



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA**



**SABRYNNA BRITO OLIVEIRA**

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR, EM MODELO  
MURINO, DE DIFERENTES CONSTRUÇÕES DO *VACCINIA VIRUS*  
ANKARA MODIFICADO (MVA) EXPRESSANDO A PROTEÍNA E DE  
*DENGUE VIRUS* SOROTIPOS 1, 2 E 4.**

**BELO HORIZONTE / MG**

**2019**

**SABRYNNA BRITO OLIVEIRA**

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR, EM MODELO  
MURINO, DE DIFERENTES CONSTRUÇÕES DO *VACCINIA VIRUS*  
ANKARA MODIFICADO (MVA) EXPRESSANDO A PROTEÍNA E DE  
*DENGUE VIRUS* SOROTIPOS 1, 2 E 4.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca  
Co-orientador: Dra. Bárbara Resende Quinan

**BELO HORIZONTE / MG**

**2019**

043 Oliveira, Sabryna Brito.  
Construção e avaliação do potencial protetor, em modelo murino, de diferentes construções do Vaccinia Virus Ankara Modificado (MVA) expressando a proteína e de Dengue Virus sorotipos 1, 2 e 4 [manuscrito] / Sabryna Brito Oliveira. – 2019.

149 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca. Co-orientador: Dra. Bárbara Resende Quinan.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vírus da Dengue. 3. Vacinas Sintéticas. 4. Vírus Vaccinia. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Quinan, Bárbara Resende. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE Sabryna Brito Oliveira  
Nº REGISTRO: 2015706326

Relator e Suplente: Dr. Luis Adan Flores Andrade  
Suplente externo: Prof. Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Às 08:30 horas do dia 30 de setembro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Erna Geessien Kroon (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Beatriz Senra Álvares da Silva Santos (UFMG), Cíntia Lopes de Brito Magalhães (UFOP), Marcele Neves Rocha (Fiocruz) e o Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Orientador, para julgar o trabalho final "Construção e Avaliação do Potencial Protetor, em Modelo Murino, de Diferentes Construções do *Vaccinia Virus Ankara* Modificado (MVA) Expressando a Proteína E de *Dengue Virus* Sorotipos 1, 2 e 4", da aluna **Sabryna Brito Oliveira**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de setembro de 2019.

Profª. Drª. Erna Geessien Kroon

Drª. Beatriz Senra Álvares da Silva Santos

Profª. Dra. Cíntia Lopes de Brito Magalhães

Drª Marcele Neves Rocha

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador)

Profª. Betânia Paiva Drumond  
Subcoordenadora

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca, orientador e coordenador do PPGM, pela oportunidade e paciência durante esses anos. À Dra. Barbara Quinan, pela disponibilidade em orientar, acompanhar e ajudar na execução desse trabalho. Às Dras Beatriz Senra, Cíntia Magalhães, Erna Kroon e Marcele Rocha, banca avaliadora desse trabalho, pelas contribuições valiosas.

A todos do LVBA, pelas experiências compartilhadas. À Dany, Gaby e Raíssa, por serem a força e calma na reta final, por resignificarem a palavra amizade. À Ângela, Anderson, Eduarda, Karen, Karine, Luís, Mateus e Lethícia, pelos “paranauês”.

À Tania Mara, que merece mais que apenas um parágrafo de agradecimento, pela ajuda, força, confiança, injeções de ânimo, mensagens de apoio. Por abrir a casa e a família para me receber, por abrir meus olhos, por me ensinar. Estou ciente de que você fez mais do que podia e nunca esquecerei disso!

A todos os professores do PPGM, em especial ao Prof. Luiz Macêdo. Aos colegas de doutorado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas no decorrer das disciplinas e experimentos. Aos demais funcionários responsáveis pelo bom funcionamento deste departamento.

Ao Prof. Dr. Alexandre Machado, exemplo de bondade gratuita, humildade, persistência e inteligência. Por ter me feito não desistir de mim. Que o sr. continue despertando a força de cada um que cruzar o seu caminho! À Thaís, Natalinha, Bia, Andreza, Gustavo, pelos risos descontrolados, companheirismo e pitadas de veneno; à Kety e Ana e demais alunos do IDV pela acolhida e auxílio nos experimentos.

À D. Rose, mãe-amiga, pelas orações poderosas. Por, mesmo de coração partido, estar inteira por mim. À Emanuela, Rafaela, Alex e Thiago, pela torcida e apoio. Ao Túlio, pela paciência e compreensão, por não soltar a minha mão no meio do furacão. Aos amigos Mara Dayanne, Morgana, Eliclécio, Kélvio e Marília, com quem sou casada há quase uma década e que estão comigo na saúde e na doença, na tristeza e alegria. Aos demais que cruzaram meu caminho, sejam pedras, sejam flores. Todos tiveram um papel fundamental nesses anos de aprendizado.

*“Não sou nem otimista, nem pessimista. Os otimistas são ingênuos, e os pessimistas amargos. Sou um realista esperançoso. Sou um homem da esperança. Sei que é para um futuro muito longínquo. Sonho com o dia em que o sol de Deus vai espalhar justiça pelo mundo todo. ”*

*Ariano Suassuna*

## RESUMO

A dengue é uma das principais arboviroses que afeta o ser humano e um grave problema de saúde pública. Os quatro sorotipos do *Dengue virus* (DENV1, 2, 3 e 4) são transmitidos através da picada de mosquitos fêmea do gênero *Aedes*. A vacina disponível atualmente apresenta lacunas imunológicas, o que motiva a continuidade de pesquisas em busca de uma vacina eficaz. O vírus *Vaccinia Ankara Modificado* (MVA) está entre os vetores virais mais promissores e intensamente estudados mundialmente e é considerado como uma excelente ferramenta para a geração de vacinas. O objetivo dessa pesquisa foi construir MVA recombinantes expressando a proteína E de DENV1, 2 e 4 e avaliar o potencial protetor dessas construções em modelo murino. Genes sintéticos da proteína E de DENV1, 2 e 4 foram desenhados, otimizados, obtidos comercialmente e subclonados no plasmídeo *pLW44*, dando origem aos plasmídeos de transferência, utilizados na construção dos vírus recombinantes. Culturas de fibroblasto de embrião de galinha (CEF) ou BHK-21 foram infectadas por MVA e transfectadas pelos plasmídeos de transferência *pLW44-DENV1*, *pLW44-DENV2* ou *pLW44-DENV4*, separadamente, para a construção dos MVAs recombinantes (rMVAs). Os rMVAs gerados tiveram a sua construção confirmada por PCR, sequenciamento e citometria de fluxo. O potencial protetor do rMVA-DENV1 foi testado em camundongos C57/BL6 em esquema de imunização dose-reforço homólogo, seguido de desafio intracranial com o DENV correspondente. Os animais foram imunizados com  $10^7$  pfu ou  $10^8$  pfu de rMVA-DENV1 e desafiados com DENV1 Mochizucki. Durante o desafio os animais foram monitorados e avaliados quanto ao seu estado geral de saúde pelo protocolo SHIRPA. Com base nos resultados obtidos podemos concluir que as construções dos diferentes vírus recombinantes se deram de maneira eficaz, sobretudo a de rMVA-DENV1, a única testada quanto à capacidade protetora. Os dados gerados nessa pesquisa serão somados aos obtidos anteriormente para DENV3 visando à obtenção de uma vacina tetravalente contra DENV.

**Palavras-chave:** vírus da dengue, vacina recombinante, MVA.

## ABSTRACT

Dengue is the main arbovirus that affecting humans and a serious public health problem. The four dengue virus serotypes (DENV1, 2, 3 and 4) are transmitted through the bite of female *Aedes* mosquitoes. A vaccine available worldwide has immunological gaps, which motivates further research for an effective vaccine. The Modified Vaccinia Ankara Virus (MVA) is among the most advanced and intensely studied viral vectors worldwide, and is considered as an excellent tool for vaccine generation. The aim of this work was to construct recombinant MVAs expressing the protein E of DENV1, 2 and 4 and to evaluate the protective potential of these constructs in a murine model. Synthetic genes coding for protein E from DENV1, 2 and 4 were designed, optimized, commercially obtained and subcloned into plasmid pLW44, giving rise to transfer plasmids used in the construction of recombinant viruses. Chicken embryo fibroblast cultures – CEF, or BHK-21 were infected with MVA and transfected with the transfer plasmids pLW44-DENV1, pLW44-DENV2 and pLW44-DENV4 for the construction of recombinant MVAs (rMVA). The generated rMVAs had their correct construction confirmed by PCR, sequencing and flow cytometry. The protective potential of rMVA-DENV1 was tested in C57 / BL6 mice on a homologous dose-boosting immunization schedule, followed by intracranial challenge with the corresponding DENV. Animals were immunized with  $10^7$  pfu or  $10^8$  pfu of rVA-DENV1 and challenged with DENV1 Mochizuki. During the challenge, they were monitored evaluated through a SHIRPA protocol. Based on the results we can conclude that the construction of the different recombinant viruses was effective, especially rMVA-DENV1, the only one tested for protective capacity. The data generated in this research can be added to those previously obtained for DENV3 in order to obtain a tetravalent vaccine against DENV.

**Key words:** dengue virus, recombinant vaccine, MVA

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIÇÃO	PÁG
Figura 1.	Introdução do DENV no Brasil no século XX.	23
Figura 2.	Representação esquemática da partícula do DENV.	24
Figura 3.	Organização do genoma do DENV.	25
Figura 4.	Estrutura da proteína E de DENV e representação esquemática do processo de fusão.	26
Figura 5.	Receptores celulares que medeiam a entrada de DENV na célula hospedeira.	28
Figura 6.	Representação esquemática do ciclo de replicação do DENV.	29
Figura 7.	Distribuição global da dengue.	32
Figura 8.	Distribuição da circulação dos sorotipos do DENV em países e territórios da Região das Américas, 1995-2018.	35
Figura 9.	Distribuição da incidência de casos prováveis de dengue (/100mil hab.), até a Semana Epidemiológica 34, Brasil, 2019.	36
Figura 10.	Ciclo de transmissão de DENV em humanos e mosquitos.	38
Figura 11.	Evolução clínica temporal e estágios da doença por DENV.	40
Figura 12.	Classificação de risco e manejo do paciente com suspeita de dengue.	41
Figura 13.	Modelo do aumento da infecção pelo DENV dependente de anticorpo – ADE.	43
Figura 14.	Resposta do hospedeiro à inoculação cutânea de DENV.	44
Figura 15.	Morfologia da partícula viral dos <i>Poxvirus</i> .	51
Figura 16.	Plasmídeo pLW44.	61
Figura 17.	Sequências consenso otimizadas do gene E de DENV	84
Figura 18.	Desenho esquemático dos plasmídeos de transferência pLW44 contendo os genes E de DENV1, 2 e 4.	85
Figura 19.	Digestão enzimática dos fragmentos da proteína E de pLW44-DENV1.	86

Figura 20.	Digestão enzimática dos fragmentos da proteína E de ρLW44-DENV2.	88
Figura 21.	Digestão enzimática dos fragmentos da proteína E de ρLW44-DENV4.	89
Figura 22.	Geração e seleção de vírus rMVA-DENV1 em cultura de células BHK-21.	91
Figura 23.	Análise da expressão da proteína E de DENV1 e DENV3 pelos vetores MVA recombinantes	92
Figura 24.	Geração e seleção de vírus rMVA-DENV2 em cultura de células CEF.	93
Figura 25.	Geração e seleção de vírus rMVA-DENV4 em cultura de células CEF.	93
Figura 26.	Amplificação dos fragmentos do gene que codifica a proteína E de DENV4 no vírus recombinante.	95
Figura 27.	Avaliação da proteção da vacina rMVA-DENV1 após desafio intracranial com DENV1 Mochizuki.	97
Figura 28.	Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas rMVA-DENV1 e rMVA-DENV3 após desafio intracranial com DENV1 Mochizuki.	98
Figura 29.	Avaliação da proteção da vacina rMVA-DENV1 em alta dose após desafio intracranial com DENV1 Mochizuki.	101
Figura 30.	Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas rMVA-DENV1 E rMVA-DENV3 após desafio intracranial.	102
Figura 31.	Avaliação da proteção da vacina rMVA-DENV1, em dois protocolos de imunização, após desafio intracranial.	103
Figura 32.	Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com dois protocolos de imunização usando a vacina rMVA-DENV1E após desafio intracranial.	104

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>PÁG</b>
Tabela 1.	Eficácia da proteção da vacina CYD-TDV contra os sorotipos de DENV	48
Tabela 2.	Vacinas em teste contra a dengue.	49
Tabela 3.	Alterações realizadas nos genes E de DENV 1, 2 e 4.	60
Tabela 4.	Painel de enzimas de restrição utilizadas para a confirmação da construção dos plasmídeos de transferência e fragmento esperados.	66
Tabela 5.	Iniciadores utilizados para a verificação do gene E de DENV1, 2 e 4.	66
Tabela 6.	Esquema de imunização dose-reforço homólogo para a vacina rMVA-DENV1.	80
Tabela 7	Esquema de desafio dos grupos imunizados com as vacinas recombinantes.	80
Tabela 8.	Parâmetros avaliados pelo protocolo SHIRPA.	81
Tabela 9.	Dose letal dos vírus DENV1 e DENV3	96
Tabela 10.	Nova dose letal dos vírus DENV1 e DENV3.	100
Tabela 11.	. Desempenho dos vírus recombinantes rMVA-DENV1 e rMVA-DENV3 em desafio intracranial murino.	105

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ADE	Reforço dependente de anticorpos, do inglês <i>Antibody Dependent Enhancement</i>
BHK-21	Células de rim de camundongo neonato, do inglês <i>Baby Hamster Kidney</i>
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Proteína do capsídeo do vírus da dengue
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CD	Proteína de superfície dos linfócitos T
CEF	Células de fibroblasto de embrião de galinha, do inglês <i>Chicken Embryo Fibroblasts</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
D.O.	Densidade ótica
DC	Células dendríticas, do inglês <i>Dendritic Cells</i>
DENV	Dengue vírus
DMEM	Meio Eagle Modificado Dubeco
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DSS	Choque séptico da dengue, do inglês <i>Dengue Septic Shock</i>
E	Proteína do envelope do vírus da dengue
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEV	Vírus envelopados extracelulares, do inglês <i>Enveloped Extracellular Virus</i>
EUA	Estados Unidos da América
FD	Febre da dengue
FeLV	Vírus da leucemia viral felina, do inglês <i>Feline Leukemia Virus</i>
FHD	Febre Hemorrágica da Dengue
FIV	Vírus da imunodeficiência felina, do inglês <i>Feline Immunodeficiency Virus</i>
G	Força centrífuga
GFP	Proteína verde fluorescente, do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Hora / horas
HCV	Vírus da Hepatite C, do inglês <i>Hepatitis C Virus</i>
HeLa	Células imortalizadas de câncer cervical oriundas paciente Henrietta Lacks
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	Antígeno leucocitário humano, do inglês <i>Human Leukocyte Antigen</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMV	Vírus intracelulares maduros, do inglês <i>Intracellular Mature Virus</i>
JEV	Vírus da encefalite japonesa, do inglês <i>Japanese Encephalitis Virus</i>

kB	Par de base
kDa	Kilodalton
L	Litro
LB	Meio Luria Bertoni
LVBA	Laboratório de Virologia Básica e Aplicada
M	Proteína de membrana do vírus da dengue
m.o.i.	Multiplicidade de infecção, do inglês <i>Multiplicity Of Infection</i>
MEGA	Programa de Bioinformática <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
min	Minuto / minutos
mL	Mililitros
MVA	Vírus vaccínia Ankara Modificado, do inglês <i>Modified Vaccinia Virus Ankara</i>
Nal	Iodeto de sódio
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
NS	Proteína não-estrutural do vírus da dengue
NYVAC	Vírus Vaccinia <i>New York</i>
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução salina tamponada, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
pBSK	plasmídeo pBluescript II SK(-)
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
pEZ	Plasmídeo pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp
pH	Potencial hidrogeniônico
PNCD	Plano Nacional de Controle da Dengue
prM	Proteína precursora de membrana do vírus da dengue
qsp	Quantidade suficiente para
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	Rotação por minuto
SE	Semana Epidemiológica
SFB	Soro Fetal Bonivo
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapato, do inglês <i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>
v/v	Volume por volume
VACV	Vaccinia Virus
VARV	Varíola Virus
WNV	Vírus do Oeste do Nilo, do Inglês <i>Western Nilo Virus</i>
YFV	Vírus da Febre Amarela, do inglês <i>Yellow Fever Virus</i>
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	20
2.1	DENGUE	20
2.2	DENGUE VIRUS	23
2.2.1	<b>Classificação e estrutura viral</b>	23
2.2.2	<b>Proteína E</b>	25
2.2.3	<b>Multiplicação viral</b>	27
2.2.4	<b>Diversidade antigênica e genômica</b>	30
2.2.5	<b>Epidemiologia</b>	31
2.2.6	<b>Transmissão</b>	37
2.2.7	<b>Manifestações clínicas</b>	39
2.2.8	<b>Imunopatogênese viral</b>	41
2.2.9	<b>Controle, tratamento e profilaxia</b>	45
2.3	VACINAS CONTRA DENGUE	47
2.4	POXVIRUS COMO VETORES VACINAIS	50
2.5	MODELO MURINO	54
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	56
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	58
4.1	OBJETIVO GERAL	58
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b>	59
5.1	OBTENÇÃO DOS GENES DA PROTEÍNA E DE DENV1, 2 E 4	59
5.1.1	<b>Desenho dos genes sintéticos</b>	59
5.1.2	<b>Síntese dos genes</b>	60
5.2	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA	60

