mL

2,5mL 40 mg/mL BSA

Completar o volume com água deionizada

9.1.15. *Tampão de lavagem TN (100mL) (Imunoprecipitação)*

5mL de Tris-HCl 1M, pH 7,5

15mL de NaCl 1M

Completar o volume com água deionizada

9.1.16. *Tampão de amostra para PAGE*

1mL de Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

0,8mL de glicerol 100%

1,6mL SDS 10 %

0,4mL de Beta-mercaptoetanol

0,4mL azul de bromofenol 1%

15 mL NaCl 1M

8mL de água deionizada

9.2. ARTIGO CIENTÍFICO

DNA Vaccines against Dengue Virus Type 2 Based on Truncate Envelope Protein or Its Domain III

Adriana S. Azevedo¹, Anna M. Y. Yamamura², Marcos S. Freire², Gisela F. Trindade³, Myrna Bonaldo³, Ricardo Galler², Ada M. B. Alves^{1*}

1 Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Tecnologia Viroológica, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratório de Biologia Molecular de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Two DNA vaccines were constructed encoding the ectodomain (domains I, II and III) of the DENV2 envelope protein (pE1D2) or only its domain III (pE2D2), fused to the human tissue plasminogen activator signal peptide (t-PA). The expression and secretion of recombinant proteins was confirmed *in vitro* in BHK cells transfected with the two plasmids, detected by immunofluorescence or immunoprecipitation of metabolically labeled gene products, using polyclonal and monoclonal antibodies against DENV2. Besides, results reveal that the ectodomain of the E protein can be efficiently expressed *in vivo*, in a mammalian system, without the prM protein that is hypothesized to act as a chaperonin during dengue infection. Balb/c mice were immunized with the DNA vaccines and challenged with a lethal dose of DENV2. All pE1D2-vaccinated mice survived challenge, while 45% of animals immunized with the pE2D2 died after infection. Furthermore, only 10% of pE1D2-immunized mice presented some clinical signs of infection after challenge, whereas most of animals inoculated with the pE2D2 showed effects of the disease with high morbidity degrees. Levels of neutralizing antibodies were significantly higher in pE1D2-vaccinated mice than in pE2D2-immunized animals, also suggesting that the pE1D2 vaccine was more protective than the pE2D2.

Citation: Azevedo AS, Yamamura AMY, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, et al. (2011) DNA Vaccines against Dengue Virus Type 2 Based on Truncate Envelope Protein or Its Domain III. PLoS ONE 6(7): e20528. doi:10.1371/journal.pone.0020528

Editor: Mauricio Martins Rodrigues, Federal University of São Paulo, Brazil

Received: February 8, 2011; **Accepted:** May 3, 2011; **Published:** July 11, 2011

Copyright: © 2011 Azevedo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by PDTIS-FIOCRUZ, IOC-FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq and CNPq-PRONEX grants. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ada@ioc.fiocruz.br

Introduction

Dengue is a mosquito-borne viral disease spread widely in tropical and subtropical regions in the world. It has been estimated that over 2.5 billion people live in areas of infection risk [1,2]. In Brazil, where climatic conditions favor proliferation of the mosquito *Aedes aegypti*, the main vector of dengue viruses (DENV) [3], the disease was reintroduced in 1986 and since then dengue became a public health problem, with more than 7 million reported cases until 2010 [4,5]. Virus infection can be asymptomatic or produce a broad spectrum of effects, including a mild febrile illness, the dengue fever (DF), or severe disease forms, the dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) [6].

The DENV are enveloped viruses, which belong to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, and consist of four antigenically distinct serotypes (DENV1-4) [7]. The virus genome is composed of a positive single-stranded RNA molecule, which codes a polyprotein precursor that is processed to produce three structural proteins, capsid (C), premembrane/membrane (prM/M) and envelope (E), and seven nonstructural (NS) proteins, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5 [8]. The transmembrane E glycoprotein is the major component of virion surface and it is associated with numerous biological activities, since it acts as a

binding protein, interacting with receptors present on host cell surface, and mediate membrane fusion of the envelope virus and host cell membrane [9,10]. It is organized in 90 homodimers that become trimers at the fusion state [11]. Each monomer is composed of domains I, II and III, in which the domain III is responsible for the virus-cell interaction and trigger endocytosis of the viral particle [11–13]. Consequently, this protein is the main target for the induction of neutralizing antibodies, several of them against epitopes present in domain III [14]. In fact, most vaccines being developed against dengue virus are based on the induction of immune responses directed to the E protein from all four serotypes [15].

Several vaccine strategies have been proposed to control dengue disease, including classical approaches, as inactivated or live attenuated virus and subunit antigens, as well as new generation vaccines, such as chimeric engineered viruses and DNA immunization [10,16]. The DNA vaccine approach has the advantage of *in vivo* antigen expression, leading to proper viral protein folding with post-translation modifications, such as N-linked glycosylation, which may be important for the induction of protective immune responses [17,18]. DNA vaccines based on the E protein from dengue virus have been reported by several researchers [19–29], and most of them include prM and E gene sequences, since the prM seems to act as a chaperonin that may be

necessary for correct envelope protein folding during virus exit from its assembly site through the Golgi system [27,29]. However, several of these DNA vaccines induced low levels of neutralizing antibodies against dengue virus with consequently partial or short-term protection in different animal models [19,21,23,27]. Moreover, most of these vaccines were constructed using the natural virus sequences that act as signal peptides for the secretion of these proteins, which may be not so efficient in the context of DNA vaccination.

Therefore, in the present work, we constructed two DNA vaccines encoding the ectodomain (domains I, II and III) of the DENV2 envelope protein (pE1D2) or only its domain III (pE2D2), fused to the human tissue plasminogen activator signal sequence (t-PA). For the expression of the ectodomain, corresponding to the 80% N-terminal protein sequence, the hydrophobic stem-anchor region of the envelop protein [30] was removed, in order to increase the efficiency of expression and secretion of the recombinant protein. On the hand, the t-PA sequence was used because of its efficiency in mediating secretion of recombinant proteins and antibody production in other DNA vaccines constructed by our group against dengue virus [31–33]. Results demonstrated that these plasmids were able to drive *in vitro* expression and secretion of recombinant proteins in mammalian cells. Both vaccines induced neutralizing antibody against DENV2 in Balb/c mice, although levels detected after immunization with pE1D2 were significantly higher than with pE2D2. In addition, all pE1D2-vaccinated mice survived challenge with a lethal dose of DENV2, while several animals immunized with pE2D2 died after virus infection or presented high morbidity rates.

Materials and Methods

Virus and Cells

The dengue 2 virus, strain New Guinea C (NGC DENV2), was used for the isolation of sequences coding fragments of the E protein and for challenge assays. The DENV2 44/2 [34] was used for PRNT₅₀ assays. Virus propagation was carried out in Vero cells cultivated in Medium 199 with Earle salts (E199, Sigma, USA) buffered with sodium bicarbonate and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, USA). For the expression analysis of recombinant proteins *in vitro*, baby hamster kidney cells (BHK-21) were propagated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen), supplemented with 5% FBS.

Construction of DNA vaccines

Two DNA vaccines were constructed encoding domains I, II and III of the E protein or only the domain III, named pE1D2 and pE2D2, respectively. These sequences were cloned in the pcTPA plasmid [31], a modified pcDNA3 vector (Invitrogen) which contains the human tissue plasminogen activator signal sequence (t-PA). Sequences were amplified by PCR using as template a previously constructed plasmid, pYFM/Nar, containing the full-length prM-E genes of the NGC DENV2 [34]. Sense and antisense primers, 5'GGGGATATCATGCGTTGCATAGGAA-TATC3' and 5'GGGGTCTAGATTAGATAGAAGTTCCTTC3', which anneals on the NGC DENV2 sequence (GenBank M29095), between nucleotides 937 to 956 and 2115 to 2130, respectively, were used for amplification of the E1D2 sequence, which corresponds to amino acids 1–398 of the E protein [35]. For amplification of the E2D2 sequence, encoding domain III of the E protein (amino acids 296–398), the sense primer 5'GGGGGATATCGGAATGTCATACTCTATG 3', which anneals at the nucleotide 1822 to 1839 in the NGC DENV2 sequence, was used together with the antisense primer described above. Sense and

antisense primers contained *EcoRV* and *XbaI* restriction sites, respectively. The PCR products were electrophoresed on a 1% agarose gel, recovered with glass beads, genclean (Stratagene, USA), restricted with *EcoRV* and *XbaI* and ligated to the pcTPA previously digested with the same enzymes. All recombinant plasmids were screened by restriction mapping and confirmed by sequencing (ABI Prism dye terminator, Applied Biosystems, USA, performed by the Genomic Platform DNA Sequencing, PDTIS-Fiocruz). Recombinant plasmids were isolated from transformed *Escherichia coli*, DH5- α strain, and purified by Qiagen Plasmid Giga Kit (Qiagen, Germany), following manufacturer's instruction. DNA concentrations were determined by measuring optical density at 260 nm and integrity of plasmids was checked by agarose gel electrophoresis. Plasmids were suspended in sterile water and stored at -20°C until use.

Cell transfection and Immunofluorescence assay

BHK cells were transiently transfected with the DNA vaccines pE1D2 and pE2D2 or the control plasmid pcTPA, as previously described [33]. Briefly, 2×10^4 cells/well were plated in chamber slides (Nunc, Denmark) with Optimem medium (Invitrogen) and transfected with 0.2 μg of each DNA using lipofectamine (Invitrogen) under conditions suggested by the manufacturer. Cell monolayers were then maintained over night at 37°C with 5% CO_2 . In the following day, cells were washed in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.6% saponin for 10 min and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.2% saponin for 15 min. Cells were then incubated for 1 h at 37°C with DENV2 hyperimmune mouse ascitic fluid (ATCC, USA), diluted 1:1500, or the monoclonal anti-DENV2 3H5 (ATCC), diluted 1:500. Slides were then washed three times and incubated for 1 h at 37°C with fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG (Southern Biotechnology, USA), diluted 1:100, washed again and mounted with Vectashield medium (Vector Laboratories Inc., USA). Cells were visualized in a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E600).

Metabolic labeling and immunoprecipitation

For protein analysis, 5×10^5 BHK-21 cells were transfected with 2 μg of each DNA as described above. In the following day, cells were metabolically labeled using [^{35}S] methionine (80 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) for 1:30 h, in methionine-deficient RPMI 1640 medium (Sigma) without FBS. Culture supernatants were then immunoprecipitated with DENV2 hyperimmune mouse ascitic fluid, as previously described [36]. Protein samples were analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis. Gel was dried and exposed to Kodak X Omat film for visualization of the labeled proteins.

Immunization of Balb/c mice

Experiments with mice were conducted in compliance with ethical principles in animal experimentation stated in the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Institute's Animal Use Ethical Committee (approval ID: L-067/08). Balb/c mice, 4 to 6 weeks old, were immunized by the intramuscular (i.m.) route with 100 μg of recombinant plasmids (50 μg in each tibialis posterior muscles), prepared in 100 μL of phosphate buffer saline (PBS) and using 27-gauge needles. Each mouse group (n = 10) received two doses of the DNA vaccine (pE1D2 or pE2D2) or the pcTPA vector, given 2 weeks apart. Two independent experiments were performed for each mouse group. Animals were bled by retro-orbital puncture, before inoculation (pre-immune sera), two weeks after the second immunization and 21 days after challenge, when all survived

animals were sacrificed. Serum samples were prepared and stored at -70°C until use.

Plaque reduction neutralization test (PRNT₅₀)

Plaque reduction neutralization tests (PRNT) were carried out on Vero cells, in 96-well plates, as previously described [37]. Briefly, serum samples were serially diluted (from 1:5 to 1:640) in 50 μL of E199 medium followed by the addition of 50 μL of DENV2, corresponding to approximately 30 PFU, and incubated at 37°C for 1 h. Suspension of Vero cells were then added (2.5×10^4 cells/well) and plates were incubated at 37°C for 3 h. After this period, media were discarded, cells were overlaid with 100 μL of E199 medium with 3% carboxymethylcellulose and plates were incubated for 7 days at 37°C in 5% CO_2 . Cells were then fixed with 10% formalin, stained with crystal violet and plaques were counted. Neutralizing antibody titers were expressed by 50% of plaque reduction (PRNT₅₀).

Mouse challenge with DENV2

Two weeks after the second DNA dose, mice were challenged with a mouse brain adapted sample of NGC DENV2. Animals were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine [38] and intracerebrally (i.c.) inoculated with 30 μL of $4.32 \log_{10}$ PFU of DENV2, which corresponds to 3.8 LD₅₀, diluted in E199 medium supplemented with 5% FCS. Immediately after challenge procedure, the inoculum was back-titrated in Vero cells as described previously [34]. One group of non-immunized animals, challenged with DENV2, was also included as negative control. Animals were monitored for 21 days for mortality and morbidity, mainly the appearance of leg paralysis, alterations in spinal column and deaths. The evaluation of different morbidity degrees in each animal group was performed using a scale ranging from 0 to 3 (0 = none, 1 = mild paralyzes in one hind leg or alteration of the spinal column with a small hump, 2 = severe paralyzes in one hind leg and alteration of the spinal column with a small hump or severe paralyzes in both hind legs, 3 = two severe hind leg paralyzes and deformed spinal column or death). Two independent challenge tests were performed in the same experimental conditions.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, USA), version 5.02. For the analysis of survival and morbidity rates, statistical significances were evaluated by chi-

square test, while differences in the degree of morbidity and PRNT₅₀ titers were analyzed by Mann-Whitney test. Values were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Construction of the recombinant plasmids pE1D2 and pE2D2

Two DNA vaccines (pE1D2 and pE2D2) were constructed encoding fragment sequences from the NGC DENV2 envelope protein. The plasmid pE1D2 contains the truncated sequence that encodes the first 398 amino acids, corresponding to domains I, II and III of the E protein, without the hydrophobic stem-anchor region, while the pE2D2 plasmid encodes only its domain III (from amino acid 296 to 398) (Fig. 1). Both fragments were cloned in frame with the t-PA signal sequence, which was used to target recombinant proteins into endoplasmic reticulum and its secretion to extracellular space.

Analysis of the *in vitro* expression of recombinant proteins

The *in vitro* expression of recombinant proteins was evaluated in BHK-21 cells transiently transfected with the plasmids pE1D2 and pE2D2. Immunofluorescence assays revealed that cells transfected with these plasmids showed positive reaction with a hyperimmune ascitic fluid that recognized several epitopes of the DENV2 E protein during infection (Figs. 2A and 2B). The two recombinant proteins were also detected by the monoclonal 3H5 antibody, which is specific for a neutralizing epitope present on the domain III of the DENV2 envelope protein (Figs. 2D and 2E). As expected, no reaction was detected in control cells transfected with the pcTPA plasmid, using either the polyclonal or the monoclonal antibodies against DENV2 (Figs. 2C and 2F).

The recombinant proteins were also observed in culture supernatants of transfected cells metabolically labeled, which were immunoprecipitated with DENV2 hyperimmune ascitic fluid, thus revealing their secretion with expected molecular weights (approximately 44 kDa and 12 kDa for pE1D2 and pE2D2, respectively) (Fig. 3).

Protective efficacy of the DNA vaccines in Balb/c mice

Balb/c mice were immunized by the i.m. route with one of the two different DNA vaccines and challenged by i.c. inoculation

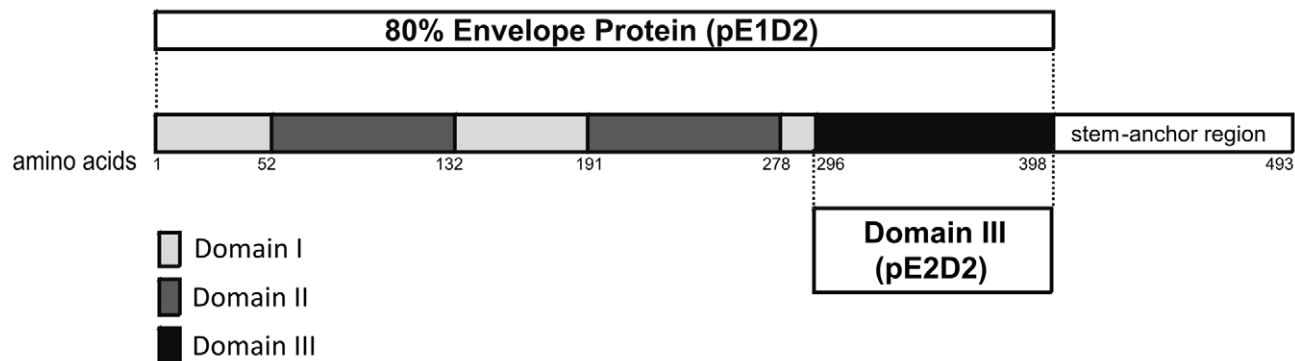


Figure 1. Schematic representation of the DENV2 envelope protein sequence. The protein is composed by the three domains (I, II and III) and the steam-anchor region (adapted from Modis *et al.* [12]). The sequence coding 80% of the N-terminal E protein, which contains domains I, II and III, was used for engineering the pE1D2 plasmid, while the pE2D2 plasmid encoded only the domain III sequence. Numbers indicated in the figure highlight amino acids corresponding the beginning and end positions at the primary protein sequence that compose each domain. doi:10.1371/journal.pone.0020528.g001

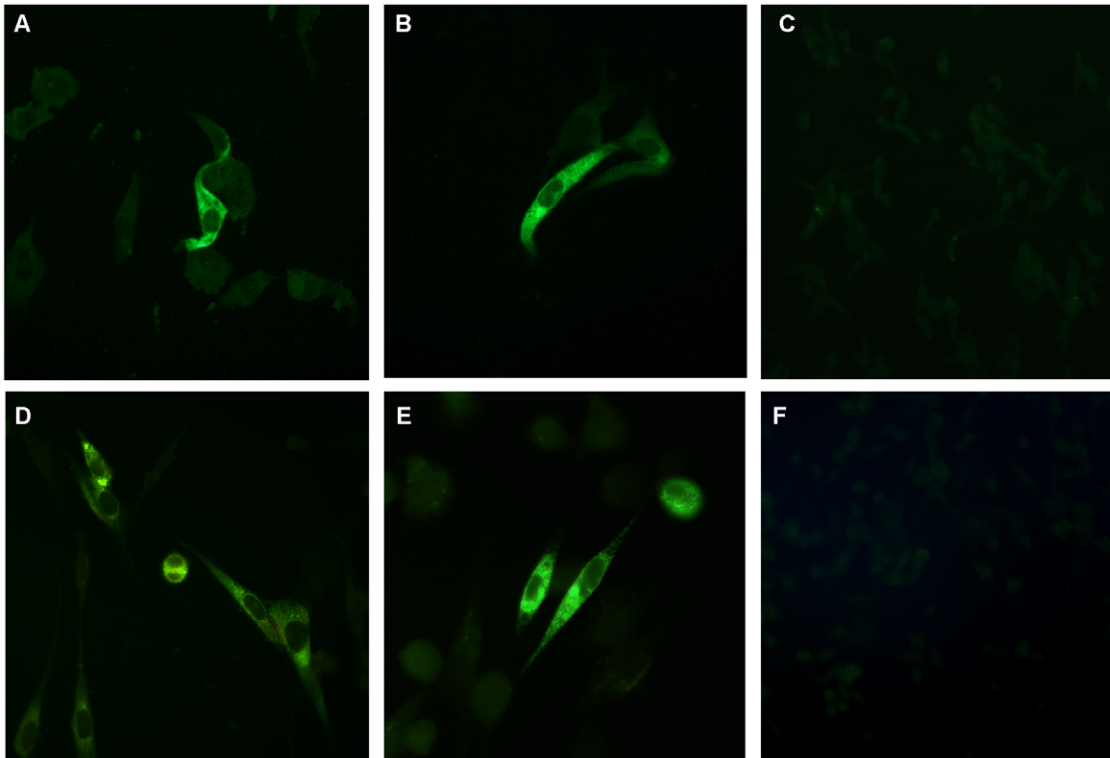


Figure 2. Analysis of the expression *in vitro* of recombinant proteins. BHK cells were transfected with plasmids pE1D2 (A, D), pE2D2 (B, E) and pcTPA (C, F). Cells were permeabilized, fixed and treated with DENV2 hyperimmune mouse ascitic fluid (A–C) or the monoclonal DENV2 3H5 antibody (D–F), followed by incubation with anti-mouse fluorescein-conjugated goat IgG. Magnification 1000x (A, B, D, E) and 400x (C, F). doi:10.1371/journal.pone.0020528.g002

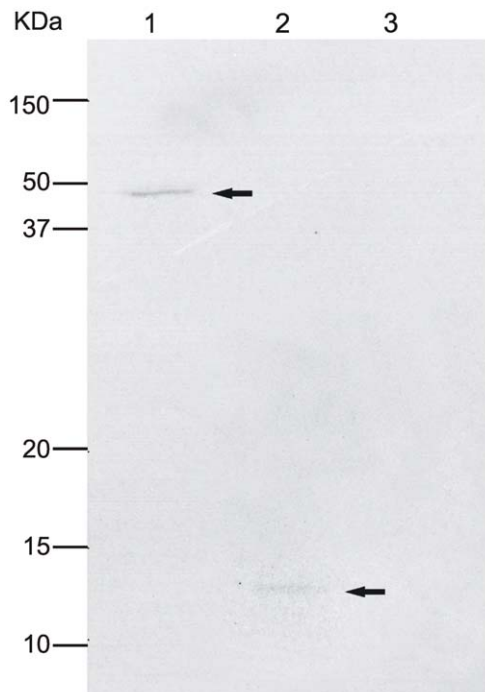


Figure 3. Electrophoretic analysis of recombinant proteins secreted by transfected BHK cells. Cells were metabolically labeled with [³⁵S] methionine and culture supernatants were immunoprecipitated with DENV2 hyperimmune mouse ascitic fluid. Culture supernatants of cells transfected with pE1D2 (lane 1), pE2D2 (lane 2) or pcTPA (lane 3). Arrows indicate recombinant proteins. doi:10.1371/journal.pone.0020528.g003

with a lethal dose of a mouse brain adapted NGC DENV2. As control groups, non-immunized or pcTPA-inoculated animals were also challenged with DENV2. Animals were monitored the following 21 days after challenge for the development of leg paralysis, alterations in spinal column and death. Two independent challenge experiments were performed for each vaccine at the same conditions and data are summarized in figures 4 and 5.

All animals vaccinated with the pE1D2 plasmid survived challenge while 45% of mice immunized with the plasmid pE2D2 died after virus inoculation, and such differences were statistically significant ($p = 0.0027$) (Fig. 4). On the other hand, only 15% and 10% of animals in control groups (non-immunized or inoculated with the control vector pcTPA, respectively) survived after virus challenge (Fig. 4). All vaccinated animal groups, pE1D2 or pE2D2, presented significant differences in survival rates when compared to control groups ($p < 0.0001$). Furthermore, control animals showed severe clinical signs of infection, starting at the 8th day after challenge, and reached maximal levels of morbidity (100% and 90% in non-immunized or pcTPA-inoculated mice, respectively) in the following days (Fig. 5A). In contrast, only 10% of mice immunized with the pE1D2 vaccine presented clinical signs of the disease after the 19th day post infection (Fig. 5A) with less severe morbidity degrees (Fig. 5B). Nevertheless, animals inoculated with pE2D2 presented clinical signs of infection from days 7 through 12 post challenge (65% of morbidity) (Fig. 5A). In this group, 45% of mice presented the highest severity of neurological signs (degree 3) and another 20% showed morbidity ranging from degree 1 to 2 (Fig. 5B). The differences between pE1D2- and pE2D2-vaccinated mouse groups were statistically significant, concerning either morbidity rates ($p < 0.0001$) or the severity of the disease ($p = 0.0002$). However, both groups showed

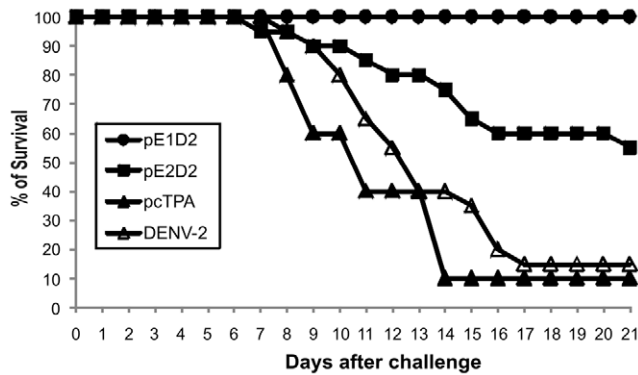


Figure 4. Percentage of survival of Balb/c mice immunized with pE1D2 and pE2D2 and challenged with DENV2. Mice were i.m. immunized with two DNA doses and challenged 4 weeks after the first plasmid inoculation. Non-immunized and pcTPA-injected mice followed the same virus infection procedure. Mice were daily monitored and deaths were recorded. Differences between pE1D2- and pE2D2-vaccinated animals were statistical significant ($p=0.0027$), as well as between these groups and control animals ($p<0.0001$). Data represent compilation of two independent experiments, with groups of 10 animals in each test (n=20). doi:10.1371/journal.pone.0020528.g004

significant differences in the degree of morbidity comparing to control mice inoculated with the vector pcTPA ($p<0.0001$ and $p=0.0051$, for pE1D2- and pE2D2-vaccinated animals, respectively).

Neutralizing antibodies elicited by the DNA vaccines

The humoral immune response generated after immunization of Balb/c mice with the two DNA vaccines was analyzed by the presence of neutralizing antibodies. Serum samples from all vaccinated mice were collected two weeks after the second DNA dose, as well as from animals that survived challenge, obtained 21

days post infection, and titrated for neutralizing antibodies (PRNT₅₀) using a different DENV2 isolate. Mice immunized with the pE1D2 vaccine presented significantly higher PRNT₅₀ titers when compared to animals inoculated with the pE2D2 ($p=0.0029$) (Fig. 6). Furthermore, the DENV2 virus challenge induced a remarkable increase in the levels of neutralizing antibodies in pE1D2-vaccinated mice, in which most of them (95%) reached the maximal neutralization titer used in this assay ($1\geq 640$). In contrast, pE2D2-vaccinated animals that survived virus infection (11 mice) presented a broad range of neutralizing antibody levels after challenge and only six of them (55%) showed maximum PRNT titers (Fig. 6).

As expected, pre-immune serum samples and sera collected from pcTPA-inoculated mice did not present detectable neutralizing antibody titers against DENV2 (data not shown).

Discussion

In the present report we describe the construction of two DNA plasmids encoding the ectodomain (domains I, II and III) of the DENV2 envelope protein (pE1D2) or its domain III (pE2D2), fused to the t-PA signal peptide, in order to study the potential of such vaccines to induce antibody responses and protection in mice. The E protein was chosen since it is the major protein present on the surface of virus particle and it contains several epitopes that elicit neutralizing antibodies against DENV [39].

The expression of recombinant proteins was evaluated *in vitro* by the transfection of BHK cells with the two plasmids and detected by immunofluorescence assays. Results indicate that these DNA vaccines drove correct expression of such proteins in mammalian cells, since they were recognized by a polyclonal anti-dengue ascitic fluid that contains antibodies reacting to epitopes present on the DENV2 envelope protein during virus infection in different cells [27,40,41]. Furthermore, the proteins expressed by transfected cells were also recognized by the monoclonal antibody 3H5 [42], which is specific to a neutralizing epitope present on the domain III of the DENV2 envelope protein [43], thus revealing

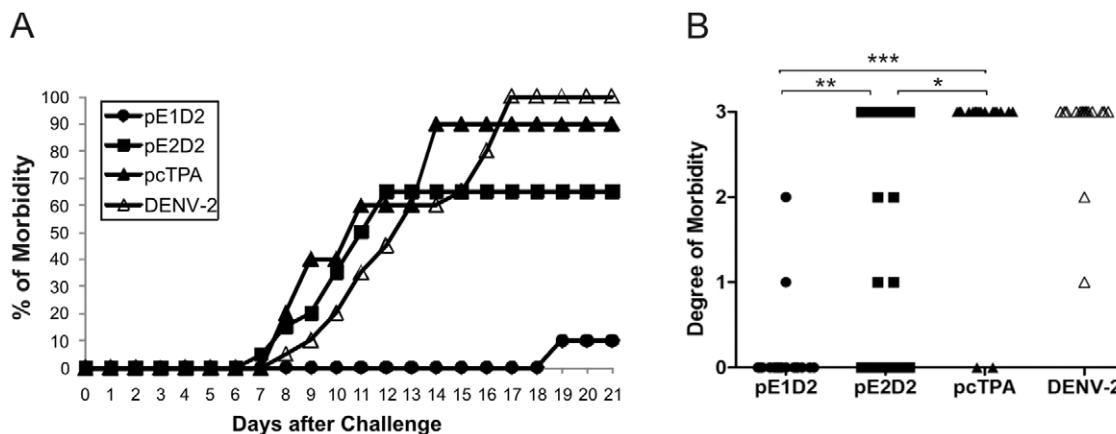


Figure 5. The morbidity in vaccinated mice after DENV2 challenge. The percentage (A) and degree (B) of morbidity of Balb/c mice immunized with pE1D2, pE2D2 and controls groups (non-immunized and pcTPA-inoculated animals) were analyzed after i.c. challenge with DENV2. Clinical signs of infection, mainly hind leg paralysis, alterations in spinal column and deaths, were monitored during 21 days post challenge (A). Differences in morbidity rates between pE1D2- and pE2D2-vaccinated mice were statistical significant ($p<0.0001$), as well as between pE1D2 and control animals ($p<0.0001$). The semi-quantitative analysis of morbidity degrees after virus challenge (B) were performed using a subjective scale ranging from 0 to 3 (0 = none, 1 = mild paralyzes in one hind leg or alteration of the spinal column with a small hump, 2 = one severe hind leg paralyzes and alteration of the spinal column with a small hump or two severe hind leg paralyzes, 3 = two severe hind leg paralyzes and deformed spinal column or death). Asterisks indicate statistically significant differences between vaccinated animals and mice inoculated with the control vector pcTPA (* $p=0.0051$; ** $p=0.0002$; *** $p<0.0001$). Data represent compilation of two independent experiments, with groups of 10 animals in each test (n=20). doi:10.1371/journal.pone.0020528.g005

et al. [56] showed that such vaccines can induce humoral immune responses against all virus serotypes, with the production of neutralizing antibodies. However, in this study neutralizing antibody levels was not evaluated by PRNT₅₀ assays, as performed in our work, and mice were not challenged with DENV in order to evaluate protection [56]. On the other hand, Mota *et al.* [57] using a combination of four DNA vaccines with the domain III of each virus serotype, have revealed protection induced by such vaccines. However, authors used indirect challenge models, by analyzing suckling mice inoculated with dengue viruses that were pre-incubated with immunized mouse serum samples, which may not reproduce what happens with adult animals [57]. In addition, the humoral immune response induced by such vaccines was of low magnitude, evaluated by ELISA, and the presence of neutralizing antibodies was not quantified [57].