5.2.1	Plasmídeo pLW44 .....	61
5.2.2	Células <i>E. coli</i> XL-10 quimiocompetentes .....	62
5.2.3	Transformação de bactérias competentes .....	63
5.2.4	Produção dos plasmídeos de trabalho em pequena escala ...	63
5.2.5	Obtenção dos genes DENV1E, DENV2E, DENV4E.....	64
5.2.6	Desfosforilação plasmidial .....	64
5.2.7	Ligação do inserto no vetor .....	64
5.2.8	Obtenção e verificação dos plasmídeos de transferência .....	65
5.2.9	Restrição enzimática .....	65
5.2.10	Sequenciamento .....	66
5.2.11	Produção do estoque dos plasmídeos de transferência .....	66
5.3	CULTURA DE CÉLULAS .....	67
5.3.1	Células BHK-21 .....	67
5.3.2	Células de fibroblasto de embrião de galinha.....	67
5.3.3	Células C6/36 .....	68
5.4	AMOSTRAS DE VÍRUS .....	68
5.4.1	Vírus MVA selvagem .....	68
5.4.1.1	Origem .....	68
5.4.1.2	Multiplicação .....	69
5.4.1.3	Purificação .....	69
5.4.1.4	Titulação.....	70
5.4.2	Vírus MVA-GFP .....	70
5.4.3	Vírus recombinantes .....	71
5.4.3.1	Transfecção de células .....	71
5.4.3.2	Seleção dos vírus recombinantes .....	72
5.4.3.3	Multiplicação e Purificação.....	72
5.4.3.4	Titulação Viral .....	74

5.4.3.5	Estoque Viral.....	74
<b>5.4.4</b>	<b>Confirmação da construção dos vírus recombinantes .....</b>	<b>75</b>
5.4.4.1	Extração de DNA .....	75
5.4.4.2	Sequenciamento nucleotídico dos vírus recombinantes .....	75
5.4.4.3	Reação em cadeia da polimerase – PCR .....	76
5.4.4.4	Avaliação da expressão da proteína E pelos vírus recombinantes por citometria de fluxo.....	76
<b>5.4.5</b>	<b>Obtenção das amostras de DENV .....</b>	<b>77</b>
5.4.5.1	Origem .....	77
5.4.5.2	Estoque.....	77
5.4.5.3	Titulação.....	78
5.5	CAMUNDONGOS .....	78
5.6	DETERMINAÇÃO DAS DOSES LETAIS .....	79
5.7	ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO .....	79
5.8	DESAFIO .....	80
5.9	SHIRPA.....	81
5.10	COLETA E PROCESSAMENTO DE ÓRGÃOS .....	82
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
6.1	GENES DA PROTEÍNA E .....	83
6.2	PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA.....	85
6.2.1	pLW44-DENV1 .....	86
6.2.2	pLW44-DENV2.....	87
6.2.3	pLW44-DENV4.....	89
6.3	VÍRUS RECOMBINANTES .....	90
6.3.1	rMVA-DV1 .....	90
6.3.2	rMVA-DV2 .....	92
6.3.3	rMVA-DV4 .....	94

6.4	AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DA VACINA rMVA-DENV1.....	95
6.4.1	Dose Letal 1.....	95
6.4.2	Desafio 1.....	96
6.4.3	Dose Letal 2.....	99
6.4.4	Desafio 2.....	100
7	DISCUSSÃO .....	106
8	CONCLUSÕES .....	111
9	PERSPECTIVAS .....	112
10	REFERÊNCIAS .....	113
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>127</b>
	ANEXO 1 – Gene E de DENV1 clonado em plasmídeo comercial .....	127
	ANEXO 2 - Gene E de DENV2 clonado em plasmídeo comercial .....	128
	ANEXO 3 - Gene E de DENV4 clonado em plasmídeo comercial .....	129
	ANEXO 4 – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	130
	ANEXO 5 – Protocolo de análise de comportamento SHIRPA.....	131
	<b>APÊNDICE – Artigo (de acordo com exigido pelo regulamento do PPGM- ICB/UFMG) .....</b>	<b>136</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma arbovirose transmitida por vetores do gênero *Aedes*, cujo agente etiológico é um vírus pertencente à família *Flaviviridae*. O *Dengue virus* (ou vírus da dengue) possui quatro sorotipos distintos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) que podem causar desde infecções assintomáticas até formas mais graves, levando eventualmente ao óbito. Estima-se que 100 milhões de casos confirmados de dengue ocorram anualmente em todo o mundo e que mais de 3,9 bilhões de pessoas vivem em 128 países endêmicos para a doença, colocando em risco quase metade da população mundial.

As atividades de prevenção e controle da dengue têm sido baseadas nas estratégias focadas no combate aos vetores. Atualmente, o controle desses mosquitos tem sido mais intenso devido à recente introdução, no Brasil, dos arbovírus Zika e Chikungunya. A hiperendemicidade da dengue parece estar relacionada à circulação dos múltiplos sorotipos, fazendo com que a doença tenha impacto negativo na saúde pública e na economia mundial. Relatos da Organização Mundial de Saúde (OMS) afirmam que o DENV1 foi o sorotipo mais circulante no mundo até o ano de 2015. A susceptibilidade ao vírus da dengue é universal. No entanto, fatores de risco individuais como idade, etnia, presença de comorbidades e infecção secundária podem aumentar a gravidade da doença (OMS, 2019).

Neste contexto, o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra os quatro sorotipos do vírus da dengue configura-se cada vez mais como avanço necessário para ampliar as medidas efetivas relacionadas ao controle da doença. Atualmente a vacina disponível contra o vírus da dengue apresenta lacunas imunológicas em indivíduos pertencentes aos extremos das faixas etárias, grávidas e imunocomprometidos, além de apresentar baixa eficácia na proteção contra um dos quatro sorotipos virais (DENV2). A fim de construir uma vacina mais eficaz, diversos laboratórios continuam testes com possíveis candidatos vacinais produzidos por diferentes metodologias.

O vírus *Vaccinia Ankara Modificado* (MVA) está entre os vetores virais mais promissores e estudados mundialmente e é considerado uma excelente ferramenta para a geração de vacinas recombinantes contra doenças infecciosas e/ou uma alternativa para melhorar estratégias de vacinas

existentes. Pesquisas anteriores realizadas no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais apresentaram resultados promissores de uma vacina recombinante contra DENV3 utilizando o MVA como vetor recombinante.

A proposta desse trabalho foi construir vírus MVA recombinantes produzindo a proteína E de DENV1, 2 e 4 e avaliar o potencial protetor dessas construções em modelo murino. Esses resultados serão somados aos obtidos anteriormente como proposta de produção de uma vacina tetravalente contra dengue.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 DENGUE

A Dengue é a principal arbovirose (*arthropod borne virus*) que afeta a população humana. É uma doença viral aguda sistêmica transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, em áreas tropicais e subtropicais. O *Dengue virus* (DENV) apresenta 4 sorotipos: DENV 1, 2, 3 e 4 (BHATT et al., 2013; MESSINA et al., 2014). Um quinto sorotipo foi isolado a partir de amostras de sangue de pacientes provenientes de Sarawak, estado da Malásia localizado na ilha de Bornéu, durante uma epidemia ocorrida em 2007. A amostra foi classificada inicialmente como DENV4, no entanto, análises filogenéticas apontaram ser um novo sorotipo, DENV5, distinto de DENV 4, mas que apresenta semelhanças com DENV 2 e 3. DENV 5 foi associado a surto de dengue em humanos apenas uma vez e atualmente não há relatos de sua circulação. Acredita-se que o vírus esteja circulando entre macacos das florestas de Bornéu (MUSTAFA et al., 2015).

Os relatos sobre infecções semelhantes à dengue estão presentes há séculos. O primeiro registro de sintomas compatíveis com dengue foi relatado em uma enciclopédia médica chinesa em 992 a.C., onde a doença foi referida como "veneno da água" e associada a insetos voadores. A partir de 1600 surgiram epidemias semelhantes à dengue em diferentes locais do globo: Índia Ocidental (1635), América Central (1699) e América do Norte (1780 na Filadélfia e 1945 em *New Orleans*). A etiologia viral e a transmissão por mosquitos só foram finalmente determinadas no século XX (MURRAY et al., 2013).

Há controvérsias sobre a origem do vetor e evolução do vírus. Alguns estudos apontam a África como o berço provável do DENV. Essa teoria é suportada pela manutenção dos quatro sorotipos do DENV, em ciclos zoonóticos, na África (GUBLER & CLARK, 1995). Contudo, estudos filogenéticos mais recentes apontam que a topologia de linhagens asiáticas antigas e recentes apresenta relação consistente entre si, definindo que uma evolução viral tenha irradiado em torno de um ancestral comum. A hipótese também é embasada no fato de que todos os quatro sorotipos de DENV estão presentes na Ásia e causam surtos regulares. Independentemente se na África ou Sudeste da Ásia,

os quatro vírus da dengue se originaram em macacos afetando posteriormente seres humanos (CARON et al., 2013).

Segundo a OMS (2019), o caminho da dengue pelo mundo, desde os primeiros relatos até hoje, acompanha o crescimento, hábitos e mudanças da população mundial. Os primeiros surtos de DENV foram relatados no século XVIII na Ásia (Java, Indonésia), na África (Cairo e Alexandria, Egito) e América do Norte (Filadélfia, Estados Unidos). No século XIX houveram quatro epidemias marcantes entre o Caribe e o sul dos Estados Unidos.

A dengue permaneceu geograficamente restrita até meados do século XX, provavelmente em decorrência da lenta expansão mundial provocada pelo transporte marítimo – fator dificultador da introdução de novos sorotipos. Entretanto, após a segunda guerra mundial, o transporte de cargas ao redor do mundo e a rápida urbanização levaram ao aumento da transmissão da dengue e à hiperendemicidade (múltiplos sorotipos presentes) na maior parte do sudeste asiático, com surgimento de formas graves da doença (WHO, 2019).

A febre hemorrágica da dengue (FHD) foi documentada pela primeira vez na década de 1950 durante as epidemias nas Filipinas e na Tailândia; já a síndrome do choque da dengue (SCD) teve seu primeiro registro epidêmico na Tailândia em 1958. Entre esses dois eventos, o DENV2 foi isolado pela primeira vez na América, na ilha de Trinidad, em 1953; já em 1977 o DENV1 foi descrito causando surtos na Jamaica. Esse último evento impactou no cenário da dengue nas Américas, uma vez que países da América do Sul, como Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador e Peru, que estavam livres da dengue, foram acometidos por epidemias causadas por DENV1 (WHO, 2019).

Em 1980 ocorreu uma segunda expansão do vírus na Ásia, com o aparecimento dos primeiros casos de FHD no Sri Lanka, Índia e Ilhas Maldivas. A partir dessa década os quatro sorotipos de DENV foram encontrados também na África. Um ano depois aconteceu o primeiro surto de FHD fora da Ásia, em Cuba, e 8 anos após na Venezuela. Os anos 90 marcaram a introdução do DENV4 na América e o reaparecimento do DENV3 que não era encontrado desde 1978. Em 1995, a dengue tornou-se a doença viral transmitida por mosquito mais importante do mundo (MURRAY et al., 2013).

Até 1960 o programa de combate ao *Ae. aegypti* nas Américas, com foco na febre amarela, contribuiu significativamente para diminuir, ou mesmo impedir,

a circulação dos DENV no Brasil. A primeira epidemia da doença após a descontinuidade desse programa tem descrição em 1982 em Boa Vista, Roraima, sendo associada ao DENV 1 e DENV4. Depois disso, em 1986 foi observado novo surto pelo sorotipo DENV1 em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro. A epidemia de 1990 no Rio de Janeiro marcou a introdução de DENV2 no país, afetando rapidamente estados vizinhos e sendo associada aos primeiros diagnósticos de FHD no Brasil. Em 2001 foi confirmada a introdução de DENV3, isolado de um indivíduo residente no Rio de Janeiro, sendo esse sorotipo o responsável pela epidemia de 2002. Em 2005, após três anos de trégua, os casos de dengue voltaram a crescer e a partir de 2008 novas epidemias foram registradas por todo o território nacional anualmente (RAUPP et al., 2014; WHO 2019). A figura 1 mostra a linha do tempo da introdução do DENV em relação às campanhas de erradicação do vetor.

Devido às falhas nos programas de controle ao longo do tempo, a dispersão geográfica tanto do vetor quanto do vírus levou a um ressurgimento global de epidemias acompanhadas de formas graves da doença nos últimos 40 anos (FERREIRA, 2012). Atualmente, a dengue é um problema de saúde pública em mais de 100 países de regiões tropicais e subtropicais onde os quatro sorotipos do DENV são encontrados (WHO, 2019).

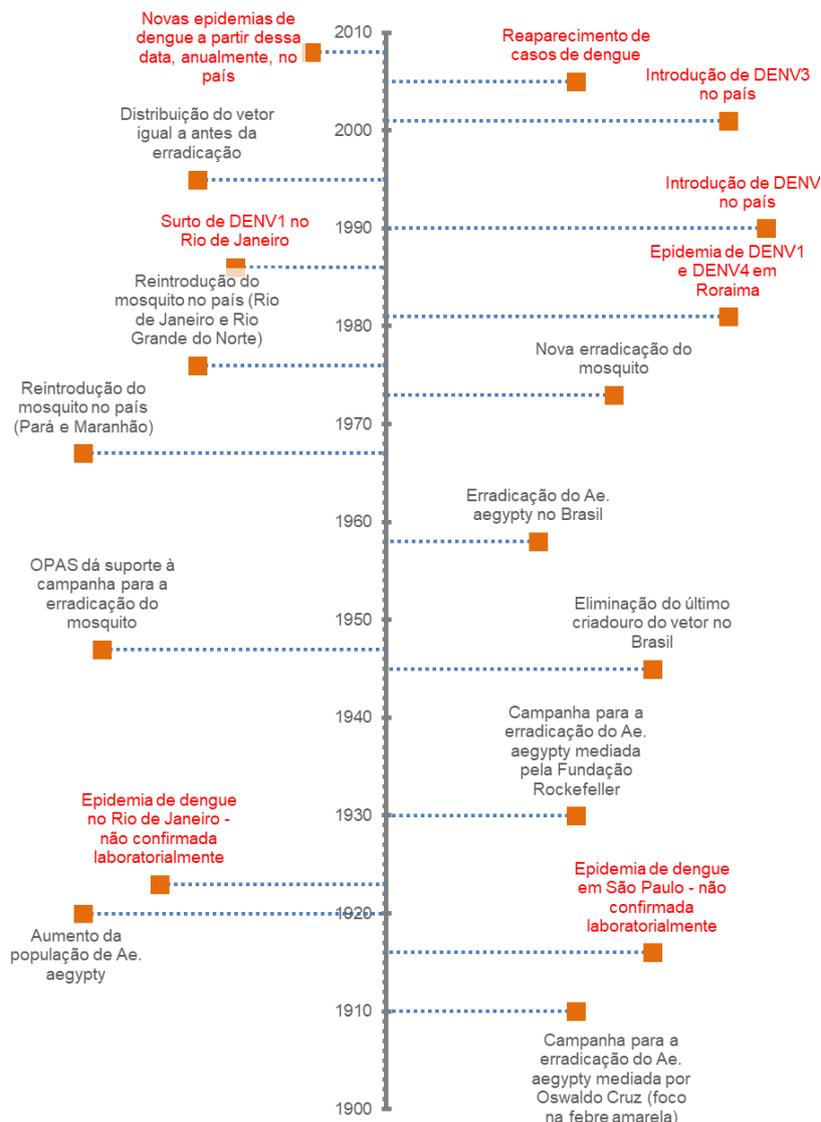


Figura 1. Introdução do DENV no Brasil no século XX. Linha do tempo correlacionando as campanhas de erradicação às epidemias e sorotipos de DENV. Fonte: o autor.