The protective efficacy of our DNA vaccines was investigated by challenge tests with a lethal dose of a mouse brain adapted DENV2 isolate. Although such mouse challenge model, with i.c. virus inoculation, is quite distinct to what occur with humans, we choose it because it is the most widely used model for vaccines tests against dengue virus [19,20,22,34,58,59] and, therefore, we could compare our results with those described in these studies.

In accordance to the levels of neutralizing antibodies observed in pE1D2-immunized mice, this animal group also showed high protective rates. Indeed, all Balb/c mice vaccinated with such plasmid survived challenge and only two animals (10%) presented some minor evidence of infection. On the other hand, protection conferred by the pE2D2 plasmid was only partial, since most of animals (65%) immunized with such vaccine showed clinical signs of infection after virus challenge and 45% of mice died in the following days. The pre-existing immunity in pE1D2-vaccinated

mice is probably the basis for the observed protection, given the significant increase of antibody titers after virus challenge, which indicates the activation of immunological memory with rapid and strong secondary immune response, may have also contributed for such protection. However, we could not establish a direct correlation between morbidity degrees observed after challenge in animals immunized with the pE2D2 and their PRNT titers. Previous reports have shown that immunization with monoclonal antibodies against dengue virus with strong neutralizing activities *in vitro* induce different degrees of protection *in vivo* [60].

These studies suggested that the levels of neutralizing antibodies are not the only parameter to be investigated, since the stoichiometry of antibody binding may also be important for protection [60]. On the other hand, passive immunization of mice inoculated with sera collected from pE1D2-vaccinated animals revealed partial protection after virus challenge (34%), while the mean time to death was protracted (data not shown). Thus, our results suggest that, although neutralizing antibodies are important for protection against dengue virus, other branches of the immune response may also play a role in such protection. In fact, some reports have shown that cellular immune responses, including the activation of TCD4+ and TCD8+ cells, seem to be involved in protection against DENV [61–63].

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ASA AMBA. Performed the experiments: ASA AMYY GFT. Analyzed the data: ASA MSF MB RG AMBA. Contributed reagents/materials/analysis tools: MSF MB AMBA. Wrote the paper: ASA RG AMBA.

References

- Gubler DJ (2002) The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* 33: 330–42.
- Guzmán MG, Kouri G (2002) Dengue: an update. *The Lancet Infectious Disease* 2: 33–42.
- Teixeira MG, Costa MC, Barreto F, Barreto ML (2009) Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad Saude Publica* 25: 7–18.
- Coelho GE (2010) Secretaria de vigilância em saúde, Brasil. Available: http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/expoepi_giovanini.pdf. Accessed 4 Feb 2011.
- Nogueira RM, de Araújo JM, Schatzmayr HG (2007) Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. *Rev Panam Salud Publica* 22: 358–63.
- Edelman R (2005) Dengue and dengue vaccines. *J Infect Dis* 191: 650–3.
- Monath TP, Tsai TF (1997) Flaviviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology* Churchill Livingstone Inc. pp 1133–1179.
- Lindenbach BD, Rice CM (2001) Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields' Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 991–1042.
- Chang GJJ, Davis BS, Hunt AR, Holmes DA, Kuno G (2001) Flavivirus DNA vaccines: Current status and Potential. *Ann NY Acad Sci* 951: 272–85.
- Kinney RM, Huang CYH (2001) Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. *Intervirology* 1: 176–197.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, et al. (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. *Cell* 108: 717–725.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2003) A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6986–91.
- Suksanpaisan L, Susantat T, Smith DR (2009) Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci* 4: 16–17.
- Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, et al. (2010) The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog* 6: e1000823.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR (2007) Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 5: 518–28.
- Edelman R (2007) Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis* 45: 56–60.
- Boyle JS, Koniars C, Lew AM (1997) Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol* 9: 1897–906.
- Inchauste G, Vitvitski L, Major ME, Jung G, Spengler U, et al. (1997) Plasmid DNA expressing a secreted or a nonsecreted form of hepatitis C virus nucleocapsid: comparative studies of antibody and T-helper responses following genetic immunization. *DNA Cell Biol* 16: 185–95.
- Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, et al. (1997) Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 15: 547–552.
- Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, et al. (1998) Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immunostimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol* 143: 997–1003.
- Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, et al. (2000) A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in *Aotus* monkeys. *Vaccine* 18: 3166–73.
- Jimenez RO, Fonseca BAL (2001) Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice. *Vaccine* 19: 648–654.
- Raviprakash K, Porter KR, Kochel TJ, Ewing D, Simmons M, et al. (2000) Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in Rhesus macaques. *J Gen Virol* 81: 1569–1667.
- Raviprakash K, Kochel TJ, Ewing DJ, Simmons M, Phillips I, et al. (2000) Immunogenicity of dengue virus type 1 DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein. *Vaccine* 18: 2426–2434.
- Simmons M, Murphy GS, Kochel T, Raviprakash K, Hayes CG (2001) Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 65: 420–6.
- Lu Y, Raviprakash K, Leao IC, Chikhlikar PR, Ewing D, et al. (2003) Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. *Vaccine* 21: 2178–89.
- Putnak R, Fuller J, Vanderzanden L, Innis BL, Vaughn DW (2003) Vaccination of Rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *Am J Trop Med Hyg* 68: 469–476.
- Chen L, Ewing D, Subramanian H, Block K, Rayner J, et al. (2007) A heterologous DNA prime-Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle boost dengue vaccine regimen affords complete protection from virus challenge in *Cynomolgus macaques*. *J Virol* 81: 11634–9.
- De Paula SO, Lima DM, de Oliveira França RF, Gomes-Ruiz AC, et al. (2008) A DNA vaccine candidate expressing dengue-3 virus prM and E proteins elicits neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *Arch Virol* 153: 2215–23.

30. Alisson SL, Stiasny K, Stadler K, Mandl CW, Heinz FX (1999) Mapping of Functional Elements in the Stem-Anchor Region of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Protein E. *J Virol* 73: 5605–12.
31. Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhao AT, Barth OM, et al. (2006) Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* 24: 195–205.
32. Costa SM, Freire MS, Alves AM (2006) DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* 24: 4562–4.
33. Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS et al (2007) DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology* 358: 413–23.
34. Caufour PS, Motta MCA, Yamamura AMY, Vazquez S, Ferreira II, et al. (2001) Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. *Virus Res* 79: 1–14.
35. Irie K, Mohan PM, Sasaguri Y, Putnak R, Padmanabhan R (1989) Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). *Gene* 75: 197–211.
36. Bonaldo MC, Mello SM, Trindade GF, Rangel AA, Duarte AS, et al. (2007) Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *J Virol* 30: 115.
37. Stefano I, Sato HK, Pamuti CS, Omoto TM, Mann G, et al. (1999) Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine. *Vaccine* 17: 1042–6.
38. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blümel G (1984) A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-hydrochloride, carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med (Berl)* 184: 159–69.
39. Henchal EA, McCown JM, Burke DS, Seguin MC, Brandt WE (1985) Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 34: 162–9.
40. Chambers TJ, Liang Y, Droll DA, Schlesinger JJ, Davidson AD, et al. (2003) Yellow Fever Virus/Dengue-2 Virus and Yellow Fever Virus/Dengue-4 Virus Chimeras: Biological Characterization, Immunogenicity, and Protection against Dengue Encephalitis in the Mouse Model. *J Virol* 77: 3655–3668.
41. Kurane I, Kontny U, Janus J, Ennis FA (1990) Dengue-2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Arch Virol* 110: 91–101.
42. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE (1982) Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 31: 830–6.
43. Jaiswal S, Khanna N, Swaminathan S (2004) High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 33: 80–91.
44. Roehrig JT, Bolin RA, Kelly RG (1998) Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246: 317–28.
45. Wahala WM, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM (2009) Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* 392: 103–13.
46. Konishi E, Yamaoka M, Kurane I, Mason PW (2000) A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* 18: 1133–9.
47. Miller N (2010) Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther* 12: 31–8.
48. Ashok MS, Rangarajan PN (2002) Protective efficacy of a plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein fused to tissue plasminogen activator signal sequences: studies in a murine intracerebral virus challenge model. *Vaccine* 20: 1563–70.
49. Phillpotts RJ, Venugopal K, Brooks T (1996) Immunization with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol* 141: 743–749.
50. Colombari G, Hall R, Paty M, Lobigs M (1998) DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with PrM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the Flavivirus, Murray Valley encephalitis virus. *Virology* 250: 151–163.
51. Konishi E, Yamaoka M, Khin-Sane W, Kurane I, Takada K, et al. (1999) The anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding the Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *J Virol* 73: 5527–34.
52. Chang GJ, Hunt AR, Davis B (2000) A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice. *J Virol* 74: 4244–52.
53. Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, et al. (2001) West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol* 75: 4040–7.
54. Raviprakash K, Marques E, Ewing D, Lu Y, Phillips I, et al. (2001) Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology* 290: 74–82.
55. Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Onsirirakul N, Fitton P, Vasanawathana S, et al. (2010) Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328: 745–8.
56. Ramanathan MP, Kuo YC, Selling BH, Li Q, Sardesai NY, et al. (2009) Development of a novel DNA SynCon tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. *Vaccine* 27: 6444–53.
57. Mota J, Acosta M, Argotte R, Figueroa R, Méndez A, et al. (2005) Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine* 23: 3469–76.
58. Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, et al. (2010) Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine* 28: 2705–15.
59. Valdés I, Bernardo L, Gil L, Pavón A, Lazo L, et al. (2009) A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology* 394: 249–58.
60. Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, et al. (2010) The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog* 6: e1000823.
61. van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, Strauss JH (2000) Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol* 74: 8094–101.
62. van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R (2003) Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Int Immunol* 15: 119–25.
63. Yauch LE, Prestwood TR, May MM, Morar MM, Zellweger RM, et al. (2010) CD4+ T cells are not required for the induction of dengue virus-specific CD8+ T cell or antibody responses but contribute to protection after vaccination. *J Immunol* 185: 5405–16.

9.3. DEPÓSITO DE PATENTE

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

To:
 ALMEIDA, Kátia F. de
 BHERING, ALMEIDA & ASSOCIADOS
 Rua Beneditinos 16 - 11º andar
 Centro
 20081-050 Rio de Janeiro RJ

NOTIFICATION CONCERNING PAYMENT
 OF PRESCRIBED FEES

(PCT Rules 12bis.1(c), 14, 15 and 16
 and Administrative Instructions,
 Sections 102bis(c), 304, 323(b) and 707)

Date of mailing
 (day/month/year) 04 October 2010(04.10.2010)

Applicant's or agent's file reference
 P1753

PAYMENT DUE
 see item 3 for time limits

International application No.
 PCT/BR 2010/000323

International filing date/Date of receipt
 (day/month/year) 01 October 2010
 (01.10.2010)

Priority date (day/month/year)
 01 October 2009(01.10.2009)

Applicant Fundação Oswaldo Cruz ; et al

1. The applicant is hereby notified that this receiving Office has received:

the payment of all the prescribed fees, and an overpayment, which will be refunded in due course.

no or insufficient payment of the prescribed fees and the applicant is hereby invited to pay the balance due, as summarized under item 2, within the time limit(s) indicated under item 3.

2. Fees and payment calculation:

_____ = CHF 1690 + BRR 760
 Total fees payable Amount paid Balance

The details of the calculation are given in the Annex.

3. Time limit(s) for payment and amount(s) payable (Rules 14.1, 15.3 and 16.1(f)):

within ONE MONTH from the date of receipt of the international application (for the transmittal fee (if any), the search fee and the international filing fee). The amount payable for each fee is the amount applicable on the date of receipt of the international application.

within 16 MONTHS from the priority date (only for the fee for priority document). The applicant's attention is drawn to the fact that the request made by the applicant under Rule 17.1(b) will be considered not to have been made unless the fee is paid within that time limit.

4. Additional observations (if necessary):

The search copy will not be transmitted to the International Searching Authority until the search fee is paid (therefore the start of the international search will be delayed) (Rule 23.1(a) and (b)).

Name and mailing address of the receiving Office
 Instituto Nacional da Propriedade Industrial INPI ; Praça Mauá
 7, sala 817 ; 20083-900 Rio de Janeiro RJ ; BRASIL

Authorized officer *ms*
 Marcia Timotheo

Facsimile No. 55 21 2139-3541

Telephone No. 55 21 2139-3318

PCT**REQUERIMENTO**

O abaixo assinado solicita que o presente pedido internacional seja processado de acordo com o Tratado de Cooperação em matéria de Patentes

Reservado para o Organismo receptor

PCT/BR 2010/000323

01 OUT 2010 011010

Data do depósito internacional

INPI/BRAZIL-PCT INTERNATIONAL APPLICATION

Nome do Organismo receptor e "Pedido internacional PCT"

Referência do processo do requerente ou do mandatário (facultativo) (12 caracteres no máximo) P1753

Quadro No. I TÍTULO DA INVENÇÃO

Método, kit, plasmideo e composição para induzir resposta imune contra virus da dengue baseado em vacinas de DNA e virus quiméricos

Quadro No. II REQUERENTE Esta pessoa é também inventor.

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se não for indicado nenhum domicílio abaixo)

Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil 4365, Manguinhos
21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

No. de telefone

No. de fax

No. do registo do requerente junto do Organismo

Autorização relativa ao correio electrónico: o facto de marcar esta casa autoriza o Organismo receptor, a Autoridade responsável pela pesquisa internacional, a Secretaria Internacional e a Autoridade responsável pelo exame preliminar internacional a utilizar o endereço de correio electrónico indicado neste quadro para enviar, se o Organismo ou Autoridade assim o desejar, versões preliminares de notificações relativas a este pedido internacional. (Ver também as notas sobre os Quadros Nos. II e III)

Endereço de correio electrónico

Nacionalidade (nome do Estado):

BR

Domicílio (nome do Estado):

BR

Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementar

Quadro No. III OUTRO(S) REQUERENTE(S) E/OU OUTRO(S) INVENTOR(ES)

Outros requerentes e/ou outros inventores são indicados numa folha de continuação.

Quadro No. IV MANDATÁRIO OU REPRESENTANTE COMUM; OU ENDEREÇO PARA A CORRESPONDÊNCIA

A pessoa identificada a seguir é/foi nomeada para actuar em nome do(s) requerente(s) perante as autoridades internacionais competentes, como: mandatário representante comum

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica, a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país)

de Almeida, Katia F
BHERING, ALMEIDA & ASSOCIADOS
Rua Beneditinos 16, 11º andar, Centro
20081-050, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

No. de telefone

(55 21) 2516-6698

No. de fax

(55 21) 2516-1380

No. do registo do mandatário junto do Organismo

Autorização relativa ao correio electrónico: o facto de marcar esta casa autoriza o Organismo receptor, a Autoridade responsável pela pesquisa internacional, a Secretaria Internacional e a Autoridade responsável pelo exame preliminar internacional a utilizar o endereço de correio electrónico indicado neste quadro para enviar, se o Organismo ou Autoridade assim o desejar, versões preliminares de notificações relativas a este pedido internacional. (Ver também as notas sobre os Quadros Nos. II e III).

Endereço de correio electrónico

bhealm@gbl.com.br

Endereço para a correspondência: marcar esta casa se não for/tiver sido nomeado nenhum mandatário ou representante comum e o espaço acima for utilizado para indicar um endereço especial para o qual deve ser enviada a correspondência.

Quadro No. III OUTRO(S) REQUERENTE(S) E/OU OUTRO(S) INVENTOR(E)

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo)

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo)

ALVES, Ada Maria de Barcelos
 Rua das Laranjeiras 210, apt. 1010, Laranjeiras
 22240-000, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Esta pessoa é:

apenas requerente

requerente e inventor

apenas inventor (se esta casa for marcada, não preencher o seguinte espaço).

No. do registro do requerente junto do Organismo

Nacionalidade (nome do Estado):
BR

Domicílio (nome do Estado):
BR

Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementar

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo)

AZEVEDO, Adriana de Souza
 Rua Dr. March 230, apt. 1104, Bloco 3
 24650-110, Barreto, Niterói, RJ, Brasil

Esta pessoa é:

apenas requerente

requerente e inventor

apenas inventor (se esta casa for marcada, não preencher o seguinte espaço).

No. do registro do requerente junto do Organismo

Nacionalidade (nome do Estado):
BR

Domicílio (nome do Estado):
BR

Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementar

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo)

GALLER, Ricardo
 Av. Brasil 4365, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
 21045-900, Manguinhos Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Esta pessoa é:

apenas requerente

requerente e inventor

apenas inventor (se esta casa for marcada, não preencher o seguinte espaço).

No. do registro do requerente junto do Organismo

Nacionalidade (nome do Estado):
BR

Domicílio (nome do Estado):
BR

Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementar

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo)

FREIRE, Marcos da Silva
 Av. Brasil 4365, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
 21045-900, Manguinhos Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Esta pessoa é:

apenas requerente

requerente e inventor

apenas inventor (se esta casa for marcada, não preencher o seguinte espaço).

No. do registro do requerente junto do Organismo

Nacionalidade (nome do Estado):
BR

Domicílio (nome do Estado):
BR

Esta pessoa é requerente para: todos os Estados designados todos os Estados designados excepto os Estados Unidos da América apenas os Estados Unidos da América os Estados indicados no quadro suplementar

Outros requerentes e/ou outros inventores são indicados numa folha de continuação.

Quadro No. V DESIGNAÇÕES

Indique, para cada país, se o pedido anterior é de qualquer tipo de protecção nacional, incluindo a protecção concedida no âmbito de patentes regionais como de patentes nacionais.

Porém,

- DE A Alemanha não é designada para nenhum tipo de protecção nacional
- JP o Japão não é designado para nenhum tipo de protecção nacional
- KR a República da Coreia não é designada para nenhum tipo de protecção nacional
- RU A Federação Russa não é designada para nenhum tipo de protecção nacional

As casos acima só podem ser utilizadas para excluir (irrevogavelmente) as designações em questão se, no momento do depósito, ou posteriormente de acordo com a Regra 26bis, i, o pedido internacional reivindicar, no Quadro No. VI, a prioridade de um pedido nacional anterior depositado no Estado em questão, para evitar que esse pedido nacional anterior deixe de produzir efeitos, em virtude da legislação nacional).

Quadro No. VI REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

A prioridade do(s) seguinte(s) pedido(s) anterior(es) é reivindicada:

Data do depósito do pedido anterior (dia/mês/ano)	Número do pedido anterior	No caso de o pedido anterior ser:		
		um pedido nacional: país ou membro da OMC	um pedido regional: Organismo regional	um pedido internacional: Organismo receptor
Ponto 1) 01/10/2009	PI0904020-0	BR		
Ponto 2)				
Ponto 3)				
Ponto 4)				

Outras reivindicações de prioridade são indicadas no quadro suplementar.

Transmitir uma cópia certificada: pede-se que o Organismo receptor prepare e transmita à Secretaria Internacional uma cópia certificada do(s) pedido(s) anterior(es) (apenas se o pedido anterior tiver sido depositado junto do Organismo que, para os fins deste pedido internacional, é o Organismo receptor) identificado(s) acima como:

- todos os pontos ponto 1) ponto 2) ponto 3) ponto 4) outros, ver o quadro suplementar

Restaurar o direito de prioridade: pede-se que o Organismo receptor restaure o direito de prioridade a respeito do(s) pedido(s) anterior(es) identificado(s) acima ou no quadro suplementar como ponto(s): (_____). (Ver também as notas sobre Quadro No. VI: é necessário fornecer mais informações para apoiar um pedido de restauração do direito de prioridade).

Incorporação por referência: se um elemento do pedido internacional mencionado no Artigo 11.1)iii)d) ou e), ou uma parte da descrição, das reivindicações ou dos desenhos mencionada na Regra 20.5.a), não estiver de outro modo contido neste pedido internacional mas figurar integralmente num pedido anterior cuja prioridade é reivindicada na data em que um ou mais elementos mencionados no Artigo 11.1)iii) foram recebidos inicialmente pelo Organismo receptor, esse elemento ou essa parte é, sob reserva da confirmação prevista na Regra 20.6, incorporado por referência neste pedido internacional, para os efeitos da Regra 20.6.

Quadro No. VII AUTORIDADE RESPONSÁVEL PELA PESQUISA INTERNACIONAL

Escolha da Autoridade responsável pela pesquisa internacional (ISA) (se duas ou mais Autoridades responsáveis pela pesquisa internacional forem competentes para efectuar a pesquisa internacional, indicar a Autoridade escolhida; o código de duas letras pode ser utilizado):


ISA / BR

Quadro No. IX LISTA DE CONTROLE para depósitos feitos em PAPEL - esta folha só deve ser utilizada quando o depósito

Este pedido internacional contém o seguinte:	Número de folhas	Este pedido internacional é acompanhado pelo(s) seguinte(s) documento(s) (marcar as caixas apropriadas e indicar na coluna da direita o número de cada documento)	Número de documentos
a) formulário de requerimento PCT/RO/101 (incluindo quaisquer declarações e folhas suplementares)	4	1. <input checked="" type="checkbox"/> folha de cálculo das taxas	1
b) descrição (excluindo qualquer parte da listagem de sequências da descrição, ver f) abaixo)	36	2. <input type="checkbox"/> procuração separada original	1
c) reivindicações	4	3. <input type="checkbox"/> procuração geral original	1
d) resumo	1	4. <input type="checkbox"/> cópia da procuração geral: número de referência:	1
e) desenhos (se for caso disso)	5	5. <input type="checkbox"/> declaração explicativa da falta de assinatura	1
f) parte da listagem de sequências da descrição (se for caso disso)	4	6. <input type="checkbox"/> documento(s) de prioridade indicado(s) no Quadro No. VI no(s) ponto(s):	1
Número total de folhas :	54	7. <input type="checkbox"/> tradução do pedido internacional em (língua):	1
		8. <input type="checkbox"/> indicações separadas relativas a microrganismos depositados ou a outro material biológico	1
		9. <input checked="" type="checkbox"/> cópia da listagem de sequências em forma electrónica (ficheiro texto segundo o Anexo C/ST.25) em suporte(s) físico(s) de dados, não fazendo parte do pedido internacional, fornecida apenas para os fins da pesquisa internacional de acordo com a Regra 13ter (tipo e número de suportes físicos de dados). 2 CD ROM.	1
		10. <input type="checkbox"/> uma declaração confirmando que "as informações em forma electrónica submetidas de acordo com a Regra 13ter são idênticas à listagem de sequências contida no pedido internacional" depositado em papel	1
		11. <input type="checkbox"/> cópia dos resultados de pesquisa(s) anterior(es) (Regra 12bis.I.a))	1
		12. <input type="checkbox"/> outros documentos (especificar):	1

Figura dos desenhos que deve acompanhar o resumo: 1 Língua do depósito do pedido internacional: Portugues

Quadro No. IX ASSINATURA DO REQUERENTE, DO MANDATÁRIO OU DO REPRESENTANTE COMUM
 Junto a cada assinatura, indicar o nome e a qualidade de quem assina (se tal qualidade não for evidente para quem ler o requerimento).


 Katia F de Almeida
 Bhering, Almeida & Associados

Reservado apenas para o Organismo receptor

1. Data efectiva de recepção do alegado pedido internacional: 01 OUT 2010 011010	2. Desenhos: <input type="checkbox"/> recebidos: <input type="checkbox"/> não recebidos:
3. Data efectiva de recepção, corrigida devido à recepção ulterior, mas dentro do prazo, de documentos ou desenhos que completam o alegado pedido internacional:	
4. Data da recepção, dentro do prazo, das correcções exigidas de acordo com o Artigo 11.2) do PCT:	
5. Autoridade responsável pela pesquisa internacional (se duas ou mais forem competentes): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmissão da cópia de pesquisa diferida até ao pagamento da taxa de pesquisa.

Reservado para a Secretaria Internacional

Data da recepção da via original pela Secretaria Internacional:

PCT

FOLHA DE CÁLCULO DAS TAXAS

Área do conhecimento

PCT/BR2010/000323

Pedido internacional No.

Referência do processo do requerente ou do número P1753

Carimbo datador do Organismo receptor

Requerente

Fundação Oswaldo Cruz; et al.

CÁLCULO DAS TAXAS PRESCRITAS

1. TAXA DE TRANSMISSÃO R\$80,00 T

2. TAXA DE PESQUISA S

Pesquisa internacional a ser efectuada por _____

(Se duas ou mais Autoridades responsáveis pela pesquisa internacional forem competentes para efectuar a pesquisa internacional, indicar o nome da Autoridade escolhida para efectuar a pesquisa internacional).

3. TAXA DE DEPÓSITO INTERNACIONAL

Escrever o número total de folhas indicado no Quadro No. IX: _____

i1 primeiras 30 folhas i1

i2 _____ x _____ = _____
 número de folhas taxa por folha
 excedentes de 30

Somar os valores indicados em i1 e i2 e escrever o total em I I

(Os requerentes de certos países têm direito a uma redução de 90% da taxa de depósito internacional. Se o requerente tiver (ou todos os requerentes tiverem) direito a esta redução, o valor que deve aparecer em I é igual a 10% da taxa de depósito internacional).

4. TAXA PELO DOCUMENTO DE PRIORIDADE (se for caso disso) R\$150,00 P

5. TAXA PELO RESTABELECIMENTO DO DIREITO DE PRIORIDADE (se for caso disso) RP

6. TAXA POR DOCUMENTOS DE PESQUISA ANTERIOR (se for caso disso) ES

7. TOTAL DAS TAXAS DEVIDAS R\$230,00

Somar os valores que aparecem em T, S, I, P, RP e ES, e escrever o resultado na casa TOTAL

TOTAL

MODO DE PAGAMENTO (Nem todos os modos de pagamento são possíveis em todos os Organismos receptores)

- autorização para debitar uma conta corrente
- vale de correio
- cartão de crédito (os pormenores devem ser fornecidos separadamente e não devem ser incluídos nesta folha)
- numerário
- cheque
- transferência bancária
- selos fiscais
- outro modo (especificar):

AUTORIZAÇÃO PARA DEBITAR (OU CREDITAR) UMA CONTA CORRENTE

(Este modo de pagamento pode não ser possível em todos os Organismos receptores)

- Autorização para debitar o total das taxas indicado acima.
- (Esta casa só pode ser marcada se o permitirem as condições do Organismo receptor relativamente às contas correntes) Autorização para debitar qualquer valor que falte - ou creditar qualquer excedente - no pagamento do total das taxas indicado acima.
- Autorização para debitar a taxa pelo documento de prioridade.

Organismo receptor: RO/ _____

Conta corrente No. : _____

Data: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

MÉTODO, KIT, PLASMÍDEO E COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR RESPOSTA
IMUNE CONTRA VÍRUS DA DENGUE BASEADO EM VACINAS DE DNA E
VÍRUS QUIMÉRICOS

Campo da Invenção

5 A presente invenção se refere a um método para induzir
resposta imune contra vírus da dengue baseado em vacinas de
DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas ou co-
administradas. Também estão dentro do escopo da presente
invenção, vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do
10 vírus dengue a partir da construção de diferentes
plasmídeos recombinantes contendo o gene que codifica a
proteína E, ou somente a seqüência que corresponde ao
domínio III desta proteína, a partir de cada sorotipo viral
do vírus dengue (DENV1-4).

15 Está incluída no escopo de proteção uma composição
vacinal consistindo de:

(a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus
dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos
recombinantes contendo os genes das proteínas E a partir de
20 cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as
seqüências que correspondem ao domínio III destas
proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica o
peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido
humano (t-PA);

25 (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de
febre amarela 17D modificado, pela tecnologia de obtenção
de clone infeccioso, com a substituição das seqüências que
codificam as proteínas prM e E de febre amarela pelas
seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus

dengue dos diferentes sorotipos; e,

(c) um veículo farmacêticamente aceitável,

A invenção se relaciona também a um kit compreendendo
(a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus
5 dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos
recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas
E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue, ou
somente as seqüências que correspondem ao domínio III
destas proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica
10 o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido
humano (t-PA); e, (b) vírus quiméricos compreendendo o
vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, pela
tecnologia de obtenção de clone infeccioso, com a
substituição das seqüências que codificam as proteínas prM
15 e E de febre amarela pelas seqüências que codificam as
proteínas prM e E dos vírus dengue dos diferentes
sorotipos.

Fundamentos da Invenção

A dengue é considerada um dos principais problemas de
20 saúde pública mundial, entre as doenças causadas por
arbovírus, devido a sua importância em termos de morbidade
e mortalidade na população humana, principalmente nas
regiões tropicais e subtropicais. Seu agente etiológico é o
vírus da dengue que é transmitido pelo mosquito do gênero
25 *Aedes*, geralmente *Aedes aegypti*.

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero
Flavivirus, da família Flaviviridae. Há 4 tipos de vírus
antigenicamente e sorologicamente distintos: DENV1, DENV2,
DENV3 e DENV4. Apesar da infecção primária pelo vírus da

dengue induzir uma imunidade ao sorotipo infectante, não há uma proteção cruzada de longa duração contra os outros sorotipos virais, ocorrendo infecções seqüenciais com os diferentes vírus da dengue.

5 O vírus da dengue é composto por um envelope viral e um nucleocapsídeo complexado a uma molécula de RNA. Seu genoma é de aproximadamente 10.700 nucleotídeos e constitui-se de uma fita simples de RNA com polaridade positiva que codifica a poliproteína precursora das
10 proteínas flavivirais. Este precursor é clivado por proteases celulares e pela protease viral gerando três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM (pre-membrana) e E (envelope), e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. As proteínas estruturais
15 traduzidas são incorporadas nos vírions infecciosos maduros, enquanto as proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação e montagem do vírus.

A proteína E (Envelope) do vírus da Dengue é uma proteína estrutural e transmembrana, sendo glicosilada em
20 quase todos Flavivirus. Essa proteína E se destaca como o maior componente glicoprotéico presente na superfície desses vírus, possuindo peso molecular de 55 a 60 kDa, constituída de 493 a 501 aminoácidos.