## 2.2 DENGUE VIRUS

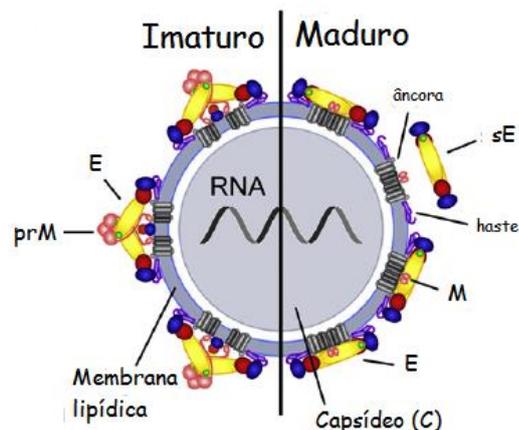
### 2.2.1 Classificação e estrutura viral

A família *Flaviviridae* abrange os gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* compreende mais de 70 vírus, distribuídos em 53 espécies, muitos dos quais são patógenos humanos transmitidos por artrópodes e causam uma variedade de doenças incluindo febres, encefalites e febres hemorrágicas. A inclusão de DENV neste gênero é baseada em uma reatividade antigênica cruzada com outros flavivírus, bem como, organização

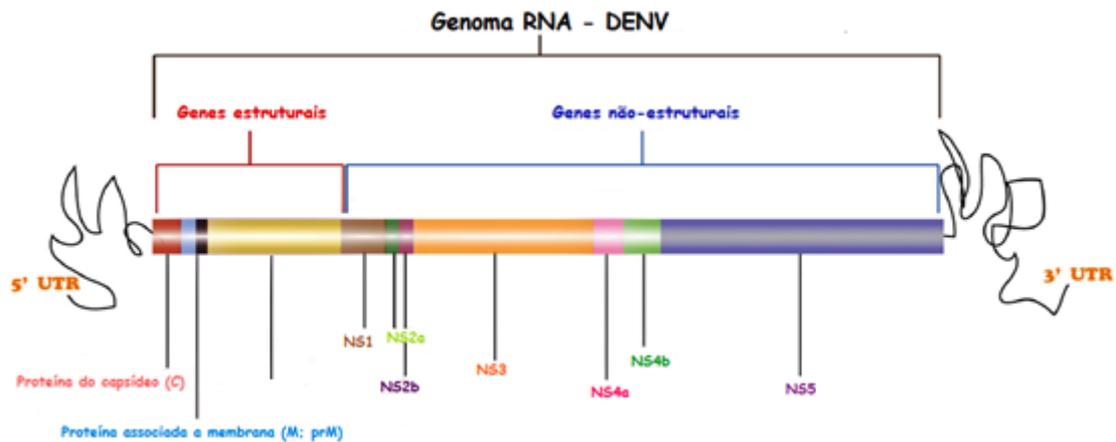
genômica e homologia de sequências nucleotídicas. Os principais vírus são DENV, *Yellow Fever virus* (vírus da febre amarela) – YFV; *Japanese Encephalitis virus* (vírus da encefalite japonesa) – JEV; *West Nilo virus* (vírus o Oeste do Nilo) – WNV; *Tick-born Encephalitis virus* (vírus da encefalite transmitida por carrapato) -TBEV e *Zika virus* – ZIKV (ICTV, 2019).

Assim como os outros vírus integrantes da família, DENV possui capsídeo icosaédrico, envelopado e apresenta material genético constituído por RNA fita simples senso positivo de aproximadamente 11 kb (Figura 2). O vírus codifica uma única poliproteína que é proteoliticamente processada para produzir três proteínas estruturais (envelope, E; precursora de membrana, prM; e capsídeo, C) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (MAMMEM et al., 2014; MESSINA et al., 2014). O genoma de DENV está representado na Figura 3.

O DENV pode ser encontrado na forma madura (50nm) ou imatura (60 nm). Ambas as partículas apresentam uma porção externa glicoproteica e uma porção interna lipídica dando origem a uma bicamada que envolve o nucleocapsídeo que é constituído pela proteína C e envolve o genoma de RNA (PERERA & KUNH, 2008).



**Figura 2. Representação esquemática da partícula do DENV. Esquerda:** Vírus imaturo recoberto por trímeros compostos pelas proteínas prM e E. **Direita:** Vírus maduro de superfície lisa composto pelas proteínas M e sE (forma solúvel da proteína E), que necessita de uma estrutura de fixação (associação entre âncora e haste). O capsídeo, composto pela proteína C, abriga o RNA viral de cadeia simples senso positivo. **Fonte:** Adaptado de HEINZ & STRIASNY, 2012.



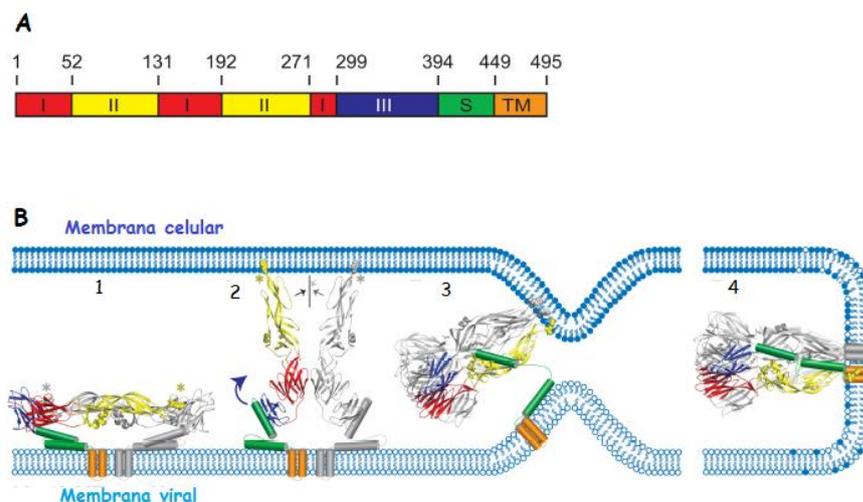
**Figura 3: Organização do genoma do DENV.** O genoma de DENV codifica 10 proteínas, sendo três estruturais (C, M e E), responsáveis pela estrutura viral, e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), envolvidas na replicação viral e outras funções celulares. **Fonte:** Adaptado de IDREES & ASHFAQ, 2012.

Os genes estruturais de DENV estão na terminação 5' do genoma, como resultado, as porções da poliproteína contendo as proteínas estruturais são sintetizadas primeiro e com maior eficiência, o que pode diminuir a eficiência da síntese de proteínas não estruturais e da replicação viral. (FILOMATORI et al., 2010).

### 2.2.2 Proteína E

As glicoproteínas presentes no envelope viral são bem definidas e consistem de 180 cópias de cada uma das proteínas individuais, de envelope (E) e de membrana (prM / M). Estas duas proteínas têm diferentes conformações nas partículas de DENV imaturas e maduras e, portanto, conferem características estruturais únicas para ambas as formas. No vírion imaturo, prM e E são encontrados como 90 heterodímeros que se estendem como 60 pontos triméricos a partir da superfície da partícula. No vírion maduro, a clivagem de prM dá origem à proteína M e E é encontrada como 90 homodímeros que ficam retos contra a superfície viral formando uma proteína em formato de partícula lisa (HEINZ & STRIASNY, 2012; PERERA & KUNH, 2008). A proteína prM atua impedindo a fusão prematura do vírus durante o seu transporte para fora da célula. Nas partículas maduras, M promove a liberação viral por exocitose ao meio extracelular (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009).

A glicoproteína de envelope (E) (Figura 4A) é o principal antígeno de superfície de DENV e o principal alvo de anticorpos neutralizantes. Além disso, é o determinante fundamental da montagem icosaédrica do vírus e o catalisador de fusão entre o vírus e a membrana da célula alvo, sendo o primeiro ponto de contato entre o vírus e a célula hospedeira (Figura 4B). Várias proteínas celulares e moléculas de hidrato de carbono foram identificadas como fatores de ligação que medeiam a entrada do vírus na célula hospedeira através da interação com a proteína E (KLEIN et al., 2013; PERERA & KUNH, 2008). Algumas proteínas do hospedeiro foram implicadas no ciclo replicativo dos flavivírus, onde as principais são: DC-SIGN (CD209), L-SIGN (CD209L), receptor de manose e CBL1 para entrada e sinalização do vírus; MCT4 na replicação viral; TSG101 na montagem e liberação do vírus e o fator H na evasão do sistema imune e patogênese (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009).



**Figura 4: Estrutura da proteína E de DENV e representação esquemática do processo de fusão.** **A.** Representação linear da proteína E. Distribuição da cadeia polipeptídica entre os três domínios I (vermelho), II (amarelo) e III (azul). O domínio III está ancorado à membrana viral por uma haste (S, em verde) e uma âncora transmembranar (TM, em laranja). **B.** Esquema do processo de fusão mediado pela proteína E. (1) O dímero encontra-se horizontalmente sobre a membrana viral com o peptídeo de fusão ancorado sobre ele. As duas hélices anfipáticas (verde) da haste encontram-se associadas à membrana. (2) O dímero se dissocia estimulado por uma alteração de pH e os monômeros são projetados para fora; os peptídeos de fusão ancoram-se na membrana da célula alvo. DIII se dobra para trás de DI e estabiliza o trímero. (3) A haste estende-se ao longo da linha de junção entre os dois DII. (4) As hastes atravessam todo o comprimento do DII, unindo o ciclo de fusão à âncora TM completando a fusão entre as membranas. **Fonte:** Adaptado de KLEIN et al., 2013.

A proteína E é composta de duas subunidades e cada subunidade monomérica é composta por três domínios distintos: DI, DII e DIII. O domínio DIII

é um peptídeo contínuo localizado na superfície lateral externa; o domínio DI tem a estrutura de um barril e encontra-se paralelo à membrana viral; o DII é composto por um par de ciclos descontínuos, um dos quais é altamente conservado entre todos os flavivírus e funcionam como um peptídeo interno de fusão e é estabilizado por três pontes dissulfeto. O dímero E dissocia-se, expondo o peptídeo de fusão altamente conservado na ponta da DII que se conecta ao DI por quatro peptídeos ligantes formando uma dobra (DI / DII), que logo é convertida em um trímero. A dobra tem desempenhado um papel crítico na mudança conformacional sofrida pela proteína E em meio com baixo pH (~5.8 – 6.0) ao se fundir com endossomos celulares, permitindo a liberação de RNA viral no citoplasma celular (HEINZ & STIASNY, 2012; MESSER et al., 2014).

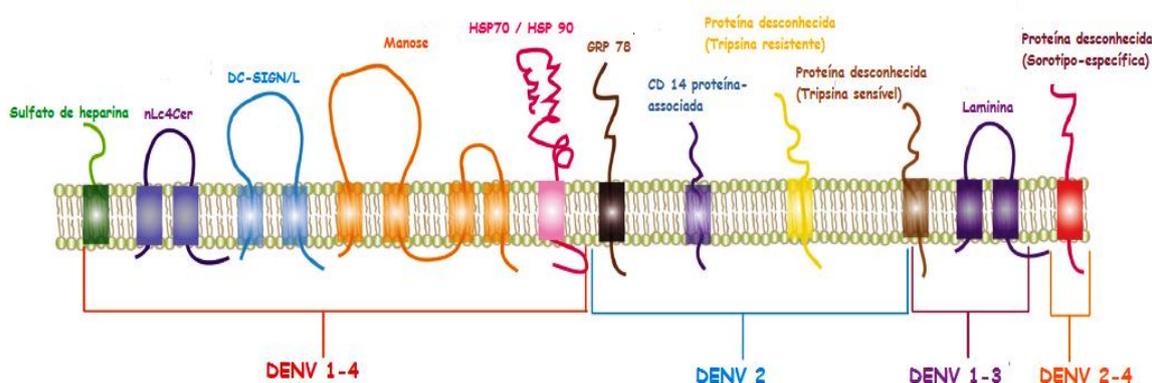
A proteína E exerce um papel muito importante na infectividade de DENV, uma vez que ela se liga ao receptor específico da célula e promove a penetração viral (HARRISON, 2015). Além disso, é um imunógeno que induz anticorpos neutralizantes que bloqueiam a ligação da partícula viral às células alvo e a fusão das membranas viral e endossômica (MODIS, 2004; COLMAN, 2003). A proteína E apresenta a maioria dos epítomos contra os quais são dirigidos os anticorpos neutralizantes. Acredita-se que a resposta imune contra a proteína E seja responsável pelo desenvolvimento de uma proteção duradoura e eficaz contra uma infecção homóloga e de curta duração e cruzada em infecções heterólogas (MONDOTTE et al., 2007).

A região EDI/II pode ser o alvo de anticorpos neutralizantes de longa duração sorotipo específico (MESSER et al., 2014; SMITH et al., 2013). EDIII tem importância na interação vírus-célula e pode induzir resposta de anticorpos neutralizantes subtipo específicos; esse domínio da proteína E é considerado alvo de pesquisas vacinais e para a avaliação das respostas imunes humoral e celular (CHEN et al., 2016)

### **2.2.3 Multiplicação viral**

A infecção por DENV inicia quando um mosquito infectado pica um ser humano suscetível, onde o vírus é introduzido através do repasto sanguíneo. A entrada do vírus na célula hospedeira permissiva ocorre por meio de endocitose

mediada por receptores (Figura 5). Métodos alternativos de penetração que envolvem macropinocitose e fagocitose dependente de anticorpos também têm sido propostos (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015). Esses receptores podem ser encontrados em diversas células, como células dendríticas (DC), macrófagos, monócitos, células B, células T, células endoteliais, hepatócitos e células neuronais (CLYDE et al., 2006; JAIN et al., 2014).

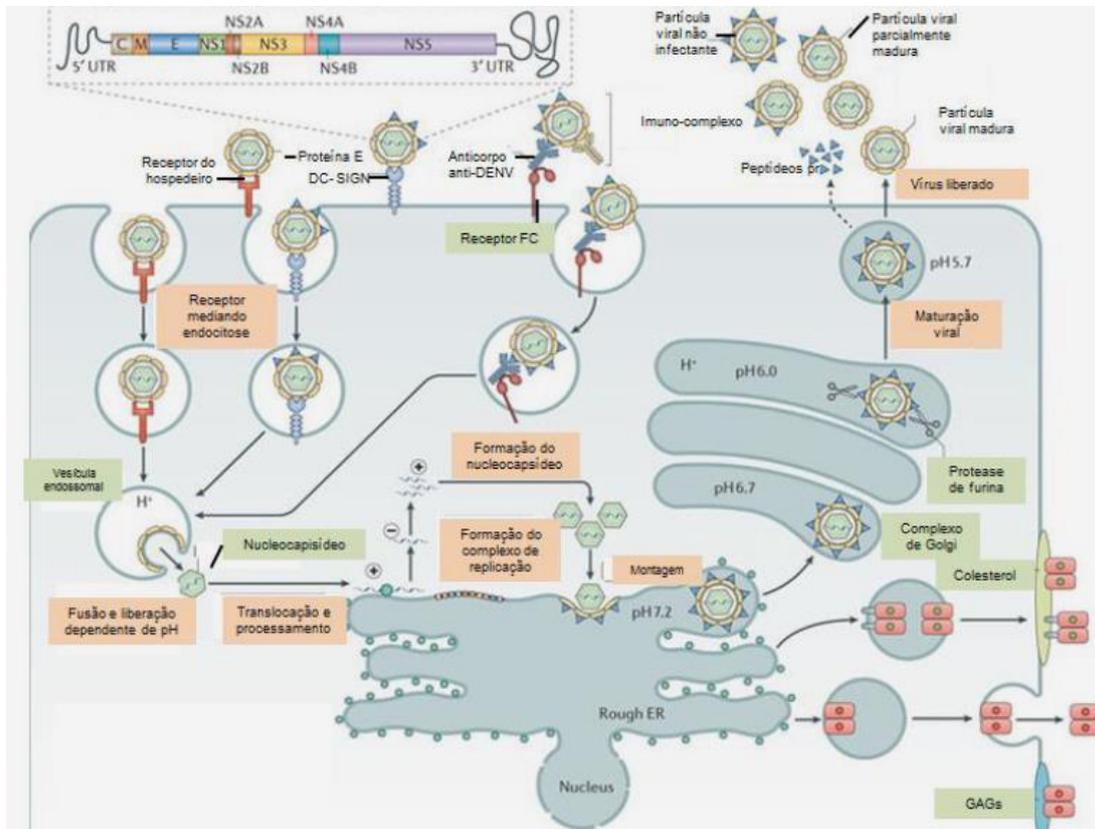


**Figura 5: Receptores celulares que medeiam a entrada de DENV na célula hospedeira.**  
**Fonte:** Adaptado de IDREES & ASHFAQ, 2012.