A proteína E está associada a numerosas atividades
25 biológicas importantes. A proteína E atua como proteína ligante, interagindo com receptores presentes na superfície celular e mediando à fusão da membrana do vírus à membrana da célula hospedeira. Essa proteína também está relacionada à dissociação do nucleocapsídeo e desempenha um importante

papel na virulência do vírus. Além disso, a proteína E é um forte imunógeno, gerando altos níveis de anticorpos em pacientes infectados com o vírus, que podem ser neutralizantes, se ligando a epítomos que interagem com receptores celulares e impedindo, portanto a entrada do vírus nas células do hospedeiro (Chang, 1997; Kinney & Hung, 2001).

A proteína E é formada por um dímero alongado que se estende paralelamente à membrana do vírus. Cada monômero é composto de três domínios: I, II e III. O domínio I é central constituído de 120 resíduos de aminoácidos: 1-51, 133-193, 279-296. O domínio II é alongado, compreende a região onde os dois monômeros estão ligados em vários pontos na molécula, formando o dímero. O domínio II é constituído dos seguintes resíduos de aminoácido: 52-132, 194-280. O domínio III está localizado na porção carbóxi-terminal, apresenta-se como uma imunoglobulina, cuja função é se ligar a receptores celulares, como por exemplo, DC-SIGN presente nas células dendríticas imaturas. A ligação vírus/célula mediada pelo domínio III promove a endocitose da partícula viral. O domínio III é constituído dos resíduos de aminoácidos: 298-394. Os epítomos presentes nessa região são capazes de induzir resposta de anticorpos neutralizantes tipo e subtipo-específico.

Diversas vacinas vêm sendo propostas para o combate à dengue, contudo nenhuma das abordagens sugeridas apresentou as características necessárias para uma vacinação em massa, como segurança e uma resposta imune protetora de longo prazo contra os diferentes sorotipos virais circulantes.

Uma das principais dificuldades é construir um protótipo de vacina contendo componentes que induzam uma imunidade protetora contra os quatro sorotipos de vírus da dengue, sem gerar consequências como a febre hemorrágica, e utilizando o menor número possível de doses.

Esforços consideráveis vêm sendo realizados para o desenvolvimento de uma vacina tetravalente atenuada. O mais promissor destes candidatos consiste em vírus atenuados por passagens em cultura de células. Esta vacina está em fase de avaliações clínicas, contudo já foram observadas algumas complicações. Além disso, existe o risco potencial de infecções sérias por vírus que possam surgir de reversões gênicas ou recombinações, tornando difícil formular uma vacina viva atenuada multivalente devido à possibilidade de interferência homóloga ou heteróloga durante a replicação viral (Barrett, 2001; Kinney & Huang, 2001).

Outra estratégia empregada para o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus da dengue é a construção de quimeras. Essa tecnologia vem sendo utilizada em diversas pesquisas de vacinas contra Flavivirus, incluindo o vírus da Dengue (Galler et al., 2005).

Apesar dos avanços obtidos até o momento, existe ainda um grande desafio: produzir uma vacina capaz de gerar uma resposta homogênea contra os quatro sorotipos do vírus da Dengue.

A vacina de DNA representa uma eficiente tecnologia no desenvolvimento de vacinas para o controle de agentes infecciosos. Esta técnica compreende a inoculação de um plasmídeo de expressão eucariótico contendo o antígeno de

interesse, que é sintetizado *in vivo* pelas células do organismo inoculado e é apresentado pelos complexos de histocompatibilidade I e II (MHC I e II), ativando uma imunidade específica. A expressão endógena do antígeno pelas células hospedeiras parece simular uma infecção viral natural sendo capaz de gerar tanto uma resposta imune humoral, com produção de anticorpos, como uma resposta celular, com indução de linfócitos T citotóxicos. A indução destas duas formas de resposta imune fornece vantagens em comparação com as vacinas de subunidades, que produzem principalmente, ou exclusivamente, uma resposta de anticorpos, e se compara à resposta celular de vacinas vivas atenuadas, sem apresentar o risco de reversão para forma patogênica do agente infeccioso. Além disso, as vacinas de DNA são estáveis a variações de temperatura, de menor custo para a produção em grande escala, e permitem uma rápida seleção de seqüências a serem avaliadas.

Recentemente, vários grupos têm analisado o uso da vacina de DNA no controle de flavivírus. Alguns destes estudos com diferentes vírus desta família têm demonstrado a indução de uma resposta imune protetora flavivírus-específica em camundongos e primatas não humanos após a vacinação com plasmídeos codificando as proteínas flavivirais prM e E (Phillpotts et al., 1996; Kochel et al., 1997;; Raviprakash et al, 2000). Algumas análises também foram realizadas utilizando vacinas de DNA contendo os genes de proteínas não estruturais de flavivírus como: o vírus da encefalite japonesa, hepatite C e dengue (Lin et al., 1998; Encke et al., 1998; Wu et al., 2003; Costa et

al., 2006, 2007).

Estudos recentes demonstraram que vacinas DNA contendo a seqüência completa dos genes que codificam as proteínas prM e E, e a região do domínio III do vírus DENV1-4, foram capazes de induzir uma resposta imune humoral com a presença de anticorpos contra Dengue em modelos murinos.

5 Entretanto nestes estudos o potencial protetor das vacinas de DNA foi avaliado somente indiretamente (soroneutralização e resposta celular) não sendo realizados testes de desafios diretos com doses letais do vírus da Dengue para avaliar eficácia dessas vacinas (Chen et al., 2007). Algumas vacinas de DNA contra dengue foram testadas em primatas não humanos (*Aotus* e *Rhesus*) e conferiram proteção parcial, avaliada
10 através da viremia nos animais desafiados com o vírus da Dengue (Raviprakash et al., 2000; Putnak et al., 2003; Blair et al., 2006).

No que se refere ao método de imunização, os presentes inventores destacam que Putnak e colaboradores (2003),
15 construíram uma vacina DNA contendo os genes que codificam as proteínas prM e E a partir do DENV2, observaram a imunogenicidade desta em camundongos e imunizaram em seguida macacos *Rhesus*. Entretanto, foram necessárias várias doses da vacina para a indução de uma resposta
20 protetora e de curta duração. Sete meses após as imunizações, os animais não se mostraram mais protegidos contra desafios com o vírus da dengue. Assim, podemos observar que estes estudos indicam a necessidade da utilização de novas estratégias para aumentar a duração da
25 resposta imune. Mais recentemente tem sido demonstrado que a combinação de vacinas de DNA com outras vacinas pode gerar respostas imunes mais eficientes do que as mesmas abordagens isoladamente.

O pedido de patente WO2008/127307, publicado em 23/10/2008, está direcionado para um método de indução de resposta imune contra o vírus da dengue usando uma metodologia de vacinação de dose/reforço. Mais especificamente, o documento WO2008/127307 está direcionado à administração de uma dose de um imunógeno do vírus da dengue que compreende uma vacina de DNA ou uma vacina tetravalente de DNA ou uma vacina tetravalente inativada purificada e uma dose reforço de um imunógeno do vírus da dengue, compreendendo uma vacina viral tetravalente de vírus atenuado. Entretanto, esta estratégia apresenta as dificuldades inerentes à utilização de uma vacina tetravalente de vírus dengue atenuado, como por exemplo a possibilidade de interferência de um ou mais vírus na replicação *in vivo* dos outros vírus, levando conseqüentemente a respostas imunes heterogêneas em relação aos diferentes sorotipos virais. Além disso, o documento também está direcionado à utilização de adenovírus contendo genes que codificam proteínas de dengue como reforço para uma vacina tetravalente, o que pode implicar em uma baixa eficiência na indução de respostas imunes contra dengue em seres humanos. Tal fato se deve à presença, em seres humanos, de respostas imunes prévias contra adenovírus, que podem impedir a infecção com adenovírus vetor carreando genes do vírus da dengue, e conseqüentemente comprometendo a eficiência da resposta imune ao vírus da dengue.

Também é conhecido o pedido de patente US20080193477, publicado em 14/08/2008, um método que emprega um regime de imunização compreendendo a administração de uma primeira

vacina de febre amarela seguida da administração de uma
vacina de dengue à base de flavivirus quimérico.
Entretanto, outros relatos na literatura demonstraram que a
imunização com o vírus vacinal da febre amarela pode
5 comprometer a eficiência da resposta imune gerada
posteriormente com vírus quiméricos de febre amarela
contendo genes do vírus da dengue. Neste caso os níveis de
anticorpos neutralizantes contra o vírus da dengue foram
significativamente menores em macacos previamente vacinados
10 contra febre amarela (Galler et al., 2005). Como aqui
discutido, verificamos que apesar dos esforços que vem
sendo desenvolvidos, há ainda uma necessidade para o
desenvolvimento de vacinas de DNA mais eficazes e capazes
de induzir um aumento da resposta imune, assim como a
15 utilização de estratégias vacinais combinadas que
incrementem esta resposta imune.

Sumário da Invenção

O objetivo da presente invenção é propiciar um método
para induzir resposta imune contra vírus da dengue baseado
20 em vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações
combinadas ou co-administradas.

Também é um objetivo da invenção fornecer uma
composição de vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do
vírus dengue a partir da construção de diferentes
25 plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as
proteínas E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue
(DENV1-4), ou somente as seqüências que correspondem ao
domínio III destas proteínas, todas fusionadas à seqüência
que codifica o peptídeo sinal do t-PA.

Uma composição vacinal consistindo de (a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as seqüências que correspondem ao domínio III destas proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica o peptídeo sinal do t-PA; e, (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, cujas seqüências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela foram substituídas pelas seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus dengue dos diferentes sorotipos, e um veículo farmacêuticamente aceitável, está incluída no objetivo da presente invenção.

A invenção apresenta ainda um kit compreendendo (a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes das proteínas E, ou somente as seqüências que correspondem ao domínio III destas proteínas a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue; e, (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, cujas seqüências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela foram substituídas pelas seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus dengue dos diferentes sorotipos.

Breve Descrição da Figuras

A Figura 1 é uma representação esquemática dos plasmídeos pCTPA, pE1D2 e pE2D2.

A Figura 2 mostra a imunofluorescência de células BHK-

21 transfectadas com os plasmídeos pE1D2 (A e A'), pE2D2 (B e B') e pcTPA (C e C'), onde o contraste de fase é mostrado em A, B e C; a fluorescência é mostrada em A', B' e C' (aumento de 1000x A e B, 400x C).

5 As Figuras 3A-3B mostram os resultados do primeiro experimento com pE1D2.

As Figuras 3C-3D mostram os resultados do segundo experimento com pE1D2.

10 As Figuras 4A-4B mostram os resultados do primeiro experimento com pE2D2.

As Figuras 4C-4D mostram os resultados do segundo experimento com pE2D2.

15 As Figuras 5A-5D mostram os resultados do terceiro experimento com combinações simultâneas com pE1D2, pE2D2, 17D-D2.

Descrição Detalhada da Invenção

Os presentes inventores encontraram no estado da arte que a proteína do envelope (E) do vírus da dengue é um forte imunógeno, podendo gerar uma resposta protetora com
20 altos níveis de anticorpos neutralizantes. Sendo assim, o primeiro objetivo da presente invenção é construir vacinas de DNA contra dengue contendo os genes que codificam as proteínas E, sem a região hidrofóbica C-terminal, ou contendo as seqüências dos domínios III destas proteínas,
25 inseridos no plasmídeo pcTPA, que possui a seqüência sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), um eficiente peptídeo sinal já testado em outras vacinas. A presente invenção também tem como objetivo estabelecer um método para induzir resposta imune protetora contra os

vírus da dengue, baseada na administração de vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas no sistema de dose/reforço ou co-administração das duas vacinas.

O plasmídeo pCTPA contém uma seqüência de DNA correspondente ao peptídeo sinal do gene do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA). Existem diferenças no tamanho da região do t-PA identificada como peptídeo sinal. O artigo que descreve a clonagem e o sequenciamento do gene do t-PA (Pennica et al., Nature, 301:214-221, 1983) identifica uma região de 105 pares de bases, que codifica os primeiros 35 aminoácidos, como peptídeo sinal. O plasmídeo pCTPA contém uma seqüência de 69 pares de bases que corresponde aos primeiros 23 aminoácidos SEQ ID NO:8. A seqüência correspondente ao peptídeo sinal do t-PA foi clonada no plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen) utilizando os sítios das enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRV*. Deste modo, qualquer seqüência pode ser clonada a jusante ao sítio *EcoRV*, utilizando o sítio desta enzima que gera fragmentos de ponta cega, podendo, portanto, se ligar a outro fragmento também de ponta cega, sem necessariamente ter sido digerido com *EcoRV*. Além deste sítio, o plasmídeo pCTPA conserva os cinco sítios de enzimas de restrição a jusante ao da *EcoRV* (*BstXI*, *NotI*, *XhoI*, *XbaI* e *ApaI*), oriundos do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pcDNA3, que também podem ser utilizados para clonagens de novas seqüências.

Para a construção dos diferentes plasmídeos recombinantes, contendo a seqüência que codifica a proteína E sem a sua porção hidrofóbica C-terminal (E80%) - SEQ ID

NO:6 -, ou somente a seqüência que corresponde ao domínio
III - SEQ ID NO:7 - desta proteína, foi utilizada a
linhagem de DENV2 Nova Guiné C (NGC) (M29095; gi:323447).
Esse vírus foi obtido a partir de cultura de células Vero
5 infectadas. Os fragmentos do gene E clonados no plasmídeo
pcTPA foram amplificados por PCR a partir do RNA total de
células vero infectadas com DENV2 NGC. O RNA serviu como
molde para a síntese de um cDNA contendo as regiões alvo,
utilizando oligonucleotídeos específicos. Este cDNA serviu
10 então como molde para a amplificação por PCR das seqüências
alvo, utilizando outros oligonucleotídeos contendo sítios
de enzimas de restrições que foram usadas nas clonagens. Os
fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de agarose
e em seguida retirados e purificados com resinas (gene
15 clean). Os fragmentos obtidos, assim como o plasmídeo
pcTPA, foram digeridos com enzimas de restrições
específicas e ligados com T4 DNA ligase. Os clones
recombinantes foram obtidos em *Escherichia coli*, cepa DH5-
 α , transformada com estes plasmídeos, confirmados por
20 digestões com enzimas de restrição e posteriormente por
sequenciamento.

Para avaliar a capacidade dos plasmídeos
recombinantes, obtidos conforme descrito acima, de mediar
a expressão das proteínas E, sem a região hidrofóbica na
25 porção C-terminal (E80%) ou somente o seu domínio III (dom
III), foram realizados ensaios de análise da expressão *in*
vitro destas proteínas utilizando células BHK-21
transfectadas com os diferentes plasmídeos. Os plasmídeos
recombinantes foram obtidos a partir do plasmídeo pcTPA,

que foi construído a partir do plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen). Esse vetor promove a expressão das proteínas recombinantes sob o controle do promotor do citomegalovírus humano (CMV) e contém a seqüência que codifica o peptídeo 5 sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), que direciona estas proteínas para o meio extracelular.

Para avaliar a produção das proteínas de interesse, culturas de células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos recombinantes, utilizando lipofectamina, de 10 acordo com as instruções do fabricante. A expressão das proteínas recombinantes foi analisada por imunofluorescência, conforme descrito em Costa SM et al., 2006 Para a produção em grande escala dos plasmídeos recombinantes e controle, foram utilizadas bactérias *E. coli*, cepa DH5- α , transformadas com os diferentes 15 plasmídeos e cultivadas em meio TB líquido, durante a noite a 37°C. Os plasmídeos foram purificados em colunas de troca iônica, utilizando o kit QIAGEN tip 10.000 conforme recomendação do fabricante, e ressuspensos em água, 20 quantificados em espectrofotômetro e gel de agarose. As vacinas de DNA foram armazenadas a -20°C até sua utilização.

As vacinas de DNA da presente invenção foram testadas isoladamente quanto à sua capacidade protetora. Esses 25 testes tiveram por finalidade analisar a eficiência da expressão das proteínas recombinantes *in vitro*, avaliar a resposta de anticorpos gerada em camundongos e realizar ensaios de desafios com inoculações intracerebrais de doses letais do vírus. Os testes de soroneutralização também

foram realizados com células Vero e com os vírus citados anteriormente, conforme descrito por Cafour et al., 2001.

Para a avaliação das construções obtidas, grupos de camundongos BALB/c machos com cerca de quatro semanas de idade foram imunizados com os plasmídeos recombinantes e controle. Os camundongos foram inoculados por via intramuscular (im) nos quadríceps posteriores com estes plasmídeos diluídos em PBS. Em cada inoculação foram injetados 100µg de DNA por animal (50µg por pata). Na nova abordagem de imunização da presente invenção, ou seja, o sistema de dose (vacina de DNA) e reforço (vírus quimérico) ou imunizações simultâneas (co-administração), as vacinas de DNA da presente invenção foram testadas em imunizações combinadas com vírus quimérico (17D-D2). Esta quimera foi construída a partir do vírus vacinal da febre amarela YF 17D, com a substituição dos genes que codificam as proteínas prM e E deste vírus pelos genes prM e E de DENV2, cepa NGC, SEQ ID NO:9. Vale ressaltar que os testes dessa nova abordagem de imunização foram iniciados com a construção das vacinas de DNA de DENV2 e a realização de um teste de desafio que demonstrou a capacidade protetora destas vacinas, principalmente quando se utilizou a seqüência que codifica o gene E sem a sua porção hidrofóbica C-terminal.

Para a construção da quimera 17D-D2, foi utilizada a abordagem do cDNA infeccioso de febre amarela, desenvolvido por Rice et al., 1989, que consiste em dois plasmídeos: pYF5'3'IV e pYFM5.2. Nesta abordagem o genoma do vírus de febre amarela foi separado nos dois plasmídeos citados

anteriormente, dada a falta de estabilidade de algumas sequências virais em plasmídeos de alto número de cópias. Estes plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrições específicas e os fragmentos gerados foram ligados, reconstituindo o genoma completo do vírus vacinal de febre amarela. Entretanto, testes em macacos com este vírus indicaram a necessidade de modificações genéticas do cDNA para tornar o vírus mais atenuado (Marchevsky et al., 1995). Tais modificações foram realizadas por Galler e Freire (US 6.171.854) e resultaram em novas versões dos plasmídeos pYF5'3'IV e pYFM5.2, denominados G1/2 e T3/27, respectivamente. Posteriormente, foi utilizado o plasmídeo pACNR1180 (Ruggli et al., 1996) que possui uma origem de replicação (P15A), que limita o número de replicações deste plasmídeo, reduzindo assim o número de cópias do DNA plasmidial em bactérias. O plasmídeo pACNR1180 foi descrito como um plasmídeo ideal para clonagem do genoma do vírus de febre suína, cujo tamanho se assemelha ao do genoma do vírus da febre amarela, permitindo a estabilidade do genoma clonado. Tendo em vista estes resultados, o genoma inteiro do vírus de febre amarela foi clonado em um plasmídeo modificado do pACNR1180 (com a retirada de alguns sítios de enzimas de restrição), gerando o plasmídeo pYF17D/14. O plasmídeo pYF17D/14 foi gerado em duas etapas. Primeiro o plasmídeo G1/2 foi utilizado como molde para amplificação por PCR de diferentes fragmentos que foram inseridos no plasmídeo modificado do pACNR1180, gerando o plasmídeo NSK7. Posteriormente, o plasmídeo NSK7 foi utilizado para a clonagem do restante do genoma do vírus vacinal 17D contido

no plasmídeo T3/27, gerando então o plasmídeo pYF17D/14. Todos os plasmídeos foram propagados em *E. coli* MC1061 e purificados em coluna Qiagen. Para a construção da quimera 17D-D2 foi utilizado o vírus DENV2 cepa Nova Guiné. Foi sintetizado um cDNA, de modo semelhante ao descrito anteriormente para as clonagens nas vacinas de DNA, que continha a região do genoma do vírus da dengue que vai do primeiro nucleotídeo correspondente ao gene que codifica a proteína prM até a sequência correspondente ao aminoácido 205 da proteína E. Esta região foi amplificada por PCR e inserida no plasmídeo G1/2 entre os sítios para as enzimas de restrição *ApaI* e *NotI*, gerando o plasmídeo pG1/2 DEN2. O cDNA contendo o genoma completo 17D-D2 foi construído a partir da ligação dos fragmentos: *NotI/NsiI* gerado com digestão do plasmídeo pG1/2 DEN2 (com o promotor SP6, a região 5' NTR-C de febre amarela e prM-2/3E de DENV2), *NsiI/MluI* gerado com a digestão do plasmídeo pYFD/F11/12 (codificando a região 3' de E de DENV1 e o início do gene NS1 de febre amarela), e *MluI/NotI* gerado com a digestão do plasmídeo pYF17D/14 (que contém o restante do genoma de febre amarela). Todos os plasmídeos foram propagados em *E. coli* XL-1 Blue e purificados com Concert High Purity System (Invitrogen). O plasmídeo completo foi linearizado com *XhoI* e utilizado para a transcrição *in vitro*, através da região promotora SP6. O RNA sintetizado *in vitro* foi utilizado para a regeneração viral por eletroporação de células Vero de modo similar ao descrito no documento US 6,171,854.

Além das inoculações com as vacinas de DNA isoladas, foi analisada também a resposta imune gerada em camundongos

tratados com imunizações combinadas: sistema de dose (vacina de DNA) e reforço (vírus quimérico 17D-D2), e imunizações simultâneas (co-administração) dos dois tipos de vacinas. No sistema de dose/reforço, camundongos BALB/c
5 receberam duas doses das vacinas de DNA de DENV2, como descrito acima, e, duas semanas após a última dose, foram inoculados por via subcutânea (sc) ou intramuscular (im) com 4 log₁₀ PFU de vírus quimérico (17D-D2). Nas imunizações simultâneas (co-administração) as duas vacinas
10 (DNA e quimera 17D-D2) foram misturadas em solução salina tamponada (PBS) e inoculadas por via im, em duas doses com intervalo de duas semanas.

A resposta imune gerada com as vacinas de DNA isoladamente ou em conjunto com vírus quimérico foi
15 avaliada pela produção de anticorpos neutralizantes.

Os animais foram sangrados por via retro-orbital duas semanas após a segunda dose de DNA ou duas semanas após a última imunização, e ao final dos testes de desafio com DENV2. O soro pré-imune foi obtido no dia anterior ao
20 início das imunizações. Nos ensaios de neutralização, os vírus DENV foram incubados com diferentes diluições dos soros dos camundongos imunizados e posteriormente foi avaliada a capacidade destes vírus infectar células Vero, através da formação das placas de lise. A partir dessas
25 análises é possível titular os níveis de anticorpos neutralizantes.

Os camundongos BALB/c imunizados com os diferentes plasmídeos isoladamente ou em combinação com o vírus 17D-D2 foram desafiados por inoculação intracerebral de DENV2

(aproximadamente 4.3 log₁₀ PFU, que corresponde a uma LD₅₀ de 3,8), 25 dias após a última dose de DNA ou 10 dias após a inoculação com o vírus quimérico. Antes do desafio os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamine-
5 xylazine. A titulação do vírus foi feita em células Vero logo após a sua inoculação nos animais, como descrito por Caufour et al., 2001. Os camundongos foram avaliados diariamente até 21 dias após o desafio quanto à morbidade, principalmente o desenvolvimento de paralisia nos membros
10 posteriores, e mortalidade. Os animais moribundos foram sacrificados, assim como os que sobreviveram 21 dias após o desafio. O sangue destes camundongos foi coletado, para os testes de soroneutralização.

A invenção será, agora, descrita através de exemplos.
15 Os exemplos seguintes são ilustrativos da invenção e representam as modalidades preferidas, aqueles habilitados no estado da arte sabem ou são capazes de encontrar, usando nada mais que experimentação rotineira, como empregar outros materiais e técnicas apropriadas.

20 **Exemplo 1 - Construção do vetor de expressão pcTPA:**

Um novo plasmídeo de expressão foi construído inserindo a seqüência que codifica o peptídeo sinal do do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA) - SEQ ID
NO:8 no plasmídeo original pcDNA3 (Invitrogen). O fragmento
25 equivalente a esta seqüência foi amplificado por PCR, utilizando iniciadores específicos (Figura 1).

Abaixo apresentamos os oligonucleotídeos usados para a reação de amplificação por PCR. Os sítios de restrição *Hind* III e *EcoRV* estão sublinhados, respectivamente.

SEQ ID NO:1 - Oligonucleotídeo senso (TPA1)

5'GGGGAAGCTTATGGATGCAATGAAGAGG3'

SEQ ID NO:2 - Oligonucleotídeo antisenso (TPA2)

5'GGGGATATCGCTGGGCGAAACGAAGAC3'

5 O produto de PCR, contendo 69 pb, foi digerido e clonado no plasmídeo pcDNA3 entre os sítios das enzimas *HindIII* e *EcoRV*. A sequência foi confirmada por sequenciamento e o plasmídeo recombinante denominado de pcTPA (Figura 1A).

10 **Exemplo 2 - Construção de pE1D2 e pE2D2**

Foram construídos dois plasmídeos (pE1D2 e pE2D2) a partir do plasmídeo pcTPA. O plasmídeo pcTPA é derivado do plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen) com a adição da sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), entre os sítios das enzimas de restrição (*HindIII* e *EcoRV*, a jusante à região promotora derivada do citomegalovírus humano, contido no plasmídeo pcDNA3).

20 O plasmídeo pE1D2 foi construído com a inserção da seqüência que codifica 80% da proteína do envelope viral (E) do vírus da dengue, sorotipo 2 (DENV2), sem a porção C-terminal da proteína E. Esta seqüência, contida entre os nucleotídeos 937 e 2131 do genoma completo do DENV2, cepa Nova Guiné C (NGC) (Genebank: M29095) foi amplificada por 25 PCR, utilizando os oligonucleotídeos senso e antisenso, identificados abaixo como SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4, com os sítios para as enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* sublinhados, respectivamente:

SEQ ID NO:3 - 5'GGGGATATCATGCGTTGCATAGGAATATC3'

SEQ ID NO:4 - 5'GGGGTCTAGATTACGATAGAACTTCCTTTC3'

Em seguida foi feita a clonagem da seqüência no plasmídeo pCTPA entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI*, no mesmo quadro aberto de leitura da seqüência que codifica o peptídeo sinal t-PA, gerando o plasmídeo pE1D2 conforme figura 1B.

O plasmídeo pE2D2 foi construído com a inserção da seqüência que codifica o domínio III da proteína E de DENV2, contida entre os nucleotídeos 1822 e 2131 do genoma completo de DENV2, cepa NGC (Genbank: M29095). Esta seqüência foi amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos senso e antisenso, identificados abaixo como SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:6, com os sítios para as enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* sublinhados, respectivamente:

SEQ ID NO:5 - 5'GGGGGATATCGGAATGTCATACTCTATG3'

SEQ ID NO:4 - 5'GGGGTCTAGATTACGATAGAACTTCCTTTC3'

Em seguida foi feita a clonagem da seqüência no plasmídeo pCTPA entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI*, no mesmo quadro aberto de leitura da seqüência que codifica o peptídeo sinal t-PA, gerando o plasmídeo pE2D2 conforme figura 1C.

Todas as clonagens foram confirmadas por sequenciamento. A bactéria *Escherichia coli*, cepa DH5- α , foi utilizada para as clonagens e produção dos plasmídeos em pequena e grande escala.

Os plasmídeos foram isolados pelo método de extração alcalina, purificados em coluna de troca iônica (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, ressuspensos em

água miliQ estéril e estocados a -20°C até a sua utilização.

Exemplo 3 - Vírus quimérico 17D-D2

O vírus quimérico 17D-D2 foi construído trocando-se os genes que codificam as proteínas de membrana (prM) e do envelope (E) do vírus vacinal da febre amarela YF 17DD pelos genes que codificam as proteínas prM e E de DENV2, cepa NGC. Detalhes da construção do vírus quimérico 17D-D2 podem ser encontrados em Cafour et al., 2001.

Para a construção da quimera 17D-D2, foi utilizada a abordagem do cDNA infeccioso de febre amarela, desenvolvido por Rice et al., 1989, que consiste em dois plasmídeos: pYF5'3'IV e pYFM5.2. Nesta abordagem o genoma do vírus de febre amarela foi separado nos dois plasmídeos citados anteriormente, dada a falta de estabilidade de algumas sequências virais em plasmídeos de alto número de cópias. Estes plasmídeos foram digeridos com enzimas de restrições específicas e os fragmentos gerados foram ligados, reconstituindo o genoma completo do vírus vacinal de febre amarela. Entretanto, testes em macacos com este vírus indicaram a necessidade de modificações genéticas do cDNA para tornar o vírus mais atenuado (Marchevsky et al., 1995). Tais modificações foram realizadas por Galler e Freire (US 6,171,854) e resultaram em novas versões dos plasmídeos pYF5'3'IV e pYFM5.2, denominados G1/2 e T3/27, respectivamente. Posteriormente, foi utilizado o plasmídeo pACNR1180 (Ruggli et al., 1996) que possui uma origem de replicação (P15A), que limita o número de replicações deste plasmídeo, reduzindo assim o número de cópias do DNA

plasmidial em bactérias. O plasmídeo pACNR1180 foi descrito como um plasmídeo ideal para clonagem do genoma do vírus de febre suína, cujo tamanho se assemelha ao do genoma do vírus da febre amarela, permitindo a estabilidade do genoma clonado. Tendo em vista estes resultados, o genoma inteiro do vírus de febre amarela foi clonado em um plasmídeo modificado do pACNR1180 (com a retirada de alguns sítios de enzimas de restrição), gerando o plasmídeo pYF17D/14. O plasmídeo pYF17D/14 foi gerado em duas etapas. Primeiro o plasmídeo G1/2 foi utilizado como molde para amplificação por PCR de diferentes fragmentos que foram inseridos no plasmídeo modificado do pACNR1180, gerando o plasmídeo NSK7. Posteriormente, o plasmídeo NSK7 foi utilizado para a clonagem do restante do genoma do vírus vacinal 17D contido no plasmídeo T3/27, gerando então o plasmídeo pYF17D/14. Todos os plasmídeos foram propagados em *E. coli* MC1061 e purificados em coluna Qiagen. Para a construção da quimera 17D-D2 foi utilizado o vírus DENV2 cepa Nova Guiné. Foi sintetizado um cDNA, de modo semelhante ao descrito anteriormente para as clonagens nas vacinas de DNA, que continha a região do genoma do vírus da dengue que vai do primeiro nucleotídeo correspondente ao gene que codifica a proteína prM até a sequência correspondente ao aminoácido 205 da proteína E. Esta região foi amplificada por PCR e inserida no plasmídeo G1/2 entre os sítios para as enzimas de restrição *ApaI* e *NotI*, gerando o plasmídeo pG1/2 DEN2. O cDNA contendo o genoma completo 17D-D2 foi construído a partir da ligação dos fragmentos: *NotI/NsiI* gerado com digestão do plasmídeo pG1/2 DEN2 (com o promotor SP6, a

região 5' NTR-C de febre amarela e prM-2/3E de DENV2),
NsiI/MluI gerado com a digestão do plasmídeo pYFD/F11/12
(codificando a região 3' de E de DENV1 e o início do gene
NS1 de febre amarela), e MluI/NotI gerado com a digestão
5 do plasmídeo pYF17D/14 (que contém o restante do genoma de
febre amarela). Todos os plasmídeos foram propagados em *E.*
coli XL-1 Blue e purificados com Concert High Purity System
(Invitrogen). O plasmídeo completo foi linearizado com XhoI
e utilizado para a transcrição *in vitro*, através da região
10 promotora SP6. O RNA sintetizado *in vitro* foi utilizado
para a regeneração viral por eletroporação de células Vero
de modo similar ao descrito no documento US 6,171,854.