Os receptores atuam capturando e concentrando os vírus infecciosos e levando-os à uma cascata de eventos que provocam a fusão entre as membranas do vírus e das células hospedeiras. O envelope viral, então, se funde com a membrana do endossoma por acidificação da vesícula, direcionando o capsídeo e o genoma viral para dentro do citoplasma, ocorrendo o desnudamento do genoma. Inicialmente, o RNA viral é traduzido para uma única poliproteína, que é então dirigida para o retículo endoplasmático (RE), onde é processada e codificada em três proteínas estruturais – C, prM e E (JAIN et al., 2014).

Os genes estruturais estão na terminação 5' do genoma, sendo transcritos primeiro e com maior eficiência. Sequências-sinal dentro da poliproteína translocam NS1 e ectodomínios de prM e E para o lúmen do RE enquanto C, NS3 e NS5 estão localizados ao citoplasma. NS2A/B e NS4A/B permanecem predominantemente como proteínas transmembranares. O processamento da poliproteína é um processo fundamental que deve ocorrer antes da replicação viral prosseguir. Esta tarefa é realizada por signalases do hospedeiro que residem no lúmen do RE e pela proteína viral NS3 e seu co-factor, NS2/B, que está no citoplasma (FILOMATORI et al., 2010; PERERA & KUNH, 2008).

Os genomas de RNA recém-sintetizados são levados para fora das vesículas através de poros que ligam as mesmas ao citosol. As proteínas do capsídeo (C) em associação com o RNA genômico formam o nucleocapsídeo, que brotam para o interior do RE a fim de produzir partículas de vírus imaturo contendo as glicoproteínas virais prM e E. As partículas virais imaturas trafegam através da via secretora e são processadas no compartimento de Golgi por uma protease celular denominada furina, que cliva a proteína prM em M para produzir partículas virais infecciosas. O envelope viral é adquirido por brotamento nas vesículas intracelulares. O vírus é liberado por exocitose ou lise celular (BYRD et al., 2013). O ciclo de multiplicação do DENV encontra-se esquematizado na Figura 6.



**Figura 6: Representação esquemática do ciclo de replicação do DENV.** O DENV é reconhecido por células do hospedeiro, ocorrendo a ligação entre as proteínas do envelope viral e receptores desconhecidos que medeiam a entrada do vírus na célula por endocitose. Após a penetração, o vírus passa por alterações estruturais dependentes de pH, que facilitam a fusão das membranas endossomal e viral, liberando o material genético. O RNA é traduzido para uma poliproteína longa, a qual é clivada por proteases virais ou do hospedeiro, dando origem às proteínas estruturais e não-estruturais de DENV. As proteínas prM e E são incorporadas ao retículo endoplasmático rugoso, formando o nucleocapsídeo e construindo a partícula viral imatura. Essa partícula é transportada para o complexo de Golgi, onde o pH baixo provoca um rearranjo das proteínas prM e E, permitindo a constituição da partícula viral madura. A partícula madura é liberada juntamente com os peptídeos pr, provenientes da proteína prM. Além disso, pode ocorrer a liberação de partículas imaturas, com a prM intacta; essas partículas não são capazes de infectar novas células. **Fonte:** adaptado de Guzman, 2016.

#### 2.2.4 Diversidade antigênica e genômica

A diversidade genética de DENV dentro dos diferentes sorotipos tem sido destaque para as investigações filogenéticas com foco na proteína de envelope (E). Isso tem permitido aos pesquisadores traçar as origens geográficas e a expansão do DENV em todo o mundo. Além disso, a análise comparativa dos sorotipos de DENV é importante, uma vez que há cada vez mais evidências de que os seus potenciais de epidemia são diferentes e que os episódios de infecção secundária com diferentes sorotipos frequentemente resultam em maior morbidade causada pelas formas graves da infecção (COSTA et al., 2012; HEINZ & STIASNY, 2012).

Acredita-se que a evolução molecular do DENV pode ser influenciada pela pressão seletiva, taxas de mutação viral, tamanho da população de DENV e ciclo de transmissão. Esses fatores também podem levar à rápida heterogeneidade da população viral, assim como tensões para o desaparecimento do vírus circulante (CHRISTENBURY et al., 2010).

Os primeiros estudos evolutivos de DENV1 utilizaram sequenciamento de RNA de 240 nucleotídeos situados na junção entre os genes que codificam E / NS1. Cinco genótipos distintos foram reconhecidos e estes foram mais tarde confirmados por sequenciamento completo do gene E mostrando uma divergência máxima de 6-8% de nucleotídeos entre eles. Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento completo do gene E de DENV1 agrupam as linhagens previamente identificadas como: (i) o genótipo I, representando a linhagem do Sudeste Asiático, China e África Oriental; (ii) o genótipo II, representando linhagens da Tailândia coletadas em 1950 e 1960; (iii) o genótipo III, representando a linhagem silvestre obtida na Malásia; (iv) genótipo IV, que representa linhagens das ilhas do Pacífico Ocidental e da Austrália; e (v) o genótipo V, representando todas as linhagens recolhidas nas Américas, África Ocidental e um número limitado de linhagens da Ásia (GONÇALVEZ et al., 2002).

A classificação dos genótipos de DENV2 também foi baseada no sequenciamento completo do gene E. Foram confirmados cinco genótipos

principais: (i) o genótipo asiático 1, representando linhagens oriundas da Malásia e da Tailândia, e genótipo asiático 2, que representa linhagens do Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas; (ii) o genótipo cosmopolita, que representa linhagens de ampla distribuição geográfica, incluindo Austrália, África Oriental e Ocidental, ilhas do Oceano Índico e Pacífico, o subcontinente indiano e no Oriente Médio; (iii) o genótipo americano, que representa as linhagens da América Latina e linhagens mais antigas coletadas no Caribe, subcontinente indiano e Ilhas do Pacífico em 1950 e 1960; (iv) o genótipo sudeste asiático / americano, que representa linhagens da Tailândia e Vietnã e linhagens coletadas nas Américas nos últimos 20 anos; e (v) o genótipo silvestre, linhagens representativas coletadas dos seres humanos, mosquitos florestais ou animais sentinelas no oeste da África e Sudeste Asiático (TWIDDY et al., 2002).

São descritos quatro genótipos para DENV3: (i) o genótipo I, representado por linhagens provenientes da Indonésia, Malásia, Filipinas e isolados recentes das Ilhas do Pacífico Sul; (ii) o genótipo II, representado por linhagens oriundas da Tailândia, Vietnã e Bangladesh; (iii) o genótipo III, composto por linhagens originais do Sri Lanka, Índia, África, Samoa e, recentemente adicionada, a linhagem tailandesa; e (iv) o genótipo IV, com linhagens de Porto Rico, América Central e Latina e do Tahiti (ARAÚJO et al., 2009; KOCHER et al., 2008).

As análises iniciais de DENV4 revelaram que as linhagens exibem maior conservação de sequência do que as de outros sorotipos de DENV (92%) e de 96-100% de conservação de aminoácidos na proteína E. Atualmente DENV4 apresenta quatro genótipos principais: (i) genótipo I, representando linhagens da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e no Japão; (ii) o genótipo II, representando linhagens da Indonésia, Malásia, Tahiti, Caribe e Américas; (iii) o genótipo III, com linhagens tailandesas recentes (diferentes das isoladas anteriormente na região); e (iv) genótipo IV, representando as linhagens silvestres provenientes da Malásia (ABUBAKAR et al., 2002; KLUNGTHONG et al., 2004).

### **2.2.5 Epidemiologia**

A dengue é difundida em todos os trópicos, com fatores de risco influenciados por variações espaciais, índice de precipitação, temperatura,

umidade relativa, grau de urbanização e qualidade dos serviços de controle de vetores em áreas urbanas. Até a década de 1970, apenas nove países haviam sofrido epidemias graves de dengue. Hoje, a doença é endêmica em mais de 128 países nas regiões da África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental, sendo que as regiões das Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental são as mais seriamente afetadas (WHO, 2019).

A incidência global de dengue tem crescido de forma alarmante nas últimas décadas. Calcula-se que mais de 390 milhões de novos casos de dengue são notificados a cada ano, dos quais 96 milhões se manifestam clinicamente, com qualquer gravidade da doença. Aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas da doença onde 824 milhões vivem em áreas urbanas e o restante em áreas periurbanas (Figura 7). Estima-se que cerca de 500 mil pessoas com dengue grave necessitem de hospitalização a cada ano, com uma taxa de 2,5% de mortalidade. Em todo o mundo, foi registrado um declínio de 28% nos casos de fatalidade entre 2010 e 2016, com uma melhoria significativa no manejo de casos por meio de capacitações em todo o território nacional (PAHO/WHO, 2019).



**Figura 7. Distribuição global da dengue. Fonte:** World Health Organization, 2017.

As infecções na Ásia chegam a representar quase 70% da carga global das infecções por DENV, estando relacionadas com regiões densamente povoadas coincidindo com alta aptidão de transmissão da doença. A Índia representa 34% do total de infecções mundial. As Américas contribuem com 14% de infecções aparentes em todo o mundo, dos quais mais da metade ocorreram no Brasil e no México. Estudos apontam que a carga das infecções por DENV

na África é quase equivalente à das Américas, representando 16% do total mundial. Esse fato pode ser explicado por uma provável subnotificação da dengue no continente africano. Os países da Oceania contribuem com menos de 1% das infecções globais aparentes. Embora surtos de dengue sejam reportados, dados sobre incidência e prevalência ainda são escassos devido ao pequeno tamanho amostral e idade não comparativos dos grupos de estudo, ou ainda à subnotificação de casos em regiões endêmicas para malária (AMARASINGHE et al., 2011; BHATT et al., 2013).

Os casos principais da região do Pacífico Ocidental se concentram na China, Malásia, Filipinas, Singapura e Vietnã (WPRO, 2015). A maioria dos países da Ásia apresentam dados de distribuição de DENV, excetuando os países que carecem de diagnóstico confirmatório como países ao Sul da China e Nordeste da Índia. Entretanto, a falha do sistema de notificação de casos nos últimos anos combinada com a chegada de outros vírus como ZIKV e Chikungunya dificultaram o relato do quadro de dengue na região (BRADY et al., 2012).

Na África a dengue começou a ser reportada entre o final do século XIX e início do século XX. Desde então, 34 países são listados como os mais endêmicos do continente, com destaque para Zanzibar, Burkina Faso, Egito, África do Sul, Senegal, Nigéria e Cabo Verde. Todos os sorotipos de DENV são encontrados infectando a população, entretanto DENV2 parecer ser o mais importante (AMARASINGHE et al., 2011; BRADY et al., 2012).

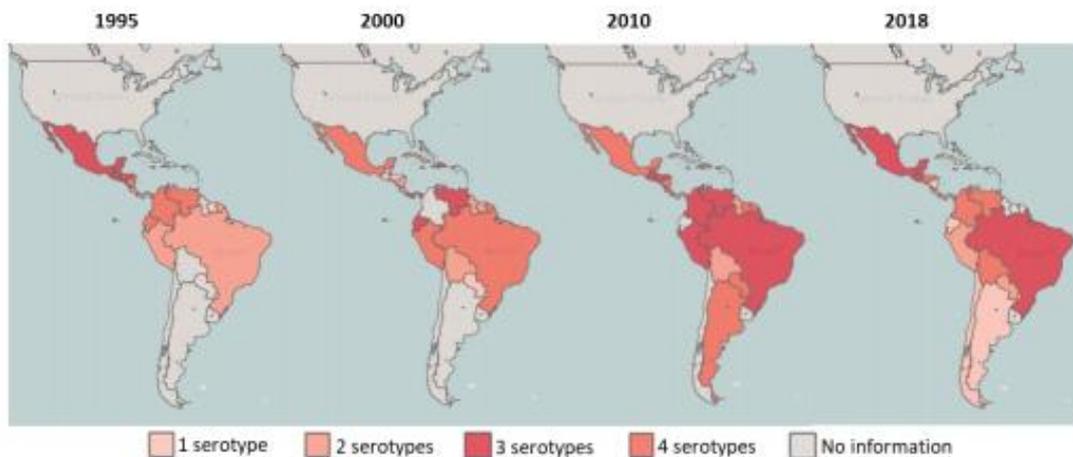
Embora nenhum país da Europa seja definido como endêmico, a transmissão esporádica indígena tem sido relatada como um dos principais meios de disseminação de DENV no continente. Após a invasão e propagação do *Ae. albopictus* ao longo da costa do Mediterrâneo, a transmissão de casos autóctones de dengue tem sido detectada em Marselha, na França, e na ilha de Korcula, na Croácia. Austrália e Ilhas do Pacífico apresentam evidências de DENV em 85% do seu território; as demais localidades não apresentam evidências contemporâneas (BRADY et al., 2012).

A presença do DENV parece ser bem definida na maioria dos países das Américas. No entanto, uma classificação regional geral não pode ser bem elaborada devido alguns países não terem publicados dados sobre a epidemiologia do vírus, assim como a dificuldade de se confirmar casos entre os

indígenas durante as epidemias recentes. A dengue nas Américas apresentou um padrão endêmico-epidêmico com surtos a cada 3 a 5 anos. Com base nesses padrões, o perfil epidemiológico da doença pode ser descrito em quatro períodos importantes: Introdução de dengue nas Américas (1600-1946); plano para a erradicação do *Ae. aegypti* (1947-1970); reinfestação de *Ae. aegypti* (1971-2000); aumento da dispersão de *Ae. aegypti* e circulação do DENV (2001- atual) (DICK et al., 2012).

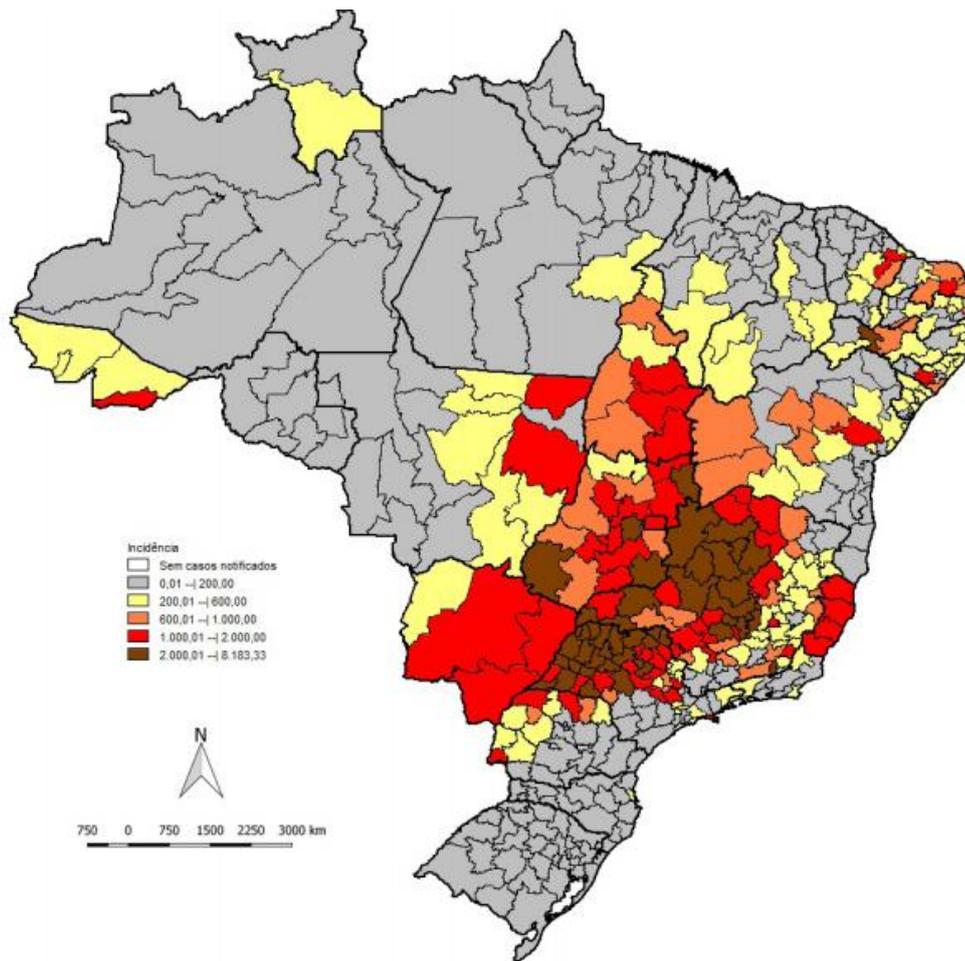
Dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) apontam que durante os primeiros sete meses de 2019, mais de 2 milhões de pessoas contraíram a doença na região das Américas, sendo que 723 delas morreram. A OPAS ainda afirma que a principal característica da atual epidemia é que pessoas menores de 15 anos parecem estar entre as mais afetadas e a causa pode ser vinculada ao fato de que se trata de uma população que, por sua idade, tem estado menos exposta ao vírus e, portanto, carece de imunidade. Os dez países mais atingidos pela dengue, segundo a quantidade de novos casos por cada 100.000 habitantes, são Nicarágua, Brasil, Honduras, Belize, Colômbia, El Salvador, Paraguai, Guatemala, México e Venezuela (PAHO/WHO, 2019).

Os quatro principais sorotipos do vírus da dengue estão circulando nas Américas. O aumento do número de países e / ou territórios apresentando co-circulação simultânea de dois ou mais sorotipos de vírus da dengue nas últimas décadas acarretou no aumento do risco de dengue grave, bem como, surtos em outras regiões. A epidemia atual de dengue nas Américas está relacionada ao sorotipo 2 de DENV, que é um dos mais letais e que mais afeta crianças e adolescentes. A Figura 8 mostra a tendência histórica nas taxas de distribuição dos sorotipos de DENV por sub-região nas Américas.



**Figura 8. Distribuição da circulação dos sorotipos do DENV em países e territórios da Região das Américas, 1995-2018. Fonte: PAHO/WHO, 2019.**

Os dados oficiais do MS (Ministério da Saúde) afirmam que até a 34<sup>a</sup> semana epidemiológica de 2019 foram registrados 1.439.471 casos prováveis de dengue no país, um aumento de 600% em relação ao mesmo período do ano passado. As regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentam as maiores incidências: 1.196,1 casos/100 mil hab. e 1.139,2 casos/100 mil hab., respectivamente. Na análise das Unidades da Federação (UFs), destacam-se Minas Gerais (2.239,3 casos/100 mil hab.), Goiás (1.561,6 casos/100 mil hab.), Espírito Santo (1.493,3 casos/100 mil hab.), Mato Grosso do Sul (1.466,1 casos/100 mil hab.) e Distrito Federal (1.194,4 casos/100 mil hab.). Ainda durante esse período, foram confirmados 1.111 casos de dengue grave (DG) e 15.179 casos de dengue com sinais de alarme (DSA). Ressalta-se que 2.486 casos de DG e DAS permanecem em investigação. Além disso, foram confirmados 591 óbitos e 486 (82,2%) estão em investigação. Os estados com maior número de óbitos em investigação são: Minas Gerais (117), São Paulo (90), Goiás (94), Rio Grande do Norte (53), Pernambuco (37), Bahia (19) e Ceará (12) (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE [SVS]/MINISTÉRIO DA SAÚDE[MS], 2019).



**Figura 9. Distribuição da incidência de casos prováveis de dengue (/100mil habitantes), até a Semana Epidemiológica 34, Brasil, 2019. Fonte: (SVS/MS, 2019).**

Há, ainda, os casos de infecções inaparentes que são reconhecidos como reservatório potencial de DENV e representam graves implicações uma vez que: impedem o cálculo correto do impacto econômico e estimativa de vida de regiões aparentemente não endêmicas para DENV; dificultam a elucidação da dinâmica populacional de DENV; mascaram os possíveis efeitos dos futuros programas de vacinação na população, o qual terá de ser administrado para maximizar a proteção cruzada e minimizar susceptibilidade pós-vacinação (BHATT et al., 2013).

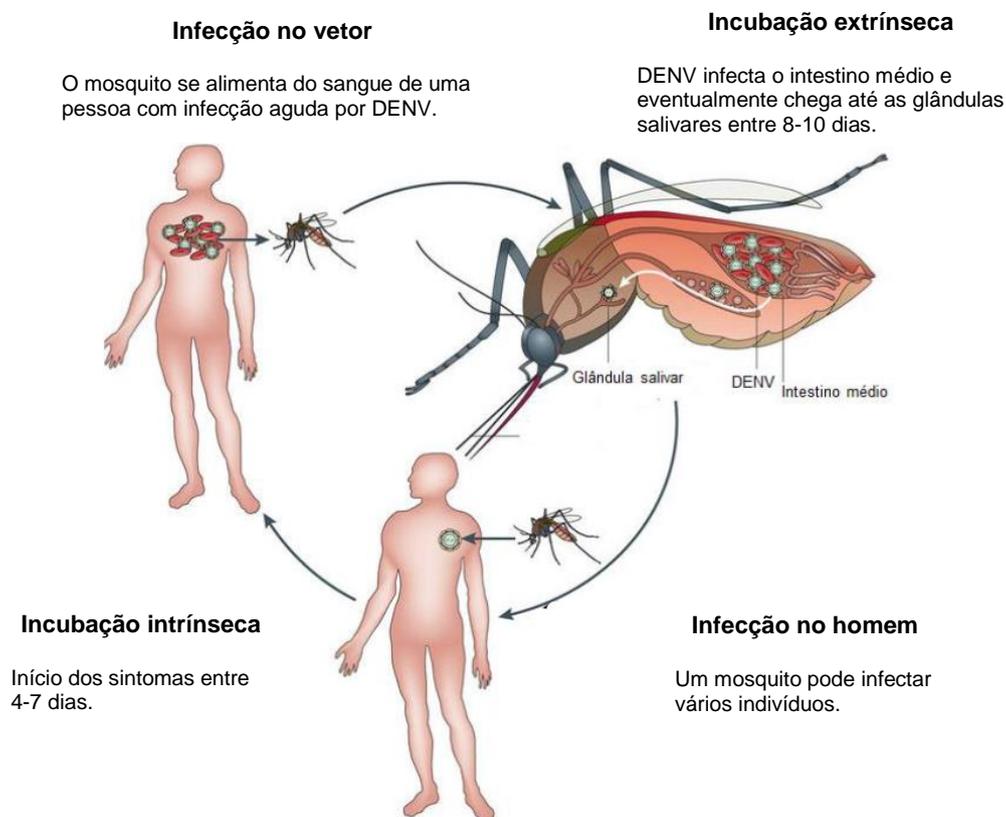
O aumento da população parece estar intimamente relacionado com a disseminação mundial dos sorotipos de DENV. O pico de circulação de DENV1 coincidiu com três períodos em que houve um grande crescimento da população mundial - o início dos anos 1970, a década de 1980 e o ano de 2000. A circulação de DENV2 também foi relacionada com períodos que exibiram um aumento

rápido na população (início dos anos 1980 e início dos anos 2000). Um aumento abrupto do tamanho da população mundial datada no início de 2000 também caracterizou a evolução de DENV3. DENV4 é o único sorotipo que não exibe a mesma tendência. Houve a expansão desse sorotipo durante a década de 1980, contudo, em meados da década de 1990 o número de casos de dengue pelo sorotipo diminuiu (COSTA et al., 2012).

### 2.2.6 Transmissão

A transmissão de DENV provavelmente ocorre através de um ciclo silvestre envolvendo primatas não humanos e, principalmente, por meio de um ciclo urbano envolvendo seres humanos, ambos tendo como principal vetor espécies de mosquitos do gênero *Aedes* (Figura 10). Apesar de *Ae. aegypti* ser considerado o principal vetor de surtos de DENV em todo o mundo, *Ae. albopictus* também tem sido descrito como um dos principais vetores, especialmente em territórios nos quais estão ocorrendo a substituição gradual de *Ae. aegypti* (CARON et al., 2013).

O aumento notório na incidência de dengue nas Américas nos últimos 30 anos deve-se principalmente em função da expansão geográfica do *Ae. aegypti* após o declínio do controle de vetores. A epidemia pelo DENV não exige um ciclo zoonótico para manutenção da transmissão nos seres humanos. Em vez disso, o vírus é mantido por um ciclo de transmissão humano-mosquito-humano. Um ciclo de transmissão silvestre é relatado nas florestas da Ásia e da África ocidental entre primatas não-humanos e espécies de mosquitos *Aedes*, mas a contribuição desse ciclo para a epidemia urbana parece ser mínima (WHITEHEAD et al., 2007).



**Figura 10: Ciclo de transmissão de DENV em humanos e mosquitos.** Durante o processo de hematofagia em um indivíduo com viremia, o mosquito pode tornar-se infectado pelo DENV. Na fase extrínseca o vírus inicialmente infecta células no intestino médio e outros tecidos, antes de se disseminar para as glândulas salivares do vetor. O mosquito infectado pode transmitir o DENV para vários seres humanos no momento do repasto sanguíneo. Após infectado (4 a 7 dias) o indivíduo apresenta viremia, sendo capaz de transmitir o vírus para um novo mosquito. Indivíduos sintomáticos e assintomáticos podem fazer parte desse ciclo. **Fonte:** Adaptado de GUZMAN, 2016.

A urbanização é um fator importante na disseminação do vetor. A proximidade de centros urbanos e periurbanos de baixa renda é relacionada a um risco maior, indicando que o movimento humano entre centros populacionais é um importante facilitador da propagação da dengue (BHATT et al., 2013). O acúmulo de recipientes não biodegradáveis no ambiente também é listado como fator de propagação de DENV, uma vez que proporciona o meio aquático necessário para a reprodução dos vetores (AMARASINGHE et al., 2011).

Fatores relacionados ao vetor (tamanho e estado biológico da população, densidade requerida para a transmissão em uma determinada área e taxa de

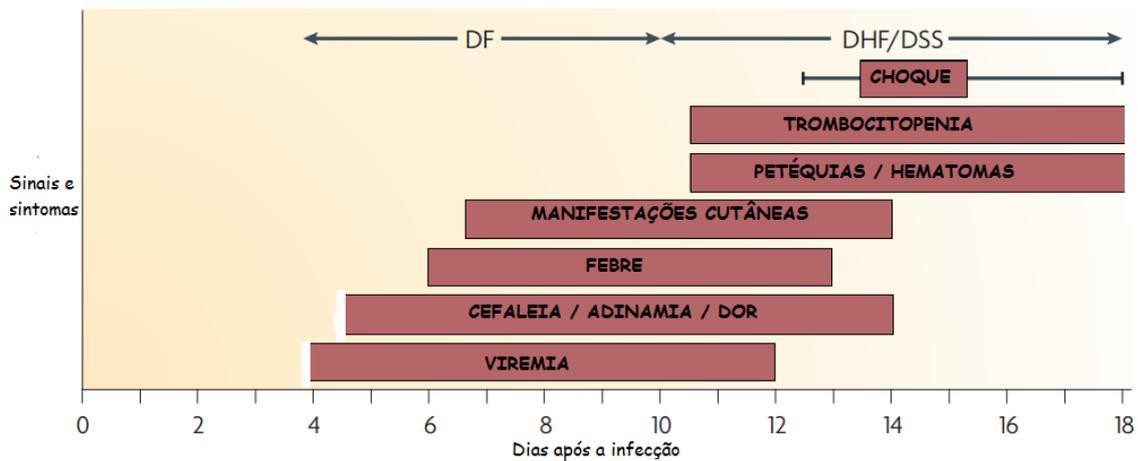
reprodução), ao ambiente (temperatura, índice pluviométrico e aquecimento global) e/ou ao hospedeiro (título da viremia, variação dos períodos epidêmicos e viremia reforçada, transmissão doméstica e movimento populacional) também são responsáveis pela manutenção de epidemias em todo o mundo (HALSTEAD S. B., 2008).

### **2.2.7 Manifestações clínicas**

As pessoas infectadas com DENV desenvolvem viremia entre três e seis dias após a picada do mosquito. Nesse tempo, surgem os principais sinais e sintomas, que são: febre, mialgia, artralgia, dor abdominal, erupção cutânea, trombocitopenia, hemorragia e choque hipovolêmico (MANTEL et al., 2011; MAMMEM et al., 2014).

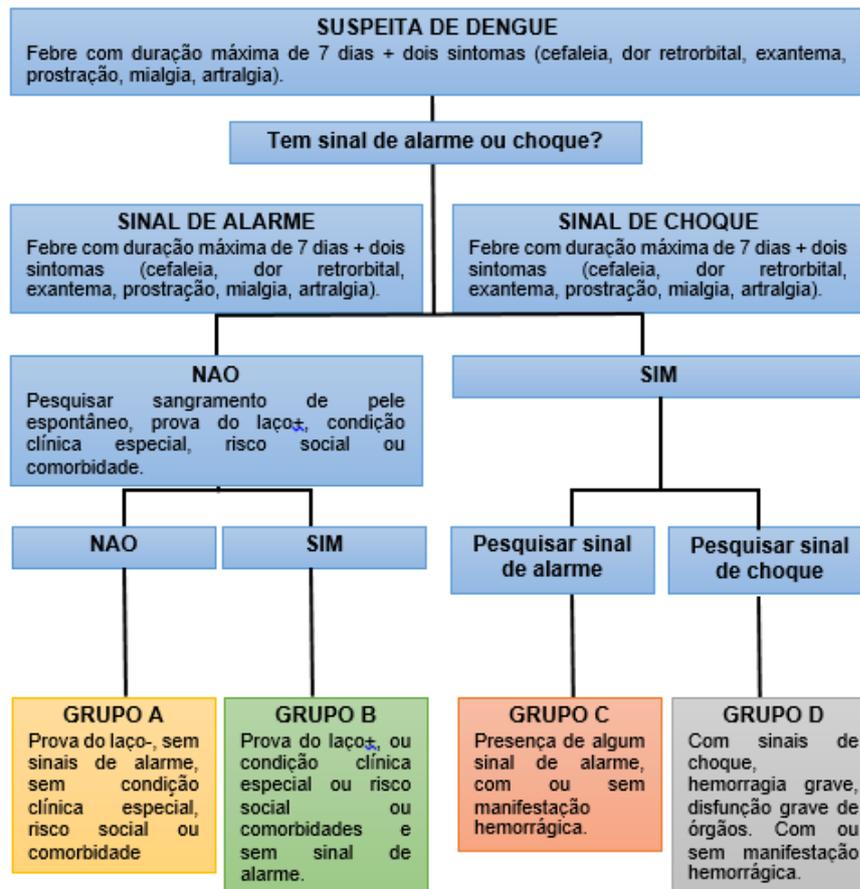
Soares e colaboradores (2011) relataram que o DENV é um importante agente etiológico de encefalite. As manifestações neurológicas da infecção por dengue incluem dor de cabeça, rigidez nuchal e convulsões (VARATHARAJ et al., 2010). Além disso, a encefalite da dengue pode ser acompanhada de delírio, agitação, consciência alterada e comportamento (DOMINGUES et al., 2008).

A classificação da dengue é feita com base nos sinais e sintomas da doença e sua evolução clínica. Pesquisadores classificam a dengue em inaparente ou assintomática, casos de dengue clássica ou febre da dengue (FD), FHD e SCD (Figura 11). No entanto, há o debate sobre a evolução do quadro clínico da dengue. Especialistas discutem se FD e FHD constituem duas entidades distintas, onde FHD é diferenciada por extravasamento de plasma resultando em hemoconcentração ou se a doença grave progride da doença leve e é diferenciada por sangramento, choque, derrame pleural, ascite, hepatite ou encefalite (COX et al., 2012; MESSINA et al., 2014).



**Figura 11: Evolução clínica temporal e estágios da doença por DENV.** Onde lê-se: DF (*Dengue febre* – Febre do Dengue); DHF/DSS (*Dengue haemorrhagyc fever/ Dengue shock syndrom* - Febre hemorrágica da Dengue/Síndrome do choque da Dengue). **Fonte:** Adaptado de Whitehead et al., 2007.

Para o manejo clínico do paciente, a OMS instituiu outra classificação; essa renomeação é devido à dificuldade encontrada no diagnóstico correto e preciso, principalmente para os casos de FHD (Figura 12). No Brasil, a nova classificação foi adotada desde 2016 e se baseia nos níveis de complexidade dos sintomas, com os pacientes sendo classificados em dengue com sinais de alarme e sem sinais de alarme, sendo essas subdivididas em grupos (A, B, C, D) (BRASIL, 2019).



**Figura 12. Classificação de risco e manejo do paciente com suspeita de dengue. Fonte:** Baseado no fluxograma de classificação de risco e manejo do paciente com suspeita de dengue. Brasil - Ministério da Saúde (2019).

Embora a nova classificação seja mais didática na clínica, a antiga ainda é amplamente utilizada, principalmente no campo da pesquisa, e será mantida para efeitos didáticos neste volume.