Exemplo 4 - Avaliação da expressão das proteínas recombinantes

15 A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada
in vitro em células de rim de hamster neonatos (BHK-21)
transfectadas com os diferentes plasmídeos, utilizando
lipofectamina (Invitrogen) de acordo com as instruções do
fabricante. A expressão das proteínas E1 e E2 foi detectada
20 por imunofluorescência nas células BHK transfectadas e
observadas em microscópio óptico de fluorescência
utilizando fluido ascítico anti-DENV2 (ATCC) e anticorpos
anti-IgG de camundongo conjugados a fluoresceína (Southern
Biotechnology). Somente as células transfectadas com os
25 plasmídeos com os plasmídeos pE1D2 e pE2D2 se mostraram
fluorescentes, demonstrando que estas construções são
capazes de mediar a expressão das proteínas do vírus da
dengue em células de mamíferos, conforme Figura 2.

Exemplo 5 - Imunizações

Foram realizados dois experimentos independentes para testar o potencial protetor das vacinas de DNA isoladamente ou em conjunto com o vírus quimérico 17D-D2 no sistema de dose/reforço, utilizando camundongos BALB/c com cerca de 4
5 semanas de idade.

Para as imunizações com as vacinas de DNA, os plasmídeos foram diluídos em PBS (concentração final 1x) e os animais foram inoculados por via intramuscular (im) nos quadríceps posteriores com 100µg/100µL da vacina de DNA
10 por animal (50µg/50µL por pata). Para as imunizações com o vírus quimérico 17D-D2, os animais foram inoculados por via subcutânea (sc) no coxim plantar ou intramuscular (im) nos quadríceps posteriores, com 4 log 10 PFU de vírus diluído em meio M199 (Sigma) ou em PBS. O plasmídeo pCTPA foi
15 utilizado como controle negativo.

Foi realizado um terceiro experimento com imunizações simultâneas (co-administração) de vacinas de DNA e 17D-D2 por via im. Neste caso, as duas vacinas foram misturadas em uma só solução com PBS.

20 Os animais foram separados em grupos (10 camundongos por grupo). Em seguida os animais foram imunizados a cada duas semanas e duas semanas após a última imunização os animais foram desafiados com inoculação por via intracerebral (ic) de uma dose letal de DENV2 NGC (3,8
25 LD₅₀), neuroadaptado a camundongos. Em seguida, os animais foram avaliados diariamente até o 21º dia quanto à morbidade (desenvolvimento de paralisia, principalmente nos membros posteriores) e sobrevivência.

Os cronogramas das imunizações estão representados na

Figura 3. As Tabelas 1, 2 e 3 a seguir mostram os esquemas de imunização.

A Tabela 1 mostra o esquema de imunização do primeiro experimento com protocolo de dose e reforço (prime/boost) ou imunizações individuais.

TABELA 1

Grupos	Imunização
1	pE1D2 (2 doses im)
2	pE1D2 (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
3	pE2D2 (2 doses im)
4	PE2D2 (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
5	PcTPA (2 doses im)
6	pctPA (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
7	17D-D2 (1 dose sc)
8	17D-D2 (2 doses sc)
9	Não imunizado e somente desafiado com DENV2

A Tabela 2 mostra o esquema de imunização do segundo experimento com protocolo de dose e reforço (prime/boost) ou imunizações individuais.

TABELA 2

Grupos	Imunização
1	pE1D2 (2 doses im)
2	pE1D2 (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
3	pE2D2 (2 doses im)
4	pE2D2 (2 doses im) + 17D-D2 (1 dose sc)
5	17D-D2 (2 doses sc)
6	17D-D2 (2 doses im)
7	Não imunizado e somente desafiado com DENV2

A Tabela 3 mostra o esquema de imunização do terceiro experimento com protocolo de imunização simultânea (co-administração).

TABELA 3

Grupos	Imunização
1	pE1D2 + 17D-D2 - 2 doses im
2	pE2D2 + 17D-D2 - 2 doses im
3	pcTPA + 17D-D2 - 2 doses im

Resultados de Proteção - Primeiro Experimento

5 No primeiro experimento os sinais clínicos da doença foram detectados entre o sétimo e o oitavo dia após o desafio com DENV2 nos grupos dos animais não imunizados ou aqueles que receberam o plasmídeo controle (pcTPA). Treze dias após o desafio, 100% destes camundongos apresentaram
10 paralisia ou morte. Por outro lado, 100% dos animais vacinados com somente 2 doses de pE1D2, 2 doses de pE1D2 + 1 dose de 17D-D2, ou 2 doses de 17D-D2, sobreviveram ao desafio.

15 Quanto ao aparecimento de sinais clínicos, somente o grupo de camundongos imunizados com 2 doses de pE1D2 + 1 dose de 17D-D2 não apresentou qualquer sinal.

O grupo de animais que recebeu somente o plasmídeo pE1D2 ou o vírus 17D-D2 apresentou 10% e 20% de paralisia, respectivamente, conforme mostrado nas Figuras 3A e 3B.

20 A vacina pE2D2 se mostrou menos protetora quando comparada à vacina pE1D2. Somente 50% dos animais imunizados com 2 doses de pE2D2 sobreviveram ao desafio e 70% apresentaram morbidade. Por outro lado, 100% dos

animais imunizados com 2 doses de pE2D2 + 1 dose de 17D-D2 sobreviveram ao desafio e somente 10% destes camundongos apresentaram algum sinal clínico da doença, conforme mostrado nas Figuras 3A e 3B.

5 **Resultados de Proteção - Segundo Experimento**

No segundo experimento as proporções de sobrevivência e morbidade nos grupos de animais imunizados com os plasmídeos pE1D2 e pE2D2 isoladamente ou no sistema de dose e reforço (vacina de DNA + 17D-D2) foram semelhantes aos dados obtidos no primeiro experimento. Mais uma vez a imunização no sistema de dose e reforço se mostrou mais eficiente gerando 100% de proteção, conforme Figuras 3C, 3D, 4C e 4D.

Resultados de Proteção - Terceiro Experimento

15 As imunizações simultâneas pE1D2 + 17D-D2 e pE2D2 + 17D-D2 se mostraram tão eficientes quanto as imunizações no sistema dose/reforço, induzindo proteção em 100% dos animais, independente da via de inoculação do vírus 17D-D2 (im ou sc), sem o aparecimento de qualquer sinal clínico da
20 doença.

Nenhuma das vacinas administradas isoladamente (vacina de DNA ou quimera 17D-D2) induziu proteção sem o desenvolvimento de paralisia em nenhum dos animais testados (Figuras 5).

25

Resultados de Soroneutralização

Para a detecção dos níveis de anticorpos neutralizantes gerados com as vacinas testadas, os soros dos animais foram coletados duas semanas após a imunização

- com as vacinas de DNA e/ou vírus quimérico (antes do desafio com DENV) e 21 dias após o desafio com DENV2. Nos ensaios de soroneutralização, os vírus DENV2 foram incubados com diferentes diluições dos soros dos camundongos imunizados e posteriormente foi avaliada a capacidade destes vírus infectar células Vero, através da formação das placas de lise. O título de anticorpos neutralizantes foi calculado a partir da redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀).
- Os resultados estão exemplificados na tabela 4, com os soros dos animais utilizados no primeiro experimento de imunização no sistema de dose e reforço. Os resultados demonstram um aumento significativo dos níveis de anticorpos neutralizantes nos animais que receberam a imunização combinada no sistema de dose/reforço.

TABELA 4			
Títulos de anticorpos neutralizantes (PRNT50)			
Animais	2 doses da vacina pE1D2	2 doses pE1D2 + reforço 17D-D2	2 doses pE1D2 + reforço 17D-D2 + desafio DENV2
1	1:73	>1:640	>1:640
2	1:60	>1:640	>1:640
3	1:8	1:240	>1:640
4	1:24	1:33	1:120
5	ND	1:160	>1:640
6	1:40	ND	>1:640
7	1:47	1:448	>1:640
8	ND	1:533	>1:640

9	1:86	>1:640	>1:640
10	1:25	1:320	>1:640
Controle negativo - 2 doses pCTPA		<1:5	
Controle Positivo - soro de macaco imune		>1:640	

A presente invenção foi exemplificada para DENV2,
5 entretanto a construção de vacinas de DNA contra os demais sorotipos do vírus dengue (DENV 1,3 e 4), obedece a mesma metodologia aqui descrita para o DENV2.

A(s) composição(ões) da presente invenção podem conter um veículo farmacêutico aceitável. Qualquer veículo
10 farmacêutico conhecido daqueles especialistas na arte pode ser usado na(s) composição(ões) da presente invenção, dependendo do modo de administração.

O termo veículo farmacêutico se refere a um diluente, adjuvante, excipiente, ou um veículo com o qual a vacina de
15 DNA ou o vírus quimérico é administrado. Esses veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como água e óleo, incluindo aqueles de origem animal, vegetal ou sintética. Excipientes farmacêuticos incluem amido, glucose, frutose, gelatina, malte, arroz, farinha, sílica
20 gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite em pó desnatado, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e semelhantes. A(s) composição(ões) da presente invenção, se desejado, podem conter quantidades pequenas de agentes emulsificantes, ou
25 agentes tamponadores de pH.

A presença de um veículo farmacêutico dependerá da administração da composição vacina. Por exemplo, para a administração parenteral, tal como uma injeção subcutânea,

o veículo preferido consiste de água, solução salina, álcool, gorduras, ceras ou solução tampão. Para administração oral, podem ser empregados, manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, 5 celulose, glucose, sucrose e carbonato de magnésio.

Também podem ser usados agentes contendo uma substância para proteger o antígeno de rápido catabolismo, tal como hidróxido de alumínio ou óleo mineral.

A presente invenção utilizou inoculação das vacinas de 10 DNA por via im com duas doses DNA, com 100µg por dose, administradas em intervalo de duas semanas. Também podem ser utilizados números diferentes de doses (como uma, três, quatro, etc) com concentrações diferentes de DNA (variando de 0.1µg até 1g), e administradas em intervalos de tempo 15 variados (de 1 semana até 1 ano entre cada dose de DNA).

As imunizações das vacinas de DNA da presente invenção foram realizadas por via im através de injeções com agulha. Outras vias de imunização também podem ser utilizadas como por exemplo por via intradérmica, subcutânea, transcutânea, 20 intravenosa ou intraperitoneal. Tais inoculações podem ser administradas com ou sem auxílio de agulha. Como exemplo de inoculação sem agulhas, podemos citar a utilização de inoculação por biobalística (*Genegun*), Biojector, adesivos (*pads*), etc.

25 Na nova abordagem de imunização da presente invenção, ou seja, o sistema de dose (vacina de DNA) e reforço (vírus quimérico 17D-D2) ou imunizações simultâneas (co-administração), as vacinas de DNA foram administradas por via im através de seringas com agulhas e o vírus quimérico

17D-D2 foi inoculado também com seringas por via im ou sc. Para esta abordagem também poderão ser utilizadas outras vias de inoculação com ou sem agulhas conforme exemplificado acima. As imunizações com vacinas de DNA e 5 17D-D2 foram administradas em intervalos de duas semanas, tanto no sistema de dose e reforço quanto de co-administração. Tais inoculações também podem ser realizadas com intervalos de tempo variados (de 1 semana até 5 anos), com diferentes doses (uma, duas, três e etc). As 10 concentrações das vacinas de DNA inoculadas (100 µg por dose) assim como dos vírus quiméricos (4 log 10 PFU) também podem variar conforme adequação do protocolo.

No sistema de dose e reforço da presente invenção, a primeira imunização (dose) foi realizada com vacinas de DNA 15 enquanto que o reforço foi dado pela imunização com vírus quimérico. Também é possível inverter este protocolo, com a primeira imunização com vírus quiméricos e o reforço com vacinas de DNA, administradas em intervalos variados.

A presente invenção utilizou o gene que codifica a 20 proteína E do vírus da dengue. Também podem ser utilizados outros genes deste vírus, tais como as seqüências que codificam as proteínas C (capsídeo), prM (membrana), NS1 (não-estrutural 1) e NS3 (não-estrutural 3). A proteína NS1 já foi testada em vacinas de DNA isoladas demonstrando 25 potencial protetor contra o vírus da dengue (Costa et al., 2006, 2007).

A nova abordagem de imunização da presente invenção utiliza vacinas de DNA e vírus quimérico vacinal de febre amarela com genes do vírus da dengue (17D-D2). Esta

abordagem também pode ser utilizada com vacinas de DNA e vírus quimérico vacinal 17D contendo genes de outros flavivírus. A abordagem também pode ser usada com vacinas de DNA contendo genes de febre amarela e vírus vacinal 17D.

5 Assim, de acordo com a presente invenção é fornecida uma vacina efetiva contra o vírus dengue. Adicionalmente, a invenção também demonstrou um novo método para induzir resposta imune contra vírus da dengue baseado em vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas, no
10 sistema de dose (vacina de DNA) e reforço (vírus quimérico) ou co-administração simultânea das duas estratégias vacinais (vacinas de DNA e vírus quiméricos em uma mesma formulação). Uma composição vacinal e um kit compreendendo vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue
15 vírus quiméricos também é apresentado na presente invenção.

Referências

[1] Barrett AD. Current status of flavivirus vaccines. Ann N Y Acad Sci. 2001, 951: 262-71

[2] Blair PJ, Kochel TJ, Raviprakash K, Guevara C, Salazar M, Wu SJ, Olson JG, Porter KR. Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. Vaccine. 2006, 24:1427-32.

[3] Caufour, P.S., Motta, M.C.A., Yamamura, A.M.Y., Vazquez, S., Ferreira, I.I., Jabor, A.V., Bonaldo, M.C., Freire, M.S. & Galler, R. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses. Virus Res., 2001 79:1-14).

[4] Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In:

Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Gubler, D.J.; Kuno, G. (eds), CAB International Publisher, 1997, pp. 175-198.

5 [5] Chen S, Yu M, Jiang T, Deng Y, Qin C, Qin E. Induction of tetravalent protective immunity against four dengue serotypes by the tandem domain III of the envelope protein. DNA Cell Biol. 2007, 26:361-7.

10 [6] Costa SM, Paes MV, Barreto DF, Pinhao AT, Barth OM, Queiroz JL, Armoa GR, Freire MS & Alves AMB. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. Vaccine 2006, 24: 195-105.

15 [7] Costa S.M., Azevedo A.S., Paes M.V., Sarges F.S., Freire M.S. & Alves A.M. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. Virology 2007, 358:413-423.

20 [8] Encke J, zu Putlitz J, Geissler M, Wands JR. Genetic immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural proteins of the hepatitis C virus in a murine model. J. Immunol. 1998, 161: 4917-23.

25 [9] Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM, Jabor AV, Motta MC, Bonaldo MC, Coutinho ES, Freire MS. Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. Braz J Med Biol Res. 2005, 38:1835-46.

- [10] Kinney RM & Huang CY-H Development of new vaccines against dengue fever and japanese encefalitis. *Intervirol* 2001, 44: 176-197.
- [11] Kochel T., Wu S.-J., Raviprakash K., Hobart P., Hoffman S., Porter K. & Hayes, C. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 1997, 15: 547-552.
- [12] Lin YL, Chen LK, Liao CL, Yeh CT, Ma SH, Chen JL, Huang YL, Chen SS, Chiang HY. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol.* 1998, 72: 191-200.
- [13] Marchevsky RS, Mariano J, Ferreira VS, Almeida E, Cerqueira MJ, Carvalho R, Pissurno JW, Travassos da Rosa APA, Simões MC, Santos CND, Ferreira II, Muylaert IR, Mann GF, Rice CM and Galler R. Phenotypic analysis of yellow fever virus derived from complementary DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995, 52:75-80.
- [14] Phillpotts RJ, Venugopal K, Brooks T. Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol.* 1996, 141:743-749.
- [15] Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 1983, 301:214-21.
- [16] Putnak R, Fuller J, VanderZanden L, Innis BL, Vaughn DW. *Am J Trop Med Hyg.* Vaccination of rhesus macaques

against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. 2003, 68:469-76.

[17] Raviprakash K., Porter K.R., Kochel T.J, Ewing D., Simmons M., Phillips I, Murphy G.S., Weiss W.R. & Hayes
5 C.G. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. J. Gen. Virol. 2000, 81: 1569-1667.

[18] Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-
10 length cDNA templates produced by in vitro ligation. New Biol. 1989, 1:285-96.

[19] Ruggli N; Tratschin J-D.; Mittelholzer C; Hofmann MA. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and Transcription of infectious RNA from stably
15 cloned full-length cDNA. 1996, J. Virol. 70:3478-3487.

[20] Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou HY, Huang JL, Shaio MF & Sytwu HK. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-
20 structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. Vaccine 2003, 21, 3919-3929.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para induzir resposta imune contra vírus da dengue **caracterizado** por compreender a administração a um paciente de vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D.

5 2. Método de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pela administração ao paciente ser efetuada em imunizações combinadas, no sistema de dose (vacinas de DNA) e reforço (vírus quiméricos) ou co-administração simultânea das duas estratégias vacinais (vacinas de DNA e
10 vírus quiméricos em uma mesma formulação).

3. Composição vacinal contra o vírus dengue **caracterizado** por compreender:

(a) Vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes
15 plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as seqüências que correspondem aos domínios III destas proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio
20 de tecido humano (t-PA);

(b) Vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, pela tecnologia de obtenção de clone infeccioso, com a substituição das seqüências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela pelas
25 seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus dengue dos diferentes sorotipos; e,

(c) um veículo farmacêuticamente aceitável.

4. Composição de acordo com a reivindicação 3 **caracterizado** a vacina de DNA por compreender:

- plasmídeo pE1 construído com a inserção da seqüência que codifica 80% da proteína do envelope viral (E) do vírus da dengue, sem a porção C-terminal da proteína E do vírus da dengue.

5 5. Composição de acordo com a reivindicação 3 **caracterizado** a vacina de DNA por compreender:

 - um plasmídeo pE2 construído com a inserção da seqüência que codifica o domínio III da proteína E do vírus da dengue, contida entre os nucleotídeos 1822 e 2125 do
10 genoma completo do vírus da dengue.

 6. Kit **caracterizado** por compreender:

 (a) Vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo os genes que codificam as proteínas
15 E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue, ou somente as seqüências que correspondem aos domínios III destas proteínas, todas fusionadas à seqüência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA); e,

20 (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado, pela tecnologia de obtenção de clone infeccioso, com a substituição das seqüências que codificam as proteínas prM e E de febre amarela pelas seqüências que codificam as proteínas prM e E dos vírus
25 dengue dos diferentes sorotipos.

 7. Plasmídeo recombinante contendo o gene da proteína E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue fusionado à seqüência que codifica o peptídeo sinal do t-PA **caracterizado** por ser construído com a inserção da

seqüência que codifica 80% da proteína do envelope viral (E) do vírus da dengue sem a porção C-terminal da proteína E, onde a dita seqüência é amplificada utilizando os oligonucleotídeos senso e antisenso, identificados como SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4 e em seguida efetuada a clonagem da seqüência no plasmídeo pCTPA entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* no mesmo quadro aberto de leitura da seqüência que codifica o peptídeo sinal t-PA, gerando o plasmídeo recombinante.

10 8. Plasmídeo de acordo com a reivindicação 7 **caracterizado** por a seqüência que codifica 80% da proteína do envelope viral (E) do vírus da dengue estar contida entre os nucleotídeos 937 e 213125 do genoma completo do DENV2, cepa Nova Guiné C (NGC) (Genebank: M29095).

15 9. Plasmídeo recombinante contendo o gene da proteína E a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue fusionado à seqüência que codifica o peptídeo sinal do t-PA **caracterizado** por ser construído com a inserção da seqüência que codifica o domínio III da proteína E do vírus da dengue, onde a dita seqüência é amplificada utilizando os oligonucleotídeos senso e antisenso, identificados como SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:4, entre os sítios para as enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI* e em seguida realizada a clonagem da seqüência no plasmídeo pCTPA entre os sítios das enzimas de restrição *EcoRV* e *XbaI*, no mesmo quadro aberto de leitura da seqüência que codifica o peptídeo sinal t-PA, gerando o plasmídeo recombinante.

25 10. Plasmídeo de acordo com a reivindicação 9 **caracterizado** por a seqüência que codifica o domínio III da

proteína E do vírus da dengue estar contida entre os nucleotídeos 1822 e 213125 do genoma completo de DENV2, cepa NGC (Genebank: M29095).

SEQUENCE LISTING

<110> Fundação Oswaldo Cruz
 <120> MÉTODO, KIT, PLASMÍDEO E COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR RESPOSTA IMUNE
 CONTRA VÍRUS DA DENGUE BASEADO VACINAS DE DNA E VÍRUS QUIMÉRICOS
 <130> P1753
 <150> PI0904020-0
 <151> 2009-10-01
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens (primer senso t-PA)
 <400> 1
 ggggaagctt atggatgcaa tgaagagg 28
 <210> 2
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens (primer antisenso t-PA)
 <400> 2
 ggggatatcg ctgggcgaaa cgaagac 27
 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Vírus dengue sorotipo 2 (primer senso E80%)
 <400> 3
 gggggatatc atgcgttgca taggaatac 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Vírus dengue sorotipo 2 (primer antisenso E80%)
 <400> 4
 ggggtctaga ttacgataga acttccttc 30
 <210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Vírus dengue sorotipo 2 (primer senso domínio III E)
 <400> 5
 gggggatatc ggaatgtcat actctatg 28
 <210> 6
 <211> 1203
 <212> DNA
 <213> Vírus dengue sorotipo 2 (E80%)
 <400> 6
 atgcgttgca taggaatac aaatagagac tttgtagaag gggtttcagg aggaagctgg 60
 gttgacatag tcttagaaca tggaagctgt gtgacgacga tggcaaaaaa caaccaaca 120

ttggattttg aactgataga aacagaagcc aaacaacctg ccactctaag gaagtactgt	180
atagaggcaa agctgaccaa cacaacaaca gattctcgct gcccaacaca aggagaaccc	240
agcctaaatg aagagcagga caaaagggtc gtctgcaaac actccatggt ggacagagga	300
tggggaaatg gatgtggact atttggaaaa ggaggcattg tgacctgtgc tatggtcaca	360
tgcaaaaaga acatgaaagg aaaagtcgtg caaccagaaa acttgaata caccattgtg	420
ataacacctc actcagggga agagcatgca gtcggaaatg acacaggaaa acatggcaag	480
gaaatcaaaa taacaccaca gagttccatc acagaagcag agttgacagg ctatggcact	540
gtcacgatgg agtgctctcc gagaacgggc ctcgacttca atgagatggt gttgctgcaa	600
atggaaaata aagcttggct ggtgcacagg caatggttcc tagacctgcc gttgccatgg	660
ctgcccggag cggacacaca aggatcaaat tggatacaga aagagacatt ggtcactttc	720
aaaaatcccc atgcgaagaa acaggatggt gttgttttgg gatcccaaga aggggccatg	780
cacacagcac tcacaggggc cacagaaatc cagatgtcat caggaaactt actgttcaca	840
ggacatctca agtgcaggct gaggatggac aaactacagc tcaaaggaat gtcatactct	900
atgtgcacag gaaagttaa agttgtgaag gaaatagcag aaacacaaca tggacaata	960
gttatcagag tacaatatga aggggacggt tctccatgta agatcccttt tgagataatg	1020
gatttgaaaa aaagacatgt ttaggtcgc ctgattacag tcaacccaat cgtaacagaa	1080
aaagatagcc cagtcaacat agaagcagaa cctccattcg gagacagcta catcatcata	1140
ggagtagagc cgggacaatt gaagctcaac tggtttaaga aaggaagttc tatcgtaatc	1200
tag	1203

<210> 7
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Vírus dengue sorotipo 2 (domIII E)

<400> 7	
ggaatgtcat actctatgtg cacaggaaag tttaaagttg tgaaggaaat agcagaaaca	60
caacatggaa caatagttat cagagtacaa tatgaagggg acggttctcc atgtaagatc	120
ccttttgaga taatggattt ggaaaaaaga catgttttag gtcgcctgat tacagtcaac	180
ccaatcgtaa cagaaaaaga tagcccagtc aacatagaag cagaacctcc attcggagac	240
agctacatca tcataggagt agagccggga caattgaagc tcaactggtt taagaaagga	300
agttctatcg taatctag	318

<210> 8
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens (peptídeo sinal t-PA)

<400> 8	
atggatgcaa tgaagagagg gctctgctgt gtgctgctgc tgtgtggagc agtcttcggt	60
tcgcccagc	69

<210> 9
 <211> 1983
 <212> DNA
 <213> Virus dengue (prM/E)

<400> 9
 ttccatttaa ccacacgtaa cggagaacca cacatgatcg tcagtagaca agagaaaggg 60
 aaaagtcttc tgtttaaaac agaggatggg gtgaacatgt gtaccctcat ggccatggac 120
 cttggtgaat tgtgtgaaga tacaatcacg tacaagtgtc cttttctcaa gcagaatgaa 180
 ccagaagaca tagattggtg gtgcaactct acgtccacat gggtaactta tgggacgtgt 240
 accaccacag gagaacacag aagagaaaaa agatcagtgg cactcgttcc acatgtggga 300
 atgggactgg agacacgaac tgaaacatgg atgtcatcag aaggggcctg gaaacatgcc 360
 cagagaattg aaacttggat cttgagacat ccaggcttta ccataatggc agcaatcctg 420
 gcatacacca taggaacgac acatttcaa agagccctga ttttcatctt actgacagct 480
 gtcgctcctt caatgacaat gcgttgcata ggaatatcaa atagagactt tgtagaaggg 540
 gtttcaggag gaagctgggt tgacatagtc ttagaacatg gaagctgtgt gacgacgatg 600
 gcaaaaaaca aaccaacatt ggattttgaa ctgatagaaa cagaagccaa acaacctgcc 660
 actctaagga agtactgtat agaggcaaag ctgaccaaca caacaacaga ttctcgctgc 720
 ccaacacaag gagaaccag cctaaatgaa gagcaggaca aaaggttcgt ctgcaaacac 780
 tccatggtgg acagaggatg gggaaatgga tgtggactat ttggaaaagg aggcattgtg 840
 acctgtgcta tgttcacatg caaaaagaac atgaaaggaa aagtcgtgca accagaaaac 900
 ttggaataca ccattgtgat aacacctcac tcaggggaag agcatgcagt cggaaatgac 960
 acaggaaac atggcaagga aatcaaaata acaccacaga gttccatcac agaagcagag 1020
 ttgacaggct atggcactgt cacgatggag tgctctccga gaacgggcct cgacttcaat 1080
 gagatggtgt tgctgcaaat ggaaaataaa gcttggctgg tgcacaggca atggttccta 1140
 gacctgccgt tgccatggct gcccggagcg gacacacaag gatcaaattg gatacagaaa 1200
 gagacattgg tcactttcaa aaatccccat gcgaagaaac aggatggtgt tgttttggga 1260
 tccaagaag gggccatgca cacagcactc acaggggcca cagaaatcca gatgtcatca 1320
 ggaaacttac tgttcacagg acatctcaag tgcaggctga ggatggacaa actacagctc 1380
 aaaggaatgt catactctat gtgcacagga aagttaaag ttgtgaagga aatagcagaa 1440
 acacaacatg gaacaatagt tatcagagta caatatgaag gggacggttc tccatgtaag 1500
 atcccttttg agataatgga tttggaaaaa agacatgttt taggtcgctt gattacagtc 1560
 aaccaatcg taacagaaaa agatagccca gtcaacatag aagcagaacc tccattcggg 1620
 gacagctaca tcatcatagg agtagagccg ggacaattga agctcaactg gtttaagaaa 1680
 ggaagttcta tcggccaaat gattgagaca acaatgaggg gagcgaagag aatggccatt 1740
 ttaggtgaca cagcttggga ttttgatcc ctgggaggag tgtttacatc tataggaaag 1800
 gctctccacc aagttttcgg agcaatctat ggggctgcct tcagtggggg ctcatggatt 1860
 atgaaaatcc tcataggagt cattatcaca tggataggaa tgaattcacg cagcacctca 1920

ctgtctgtgt cactagatt ggtgggagtc gtgacgctgt atttgggagt tatgggagcag 1980

gcc 1983

RESUMO

MÉTODO, KIT, PLASMÍDEO E COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR RESPOSTA IMUNE CONTRA VÍRUS DA DENGUE BASEADO EM VACINAS DE DNA E VÍRUS QUIMÉRICOS

5 A presente invenção se refere a um método para induzir resposta imune contra vírus da dengue baseado em vacinas de DNA e vírus quiméricos 17D em imunizações combinadas ou co-administradas. Também estão dentro do escopo da presente invenção, vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do

10 vírus dengue a partir da construção de diferentes plasmídeos recombinantes contendo o gene que codifica a proteína E, ou somente a seqüência que corresponde ao domínio III desta proteína, a partir de cada sorotipo viral do vírus dengue (DENV1-4). A invenção fornece ainda uma

15 composição vacinal consistindo de (a) vacinas de DNA contra os quatro sorotipos do vírus dengue, (b) vírus quiméricos compreendendo o vírus vacinal de febre amarela 17D modificado; e (c) um veículo farmacêuticamente aceitável, está incluído no escopo de proteção.