### 2.2.8 Imunopatogênese viral

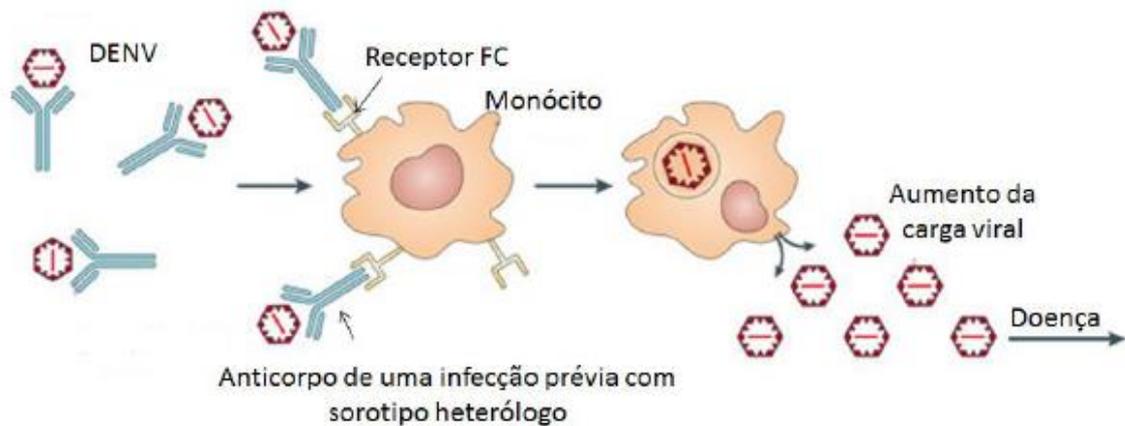
Na patogênese da dengue, o vetor pica o hospedeiro humano e a população viral, depois de inoculada, multiplica-se nas células que constituem alvos primários da infecção. Nesse estágio, observa-se aumento na temperatura corporal (cinco a oito dias). No segundo ciclo de multiplicação, o vírus é encontrado em DC (células dendríticas – *dendritic cells*) teciduais, macrófagos e mastócitos. É cogitado que os macrófagos e DCs sejam os alvos iniciais de DENV e os receptores celulares identificados são: o receptor de manose nos macrófagos e DC-SIGN (DC específica – ICAM 3 – *gabbing non-integrin 1*) nas

DCs. Há um quadro febril, provavelmente estimulado pela liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6). Na primeira semana da doença, o sistema imune inicia uma resposta à infecção. Linfócitos citotóxicos CD8+ podem destruir as células infectadas (citotoxicidade dependente de anticorpos) (COFFEY et al., 2009; JOHN et al., 2013).

O curso da infecção é mediado pelo desenvolvimento de uma resposta de anticorpos neutralizantes contra o sorotipo infectante, bem como a produção de células T específicas para DENV que desencadeiam a remoção das células infectadas. Os anticorpos IgM anti-dengue podem ser observados a partir do quarto dia da doença, com pico no final da primeira semana. Eles conseguem, no entanto, permanecer por meses. Os anticorpos IgG podem ser observados a partir da primeira semana, com pico no final da segunda e permanecem no sangue por anos, sendo responsáveis pela imunidade contra o determinado sorotipo do vírus (DALBEM et al., 2014).

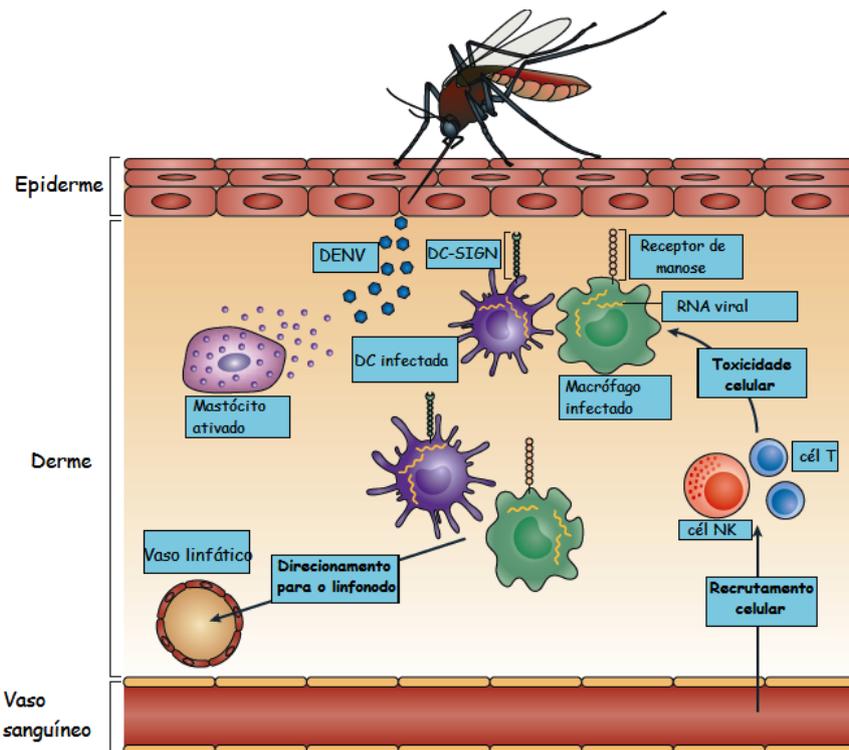
A infecção por um sorotipo de DENV leva à proteção homóloga ao longo da vida, mas apenas breve proteção contra a infecção heteróloga (por um sorotipo diferente) (WEAVER & VISILAKIS, 2009). Casos mais graves da doença são comumente associados à reinfecção ou co-infecção por um sorotipo diferente.

Sugere-se que essas condições de infecção favoreçam o aparecimento da FHD, que ocorre principalmente em indivíduos infectados por um segundo sorotipo de DENV após uma infecção primária. Isso ocorre pelo fato de que os anticorpos não neutralizantes para o segundo sorotipo e produzidos na primeira infecção formam um novo complexo com os antígenos da infecção secundária, com isso a penetração viral por opsonização em um macrófago seria facilitada. Desse modo, um grande número de cópias do vírus pode penetrar nos fagócitos e se replicar intensamente. Esse fenômeno (Figura 13), conhecido como reforço dependente de anticorpos (ADE – *Antibody dependent enhancement*) gera um aumento da viremia e estimula a produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6, além das proteases que ativam o sistema complemento e tromboplastina (fator pró-coagulante) (JAIN et al., 2014; JOHN et al., 2013).



**Figura 13. Modelo do aumento da infecção pelo DENV dependente de anticorpo – ADE.** A infecção pelo DENV pode ser favorecida pela presença de anticorpos provenientes de uma infecção prévia pelo vírus. Os anticorpos pré-existentes se ligam à partícula viral infectante durante uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo do DENV. Esses anticorpos não são capazes de neutralizar os vírus e impedir a infecção. Em vez disso, o complexo formado é reconhecido por receptores Fc presentes em células circulantes do hospedeiro. Por meio desse receptor, o anticorpo facilita a entrada do vírus na célula de forma mais eficiente, resultando em aumento da replicação viral e possível evolução para uma doença grave. **Fonte:** Adaptado de Whitehead, 2007.

O IFN- $\gamma$  liberado age em macrófagos infectados potencializando a internalização viral e a expressão de moléculas HLA classe II na membrana de linfócitos auxiliares específicos adicionais. Macrófagos e células T liberam mediadores vasoativos, aumentando a permeabilidade vascular e o extravasamento de plasma pela parede de vasos. A FHD é uma resposta imune exacerbada do hospedeiro, caracterizada por uma produção excessiva de citocinas, o que causa o aumento da permeabilidade vascular. Essa permeabilidade resulta em extravasamento do plasma, que é a alteração de base fisiopatológica da dengue (Figura 14). Com a saída de água e proteínas para o espaço extravascular, pode ocorrer a hemoconcentração e choque hipovolêmico (DALBEM et al., 2014).



**Figura 14: Resposta do hospedeiro à inoculação cutânea de DENV.** A maioria das infecções pelo DENV ocorre após a inoculação subcutânea do vírus na pele. Partículas virais infectam principalmente monócitos, DCs ou ativam mastócitos. Uma resposta inflamatória local para DENV requer o recrutamento de leucócitos, incluindo células *Natural Killer* e células T, que promovem a morte de células infectadas por vírus no local da inoculação. Acredita-se que DENV migre para gânglios linfáticos através de vasos linfáticos e estabeleça uma infecção sistêmica. Esta resposta inflamatória localizada ocorre muitos dias antes que haja qualquer sinal de infecção grave. **Fonte:** Adaptado de JOHN et al., 2013.

Contudo, a patogênese de DENV ainda não é bem estabelecida e estudos acerca dos mecanismos que conduzem às formas mais graves são dificultados devido à falta de modelos animais adequados, à diversidade genética de DENV e ao risco relativo de evolução a quadros graves de dengue (COX et al., 2012). A evolução da doença é determinada pelo sorotipo viral, fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro, como componentes do sangue periférico, duração da viremia, expressão de citocinas, ativação do sistema imune e proliferação de células, assim como fatores ambientais. Além disso, há registros sobre a relação entre o papel das proteínas contidas na saliva do vetor e efeitos imunomoduladores sobre a infecção (COFFEY et al., 2009).

### 2.2.9 Controle, tratamento e profilaxia

Ações de controle do vetor foram criadas e aplicadas mundialmente desde as primeiras epidemias de dengue. No Brasil, em 2002, foi instituído o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), cujos principais objetivos são: (i) reduzir a infestação pelo *Ae. aegypti*; (ii) reduzir a incidência da dengue; (iii) reduzir a letalidade por FHD. Para isso, o programa procura incorporar as lições nacionais e internacionais de controle da dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Mosquitos *Aedes aegypti* são bastante adaptáveis às variações ambientais, seja em recipientes naturais ou artificiais. Estes recipientes atuam na manutenção da população do vetor e na barreira do contato com os inseticidas; conseqüentemente, há o aumento na interação entre homem/vetor e na dificuldade do controle do mosquito. O *Ae. aegypti* é geralmente encontrado entre as latitudes 45° N e 35° S, não sendo frequente em altitudes de mais de 1.000 metros, devido à baixa temperatura. Embora haja interferência da temperatura ambiente no ciclo de vida e transmissibilidade, o *Ae. aegypti* é encontrado em áreas geograficamente distintas, inclusive em cidades tropicais e subtropicais. A deposição imprópria do lixo e sistemas inadequados de esgoto podem ser responsáveis pela grande densidade do mosquito em áreas endêmicas. Observa-se um aumento significativo das populações de larvas do mosquito durante a época das chuvas (CARRINGTON et al., 2013; LOPES et al., 2014; REY & O'CONNELL, 2014).

Os esforços atuais se concentram na eliminação do vetor, para isso vem sendo utilizado combinações de agentes químicos e biológicos e medidas de gestão nos locais de reprodução de *Ae. aegypti*. Entretanto, esses esforços de controle não conseguiram conter de forma eficaz o aumento da incidência de epidemias de dengue e a expansão da distribuição geográfica de transmissão endêmica, possivelmente pela não-universalização das ações em cada município e à descontinuidade na execução das atividades de combate ao vetor (BHATT et al., 2013; BRAGA & VALE, 2007; FERREIRA et al., 2009).

Os tratamentos que estão atualmente em uso para controlar a infecção por DENV são em grande parte de suporte, incluindo a reidratação e o acompanhamento do paciente. O tratamento preconizado pela OMS incentiva a

ingestão oral de solução de reidratação, como suco de frutas e outros fluidos contendo eletrólitos e açúcar, para repor as perdas em função da febre e vômitos e uso de solução isotônica em casos de internação. A ingestão adequada de líquidos por via oral pode ser capaz de reduzir o número de hospitalizações (WHO, 2009). O uso de paracetamol é indicado quando o paciente apresentar febre alta. Não é recomendado o uso de ácido acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno ou outros agentes anti-inflamatórios não-esteróides, dado que estes fármacos podem agravar casos de gastrite, sangramento, ou síndrome de Reye nos casos dos derivados do ácido acetilsalicílico. Recentemente observou-se o crescimento do uso de drogas naturais que possuem atividade contra *Ae. aegypti* por seu mecanismo antiviral, larvicida e mosquitocida, além de propriedade repelente (IDREES & ASHFAQ, 2012; SINGHI et al., 2007).

Medidas de prevenção individuais e controle do vetor eram as únicas formas de evitar a infecção pelo vírus. No entanto, pesquisas sobre o desenvolvimento de drogas e vacinas mudou esse quadro. Nos últimos anos houve um progresso significativo na produção de vacinas contra a dengue, apesar dos desafios para o desenvolvimento de uma vacina tetravalente. O interesse nas pesquisas, motivado pela disseminação sem controle contínuo da dengue em todo o mundo, tem atraído parcerias público-privadas para facilitar o processo de confecção da vacina (WHO, 2009). Atualmente há uma vacina comercial licenciada contra dengue, a Dengvaxia®.

O mesmo acontece na pesquisa de antivirais contra a dengue que vem ganhando destaque ao passo dos progressos substanciais na biologia estrutural do DENV. As estratégias utilizadas se baseiam em estudos realizados para a descoberta de drogas contra o vírus da hepatite C (HCV), uma vez que o HCV e DENV são membros da mesma família. Os alvos que estão mais avançados são drogas que bloqueiam enzimas virais necessárias para a replicação, como a protease NS3/NS2B e RNA-polimerase dependente de RNA, e drogas que atuem no bloqueio da fusão entre as membranas da célula hospedeira e vírus (POOJA et al., 2014).

## 2.3 VACINAS CONTRA DENGUE

Há uma necessidade reconhecida de vacinas contra DENV, mas o desenvolvimento tem sido dificultado por aspectos inerentes à epidemiologia e biologia do agente. A co-circulação dos quatro sorotipos do DENV em regiões endêmicas e a capacidade de todos causarem doença em seres humanos levou a OMS a recomendar que uma vacina eficaz deva conferir imunidade a todos os sorotipos, apresentando ótimo potencial imunogênico e contornando o fenômeno de ADE (*Antibody-dependent enhancement*), além de gerar proteção duradoura e eficaz. A compreensão limitada sobre a patogenia e a interação entre o vírus e o sistema imunológico, assim como a falta de modelos animais disponíveis para testar respostas imunológicas frente a potenciais vacinas também constituem um desafio na produção de uma vacina contra DENV (MAMMEM et al., 2014; MURRELL et al., 2011; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2014).

A única vacina contra a dengue comercializada atualmente, Dengvaxia® (CYD-TDV- *Chimeric yellow fever dengue – Tetravalent dengue vaccine*), foi desenvolvida pelo laboratório Sanofi Pasteur. CYD-TDV usa arcabouço da vacina contra a febre amarela. Nessa estrutura são inseridas as proteínas prM e E de cada sorotipo de DENV, em substituição às mesmas proteínas da amostra vacinal da febre amarela (FA-17D). Atualmente, o CYD-TDV requer estudos adicionais para seu uso em mulheres grávidas, lactantes e imunocomprometidos, principalmente indivíduos infectados pelo HIV (SCOTT, L.J., 2016; WHO, 2017).

A vacina é licenciada em 19 países, incluindo o Brasil. Dengvaxia® é indicada para indivíduos entre 9 e 45 anos idade e requer um esquema de aplicação composto por duas doses com intervalos de seis meses entre cada aplicação. A vacina CYD-TDV apresenta diferentes níveis de proteção entre os sorotipos do vírus e a população alvo (Tabela 1).

**Tabela 1. Eficácia da proteção da vacina CYD-TDV contra os sorotipos de DENV.**

Sorotipo Viral	Local do Estudo		Eficiência combinada
	América Latina	Ásia	
<b>DENV 1</b>	54,8%	65,7%	58,4%
<b>DENV 2</b>	50,2%	36,8%	47,1%
<b>DENV 3</b>	74,2%	69,5%	73,6%
<b>DENV 4</b>	80,9%	87,9%	83,2%
<b>Todos os sorotipos</b>	64,7%	67,8%	65,6%

Resultados com base em estudos de fase III e II b em mais de 20 mil crianças com mais de 9 anos na América Latina e mais de 10 mil crianças na Ásia, respectivamente. A eficácia global da vacina nesses dois estudos foi de 56,5% e 60,8%. **Fonte:** Tabela produzida pela autora, baseada em AMAR-SINGH et al., 2013; BÄRNIGHAUSEN et al., 2013.

Estudos de acompanhamento da vacina mostraram que há um risco excessivo do desenvolvimento da forma grave da doença nos indivíduos vacinados soronegativos e por essa razão a vacina foi suspensa nas Filipinas em 2017. No mesmo ano, a pedido da ANVISA, a Sanofi atualizou a bula da vacina com informações sobre indicação e proteção. A empresa anunciou publicamente que a vacina deve ser usada apenas em indivíduos com história prévia de infecção por dengue (SANOFI, 2017). A empresa ainda afirma que a vacina demonstrou eficácia de cerca de 80% na redução de hospitalizações e na redução dos casos graves ao longo dos 6 anos de acompanhamento (WILDER-SMITH et al., 2019). Embora haja uma vacina tetravalente disponível comercialmente, outros laboratórios continuam suas pesquisas em busca de uma vacina mais eficaz contra a dengue. A Tabela 2 resume as principais vacinas contra dengue em teste no momento e suas principais características.

**Tabela 2. Vacinas em teste contra dengue.**

<b>METODOLOGIA</b>	<b>CANDIDATO/LABORATÓRIO</b>	<b>FASE</b>	<b>OBSERVAÇÕES</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<b>Vírus vivo atenuado</b>	CYD-TDV / Sanofi	Licenciada	Proteção limitada.	GUY, B. et al., 2010.
	DENVax / Takeda (Inviragen)	Fase III	Esqueleto estrutural da vacina atenuada de DENV2 obtida por diversas passagens em células PDK (rim de cão primário).	OSÓRIO, J.E. et al., 2014.
	TV003/TV005 / NIH e Butantan	Fase III	Construção baseada na região não traduzida 3' UTR de DENV.	WHITEHEAD, S.S., 2016.
<b>Vacina de DNA</b>	TVDV / NMRC	Fase I	Vacina de DNA utilizando o vetor plasmidial VR1012 para expressar os genes prM e E de DENV1 ou DENV2.	PORTER, K.R. & RAVIPRAKASH, R., 2015; SÁEZ-LLORENS, X. et al., 2018.
<b>Vacina inativada</b>	DPIV / GSK, WRAIR, Fiocruz	Fase I		SCHMIDT, A.C. et al., 2017.
	TLAV-TPIV / WRAIR	Fase I	Apresentou alta reatogenicidade nos ensaios clínicos.	PORTER, K.R. & RAVIPRAKASH, R., 2015.
<b>Vetores virais</b>	EDIII e DENV-1 M Themis Bioscience / Institute Pasteur	Pré-clínico (camundongos)	Proteínas virais de envelope e membrana expressas em vírus do sarampo atenuado.	BRANDLER, S. et al., 2010.
	E85 / Global Vaccines	Pré-clínico (primatas não humanos)	Proteínas virais expressas a partir do VEE.	WHITE, L. et al., 2013.
<b>Vacina de subunidade</b>	<i>Recombinant subunit vaccine-V180</i> / Hawaii Biotech, Merck and Co.	Fase I		MANOFF, S. et al., 2015.
	IPK, CIGB *	Pré-clínico (primatas não humanos)	Proteínas de envelope e capsídeo expressas em <i>E. coli</i>	VALDÉS, I. et al., 2009.
	<i>Bivalent 80E-STF2 fusion proteins</i> / VaxInnate	Pré-clínico (camundongos e primatas não humanos)	Proteínas de envelope expressas em baculovirus/células de insetos	LIU, G. et al., 2015.
	EDIII proteína / NHRI	Pré-clínico (primatas não humanos)	Proteínas de envelope expressas em <i>E. coli</i> .	CHEN, H. et al., 2013.
<b>Virus-like</b>	EDIII-HBsAg VLPs ou ectoE-based VLPs	Pré-clínico (primatas não humanos)	Proteínas virais expressas em <i>P. pastoris</i>	BISHT, H. 2002.

\* Única construção monovalente. **Fonte:** Tabela produzida pela autora.

A estratégia da utilização de vírus como vetores vacinais se baseia em mecanismos do próprio vetor para entrar na célula e sequestrar a maquinaria celular para expressar as proteínas do próprio vírus e também as proteínas antigênicas de interesse. Avanços na virologia molecular conferiram um excelente perfil de segurança a esses vetores em animais e em ensaios clínicos. No entanto, o sistema imune do hospedeiro também possui mecanismos evoluídos para inibir infecções virais: a ativação da imunidade inata pode tanto proporcionar uma atividade adjuvante como diminuir a eficiência do vetor. Respostas imunes adaptativas ao vetor também podem bloquear ou reduzir a indução das respostas desejadas contra o antígeno de interesse (ROLLIER et al., 2011).

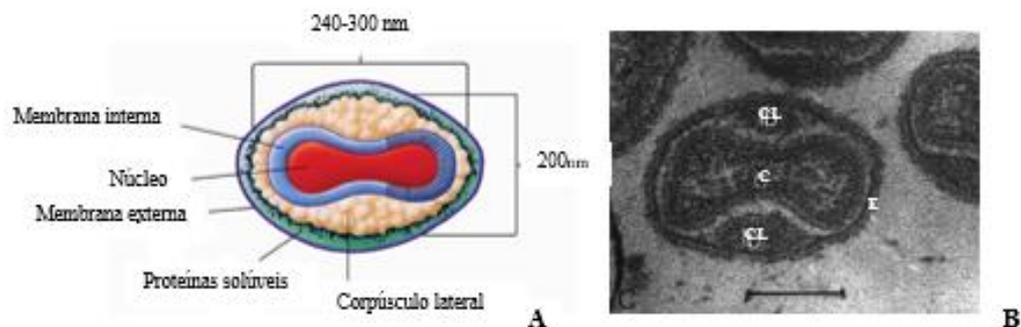
A utilização dessa estratégia pode provocar forte resposta humoral e celular em humanos contra vários patógenos e tem se mostrado promissora no desenvolvimento de vacinas candidatas contra DENV. Vários vetores virais, tais como poxvírus recombinantes e adenovírus, estão sendo utilizados no desenvolvimento de vacinas candidatas. (THISYAKORN & THISYAKORN, 2013; WEI et al., 2013). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento de uma vacina experimental contra dengue utilizando o vírus *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) como vetor viral. O MVA foi utilizado como vetor na construção de diferentes imunógenos monovalentes contra DENV3 expressando a proteína E. Tais vacinas foram capazes de induzir respostas celulares e humorais amplas e consistentes nos animais imunizados, bem como protegê-los do desafio contra DENV3, dando base para o desenvolvimento de vacinas contra os outros sorotipos de dengue utilizando MVA como vetor (QUINAN et al., 2014).

## 2.4 POXVIRUS COMO VETORES VACINAIS

A família *Poxviridae* é subdividida em duas sub-famílias: *Entomopoxvirinae*, com vírus que infectam insetos, representados pelos gêneros *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* e *Gammaentomopoxvirus*; e *Chordopoxvirinae*, com vírus que infectam vertebrados, que abrange os gêneros *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Centapoxvirus* e

*Cervidpoxvirus* (ICTV, 2017). Os poxvírus mais notórios são o agente causador da varíola (VARV – *Variola virus*) e o vírus *Vaccinia* (VACV – *Vaccinia virus*), que foi utilizado como vacina viva para a erradicação da varíola.

A família *Poxviridae* é composta por vírus grandes, se comparados à maioria dos vírus animais. Possuem morfologia complexa, com formato ovoide ou de tijolo, medem aproximadamente 230 × 300nm e podem ou não ser envelopados (Figura 15). A partícula viral carrega muitas enzimas, incluindo uma RNA-polimerase dependente de DNA que permite que a síntese do RNA mensageiro (mRNA) ocorra exclusivamente no citoplasma de células infectadas de vertebrados ou invertebrados, eliminando a possibilidade de inserção ao genoma do hospedeiro (MOSS, 2006). O cerne viral é constituído por um DNA linear de dupla fita ligado em ambas as extremidades, apresentando de 130 a 360 kb, que pode ser dividido em uma região central conservada, de aproximadamente 100kb, que codifica proteínas essenciais para a replicação do vírus, e em regiões terminais mais variáveis, que codificam proteínas não essenciais, mas que afetam a virulência (GUBSER et al., 2004).



**Figura 15: Morfologia da partícula viral dos Poxvírus.** A – Representação esquemática da estrutura dos Poxvírus. O DNA viral encontrado no cerne é recoberto por uma membrana e assume uma forma de haltere por causa de dois corpos laterais. O vírion apresenta um envelope de bicamada lipídica contendo proteínas virais específicas. **Fonte:** Adaptado de Prescott et al, 2008. B –Microscopia eletrônica de transmissão da secção de um vírion intracelular maduro apresentando o cerne (C), os corpúsculos laterais (CL) e o envelope externo (E). **Fonte:** ICTV, 2019.

Logo após a fusão, o vírus penetra na célula hospedeira e o nucleocapsídeo viral é disperso no citoplasma da célula. A ativação da RNA polimerase viral associada ao cerne e de fatores de transcrição resulta na transcrição precoce de genes virais, que incluem aqueles que codificam enzimas

e fatores necessários para a replicação do DNA e um gene que codifica um fator de transcrição intermediário. A replicação do DNA viral ocorre totalmente no citoplasma da célula infectada. A transcrição intermediária é iniciada juntamente com a replicação do DNA viral. Nessa etapa são produzidos fatores de transcrição de genes tardios, os quais desencadeiam a transcrição de genes para a síntese de proteínas estruturais e tardias, conduzindo à montagem do vírus. Esse processo gera duas formas infectantes principais: os vírus intracelulares maduros (IMVs - *Intracellular mature virus*) e os vírus envelopados extracelulares (EEVs - *Extracellular enveloped virus*), além de várias outras formas intermediárias, entre elas, os vírus imaturos gerados no início da replicação. Uma pequena parte dos IMVs se transforma em EEVs, passando por processos de adição de duas membranas, provenientes de vesículas intermediárias entre o retículo endoplasmático e o aparato de Golgi. Por fim, os vírus envelopados são liberados da célula através da fusão de seu envelope mais externo à membrana citoplasmática (CONDIT, 2007).

A atuação do VACV na erradicação do VARV realçou a importância de pesquisas envolvendo os poxvírus e vacinas. O interesse nos poxvírus persiste até hoje, uma vez que, sua estrutura e ciclo de multiplicação são diferenciados, sendo úteis como ferramentas para a elucidação de mecanismos básicos dos metabolismos celulares e virais, além de fornecerem conhecimento em estratégias virais no combate à resposta imune. Os poxvírus recombinantes atenuados surgiram como estratégia na geração de vacinas por induzirem fortemente a resposta imune mediada por células T contra agentes patogênicos intracelulares, apresentarem capacidade de inserção de transgenes (até 25 kb), possibilitarem a inclusão de múltiplos transgenes, não necessitar a utilização de adjuvantes, facilidade de geração de novos recombinantes e por apresentarem um histórico confiável de segurança como vacinas para uso humano (DREXLER et al., 2004; GOMEZ et al., 2008).

Atualmente, vários poxvírus atenuados são usados como vetores vacinais e apresentam registro de segurança para uso humano. Os mais amplamente usados incluem o MVA, bem como *Vaccinia New York Board of Health* atenuado (NYVAC). Em alguns campos, avipoxvírus atenuados também foram desenvolvidos, incluindo o vírus da varíola aviária – linhagem 9 de fowlpox (FP9) e dos canários (ALVAC) (DRAPER et al., 2013).

O VACV foi utilizado na construção de vacinas contra varíola, entretanto, as primeiras vacinas provocavam efeitos adversos importantes. A preocupação com a segurança da vacina convencional contra a varíola levou ao desenvolvimento de derivados atenuados de VACV, tais como o vírus Ankara Modificado (MVA). O MVA foi obtido através passagens sucessivas (~570) em culturas de fibroblasto de embrião de galinha (CEF - *Chicken embryo fibroblast*) a partir de VACV obtido de amostras de uma lesão de varíola em um cavalo em Ankara na Turquia. O MVA foi utilizado na fase final da campanha de erradicação da varíola, sendo administrado por via intracutânea, subcutânea ou intramuscular em mais de 120 mil pessoas no sul da Alemanha e da Turquia, sem apresentar efeitos colaterais significativos. Desde então, o MVA tem impedido com segurança infecções por outros *Orthopoxvirus* em humanos e animais (MAYR, et al., 1978; MEYER et al., 1991; SUTTER & MOSS, 1992).

Devido às sucessivas passagens em cultura de CEF, o MVA perdeu aproximadamente 15% do genoma, um processo que envolveu 6 grandes deleções, numeradas de I a VI, bem como algumas pequenas deleções e mutações pontuais. As deleções I e IV estão localizadas nas extremidades direita e esquerda do genoma viral, enquanto que a deleção II afetou dois terços do gene K1L, responsável pela capacidade viral de infectar células de mamíferos. Por sua vez, a deleção III levou à perda de um fragmento de 3,5 kb que incluía um sítio único de restrição da enzima *SmaI*. Somadas, as deleções V e VI representam a perda de 8,5 kb do genoma viral. Após as sucessivas perdas genéticas, o genoma do MVA foi reduzido de 208 kb para 177kb, afetando diretamente a replicação viral. Além disso, as células infectadas por MVA expressavam níveis muito elevados de proteínas codificadas pelo vírus, incluindo aquelas codificadas por genes heterólogos. A combinação dessas múltiplas deleções torna improvável a reversão para um fenótipo virulento (BLANCHARD et al., 1998; DIMIER et al., 2011).

A deleção de parte do genoma também afetou vários genes que codificam inibidores solúveis de citocinas e quimiocinas. No entanto, a maioria dos genes estruturais que codificam epítopos para induzir resposta por anticorpos neutralizantes foram mantidas (McCURDY et al., 2003). Observou-se, também, que o MVA se replica muito bem em células primárias de animais (como os fibroblastos), mas apresenta replicação limitada em células humanas

transformadas, tais como TK-143B e células HeLa. Isso indica que, apesar de genes importantes no ciclo de replicação viral terem sido perdidos, as alterações no processo de morfogênese viral nos MVAs prejudicam, apenas, os passos finais da morfogênese viral, comprometendo a formação de partículas infectantes e não interferindo em alterações nas etapas precoces e tardias da expressão de genes virais ou nos níveis de expressão de proteínas exógenas. Esse fato tem que ser levado em consideração quando na sua utilização para fins imunoproliféricos ou imunoterapia em humanos. Essas características representam um perfil adequado para um vetor vacinal seguro e imunogênico (DIMIER et al., 2011).

O MVA tem sido considerado uma excelente ferramenta para a geração de vacinas recombinantes contra doenças infecciosas humanas que ainda não apresentam profilaxia, ou mesmo como uma alternativa para melhorar estratégias de vacinas existentes. Atualmente, o MVA atua como vetor em muitas construções vacinais em pesquisas clínicas e pré-clínicas. Dentre as principais podemos citar as vacinas contra: Papiloma vírus humano (REMY-ZILLER et al., 2014); síndrome respiratória por Coronavírus (SONG et al., 2013); vírus da imunodeficiência humana (KNUDSEN et al., 2015; MUNSERI et al., 2015); vírus Ebola (ZHOU & SULLIVAN, 2015); Influenza vírus (MULLIN et al., 2016); Citomegalovírus (LA ROSA et al., 2017), vírus da hepatite B (CAVENAUGH et al., 2011); vírus da hepatite C (GÓMEZ et al., 2013); *Plasmodium falciparum* (PARRA et al., 2015), além de atuar no controle da malignidade de tumores (WALSH et al., 2013).

## 2.5 MODELO MURINO

Sabe-se que a imunopatogênese de DENV envolve a ativação das respostas imune inata e adquirida e é fundamental entender os parâmetros imunológicos envolvidos no curso da infecção.

Há uma dificuldade na obtenção de um modelo animal que mimetize a infecção de DENV em humanos e esse fator tem dificultado o progresso no desenvolvimento de intervenções terapêuticas que visam a obtenção de vacinas ou agentes antivirais a fim de se controlar a infecção pelo DENV em humanos (CHAN et al., 2015; NA et al., 2017).

O uso de um modelo experimental baseado no uso de camundongos imunocompetentes é considerado padrão para estudo da imunopatogênese da dengue. No entanto, esses animais têm se mostrado resistentes à infecção pelo DENV mesmo com o uso de altas doses do vírus, uma vez que o DENV mantém uma baixa taxa de multiplicação e limitada patogênese em camundongos selvagens imunocompetentes (CHAN et al., 2015; SARATHY et al., 2015).

Na tentativa de contornar esse aspecto, utiliza-se vírus adaptados ao modelo murino e/ou o uso de vias de infecção artificiais, tais como intraperitoneal ou intracranial (GUABIRABA & RYFFEL, 2014). A infecção intracranial é utilizada como ferramenta para a adaptação de isolados humanos de DENV ao modelo murino a aproximadamente 70 anos e até hoje vem sendo utilizada para isolamento viral, neuroadaptação e como estratégia para validação de imunógenos para dengue (SABIN AB, 1945; SARATHY et al., 2015).

A infecção pela via intracranial, tem sido usada como forma de desafiar animais no intuito de avaliar resposta imune anti-dengue. O modelo em questão, se apresenta como um excelente modelo para avaliação qualitativa de imunógenos, uma vez que os animais infectados apresentam sinais de encefalite e vão a óbito, sendo uma forma direta de mostrar atividade protetora anti-dengue (ALVES et al., 2016).

### 3 JUSTIFICATIVA

A dengue é a principal arbovirose que afeta o ser humano. A doença apresenta alta taxa de morbidade e vários casos de mortalidade em todo mundo. Além disso, está associada a um aumento considerável de gastos do sistema público de saúde nos quesitos internação, tratamento e medidas públicas de prevenção e controle, além de prejuízos causados pelo absenteísmo ao trabalho.

As vacinas licenciadas disponíveis atualmente conferem níveis de proteção na população considerados, por muitos, como apenas medianos. Além disso, questões relacionadas a possíveis efeitos semelhantes a ADE, induzidos por uma infecção posterior à vacinação, levaram a OMS a indicar a vacina atualmente disponível apenas para localidades onde o índice de soropositividade populacional para dengue é superior a 50% (WHO, 2017).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra DENV tem sido dificultado por aspectos inerentes à epidemiologia e biologia do agente. A co-circulação dos quatro sorotipos do DENV em regiões endêmicas e a capacidade de todos causarem doença em seres humanos levou a OMS a recomendar que uma vacina eficaz deva conferir imunidade a todos os sorotipos, apresentando ótimo potencial imunogênico e contornando o fenômeno de ADE, além de gerar proteção duradoura e eficaz. A compreensão limitada sobre a patogenia e interação entre o vírus e o sistema imunológico, assim como a falta de modelos animais disponíveis para testar respostas imunológicas frente a potenciais vacinas também constituem um desafio na produção de uma vacina contra os quatro sorotipos de DENV (AMAR-SINGH et al., 2013; MAMMEM et al., 2014; MURRELL et al., 2011; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2014).

A utilização de vetores vacinais tem se mostrado uma estratégia promissora no desenvolvimento de vacinas candidatas contra DENV. Vetores virais vacinais utilizam-se de mecanismos do próprio vetor para entrar na célula e sequestrar a maquinaria celular para expressar as proteínas virais. O interesse nos poxvírus como vetor persiste porque sua estrutura e ciclo de multiplicação são diferenciados, sendo úteis como ferramentas para a elucidação de mecanismos básicos do metabolismo do ácido nucleico, além de fornecerem conhecimento em estratégias virais no combate à resposta imune. As construções que utilizam poxvírus visam uma indução forte da resposta imune

mediada por células T contra agentes patogênicos intracelulares, embora respostas humorais também sejam eficientemente induzidas por esta estratégia. Adicionalmente ao seu potencial imunogênico, poxvírus apresentam, ainda, grande capacidade de inserção de transgenes; possibilidade de inclusão de múltiplos transgenes; não utilização de um adjuvante; relativa facilidade de geração de novos recombinantes; um histórico confiável de segurança como vetores para uso humano (THISYAKORN & THISYAKORN, 2013; WEI et al., 2013).

Dentre os principais poxvírus atenuados em uso como vetores vacinais e que apresentam registro de segurança para uso humano pode-se destacar o MVA. O vírus tem sido considerado como uma excelente ferramenta para a geração de vacinas recombinantes contra doenças infecciosas que ainda não apresentam profilaxia, ou mesmo como uma alternativa para melhorar estratégias de vacinas existentes (DRAPER et al., 2013).

O Laboratório de Virologia Básica e Aplicada tem trabalhado no desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares utilizando vírus MVA recombinantes como vetor. Neste contexto, podemos destacar os trabalhos do nosso grupo envolvendo os agentes: vírus da imunodeficiência felina (FIV - *Feline immunodeficiency virus*), o vírus da leucemia felina (FELV - *Feline leukemia virus*); circovírus suíno tipo II, *Parainfluenza 5* e MVA expressando as proteínas E de DENV3 (ANDRADE, 2016; DAIAN E SILVA, 2017; QUINAN et al., 2014).

No que diz respeito à dengue, os resultados prévios do laboratório demonstraram que o vírus recombinante MVA/DENV3 foi capaz de induzir, de forma robusta e consistente, respostas amplas, tanto celulares quanto humorais nos animais imunizados. O imunógeno ainda protegeu 100% dos animais desafiados com DENV3. Os dados promissores indicaram que ferramentas vacinais alternativas baseadas no vírus MVA recombinante podem ser extremamente importantes para a busca de uma vacina eficiente contra dengue (QUINAN et al., 2014). Baseado nos resultados anteriores, a proposta atual foi construir e avaliar MVAs recombinantes expressando as proteínas E de DENV1, 2 e 4, respectivamente. Os dados obtidos serão somados aos anteriores para, futuramente, constituir uma vacina tetravalente contra DENV.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Construir diferentes vírus recombinantes *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) expressando a proteína E de *Dengue virus* sorotipos 1, 2 e 4 (DENV1, 2, 4) e, em seguida, avaliar e comparar, em modelo murino, o potencial protetor dessas construções.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar genes sintéticos para as proteínas E de DENV1, 2 e 4 e obtenção comercial dos genes desenhados;
- Gerar, para cada sorotipo, os plasmídeos de transferência pLW44/DENV1E, 2E, 4E;
- Gerar, por meio de recombinação homóloga, os diversos vírus MVA recombinantes contendo os genes E de DENV1, 2 e 4 no seu genoma, respectivamente;
- Detectar a presença do gene da proteína E através de PCR e sequenciamento com iniciadores específicos;
- Detectar a expressão das proteínas recombinantes E através de ensaios de *Western Blot* e citometria de fluxo;
- Imunizar, desafiar e avaliar o potencial protetor dessas construções através de desafio de camundongos C57BL/6 com o DENV correspondente a vacina.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 OBTENÇÃO DOS GENES DA PROTEÍNA E DE DENV1, 2 E 4

#### 5.1.1 Desenho dos genes sintéticos

Considerando que a glicoproteína do envelope de DENV apresenta ectodomínios e endodomínios, as sequências foram truncadas para excisão das porções transmembrana, de forma a diminuir a sua hidrofobicidade. O produto do truncamento corresponde a 80% da proteína original e está correlacionado a um alto poder imunogênico (MEN et al., 2000).

Sequências de DENV1E, DENV2E e DENV4E foram obtidas a partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (*GenBank*), alinhadas e truncadas no programa MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) e analisadas no programa *MultAlin* para a obtenção de sequências consensos para o gene E de cada sorotipo. Foram selecionadas sequências da proteína E de DENV1, 2 e 4 circulantes na América do Sul depositadas no *GenBank* entre os anos de 2005 e 2014. Além disso, as sequências consensos foram otimizadas manualmente, como proposto anteriormente por Quinan e colaboradores para DENV3E (QUINAN et al., 2014). As alterações realizadas podem ser observadas na Tabela 3.

Levando em consideração a necessidade de subclonagens posteriores, as enzimas de restrição utilizadas foram selecionadas pela ferramenta NEBcutter 2.0 (*New England Biolabs*), baseadas no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo de expressão pLW44.

**Tabela 3. Alterações realizadas nos genes E de DENV 1, 2 e 4.**

<b>PORÇÃO 5'</b>	
<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>
<b>3 adeninas iniciais (AAA)</b>	Permitir a restrição com a enzima <i>Sal I</i>
<b>Sítio para enzima <i>Sal I</i></b>	Restrição enzimática
<b>Sequência consenso Kozak</b>	Expressão em células eucarióticas
<b>Mutações para deleção da sequência de Kozak interna</b>	Eliminação de sequências Kozak repetidas dentro do gene
<b>PORÇÃO 3'</b>	
<b>ALTERAÇÃO</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>
<b>Códon de terminação extra (TAA)</b>	Sinalização do término da tradução
<b>Sequência espaçadora (10 nt)</b>	Otimização da síntese proteica
<b>Motivo de terminação de transcrição precoce de <i>Vaccinia virus</i></b>	Controle da terminação da transcrição
<b>Sítio para enzima <i>Pst I</i></b>	Restrição enzimática
<b>3 adeninas terminais (AAA)</b>	Nucleotídeos à jusante do sítio <i>Pst I</i> (permitem a restrição com a enzima)

\*NT – Nucleotídeos. **Fonte:** Tabela autoral, baseada em QUINAN et al., 2014.

### 5.1.2 Síntese dos genes

As sequências dos genes DENV1E; DENV2E e DENV4E construídas foram enviadas para a empresa *GenOne* que fez a síntese comercial de acordo com a sequência enviada. O gene DENV1E, clonado no plasmídeo pBluescript II SK(-) (pBSK), foi obtido em dezembro de 2015. Os genes DENV2E e DENV4E, clonados em pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp (pEZ), foram obtidos em outubro de 2016. As sequências de DENV1E, 2E e 4E clonadas em plasmídeo fornecido pelo fabricante podem ser conferidas nos Anexos 1, 2 e 3, respectivamente. Todos os plasmídeos foram diluídos e estocados de acordo com as instruções do fabricante.

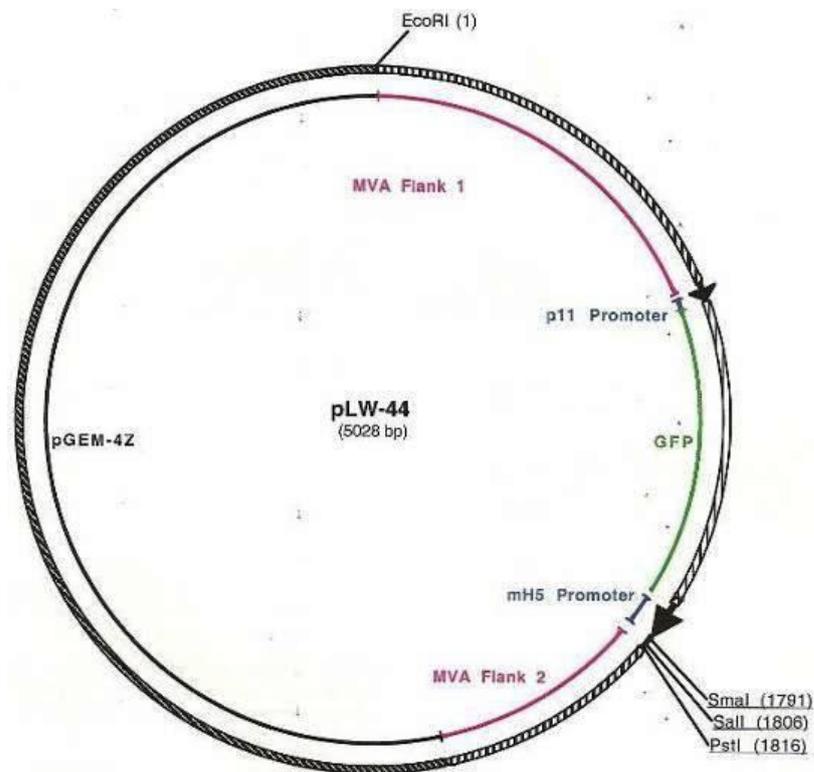
## 5.2 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA

Para obter os vírus MVA recombinantes expressando a proteína E de DENV1, 2 e 4 foram utilizados plasmídeos de transferências responsáveis por mediar a recombinação homóloga. Esses plasmídeos de transferência foram

construídos pela subclonagem dos diferentes genes para proteína E no plasmídeo pLW44.

### 5.2.1 Plasmídeo pLW44

O plasmídeo pLW44, gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (*Laboratory of Viral Diseases, NIAID, NIH, EUA*), possui como esqueleto estrutural o plasmídeo pGEM-4Z (Figura 16). Além disso, estão presentes sequências flanqueadoras (flanco 1 e 2) homólogas às sequências da Região de Deleção III do genoma do vírus MVA, dirigindo o gene exógeno para esse locus.



**Figura 16. Plasmídeo pLW44.** Representação esquemática do plasmídeo de transferência pLW44 apresentando o arcabouço genético do vetor de clonagem pGEM-4z, um promotor p11 que se localiza após a região de flanco 1, um gene que codifica para a proteína GFP, seguido de um promotor mH5, uma região MCS apresentando locais de clivagem para as enzimas de restrição *SmaI*, *Sall* e *PstI* e uma região de flanco 2.

O plasmídeo pLW44 possui um gene marcador para a proteína fluorescente verde (GFP – *Green fluorescent protein*), o que facilita a seleção dos vírus recombinantes. Esse gene é regulado pelo promotor tardio do vírus

*Vaccinia* p11. A expressão do gene exógeno é controlada pelo promotor forte, mH5. Esse é um promotor modificado do vírus *Vaccinia* do tipo tardio/precoce, que garante a expressão do gene exógeno durante todo o ciclo de multiplicação. Sítios de restrição para as enzimas *Pst*I, *Sma*I e *Sal*I estão presentes (BISHT et al., 2004).

Para a geração dos vetores de transferência propostos, os genes codificadores das proteínas E de DENV1, 2 e 4 foram excisados dos plasmídeos comerciais e respectivamente subclonados no plasmídeo pLW44.

### **5.2.2 Células *E. coli* XL-10 quimiocompetentes**

Células *E. coli* XL-10 competentes foram obtidas através de tratamento com choque térmico e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ). Para tanto, bactérias XL-10 foram incubadas em meio Luria Bertoni (LB) líquido (10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl, pH 7.0) e incubadas durante 16 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após isso, 1 mL da cultura foi transferido para 100 mL de meio LB líquido em um erlenmeyer de 1 L e incubadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir a densidade óptica (D.O.) entre 0,4 e 0,6. Após a determinação da absorbância a 600 nm, a cultura foi transferida para tubos cônicos de 50 mL e incubada no gelo por 15 min. Após o resfriamento, os tubos contendo a cultura foram centrifugados por 15 min, a 4°C, a 3000 rpm e o sobrenadante descartado. O sedimento de cada tubo foi ressuscitado em 25 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{CaCl}_2$  – 1,11 g; HEPES – 0,24 g;  $\text{H}_2\text{O}$  dd - qsp 100 mL; pH 7) gelada e estéril e mantido no gelo por 20 min. Após a incubação, a cultura ressuscitada em solução de  $\text{CaCl}_2$  foi centrifugada por 15 min, a 4°C, a 3000 rpm e o sobrenadante descartado. O sedimento de cada tubo foi ressuscitado em 1 mL de solução de cloreto de cálcio/glicerol ( $\text{CaCl}_2$  – 0,111 g; HEPES – 0,024 g; glicerol 99% - 1,01 mL;  $\text{H}_2\text{O}$  destilado- qsp 10mL). As células competentes foram aliquotadas e armazenadas em freezer -70°C para posterior uso.

### 5.2.3 Transformação de bactérias competentes

Os plasmídeos comerciais contendo DENV1E, DENV2E e DENV4E foram usados para a transformação de bactérias *E. coli* XL-10 a fim de se obter estoque plasmidial dos genes de interesse. Foi realizada uma transformação para cada gene. Assim, 20 ng de cada plasmídeo foram adicionados a 100 µL de bactérias XL-10 quimiocompetentes e imediatamente incubados em banho de gelo por 30 min. Posteriormente, as células foram submetidas a um choque térmico por 2 min a 42°C e novamente incubados em banho de gelo por 2 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de meio SOC (*Phoneutria*®) sem antibiótico (triptona 2g; extrato de levedura 0,5 g; NaCl 0,05 g; KCl 1 mL; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mL; glicose 1 mL). As bactérias foram incubadas por 1 h, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. A cultura bacteriana resultante foi centrifugada por 1 min a 14000 rpm (microcentrífuga Eppendorf 5415C); o sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado em 100 µL de meio LB. A suspensão foi inoculada em placas de Petri contendo LB-ágar (Tryptona 10 g; NaCl 10 g; extrato de levedura 5 g; ágar bacteriológico 15 g) suplementado com ampicilina - 100 µg/mL (SIGMA®). Por vezes, a placa ainda foi suplementada com X-gal (SIGMA®) e IPTG (SIGMA®) no intuito de facilitar a seleção de clones possivelmente positivos (seleção branco-azul, onde: colônias brancas – possivelmente positivas; colônias azuis – possivelmente negativas). As placas foram incubadas por 16–18 h a 37°C em estufa bacteriológica. Paralelamente, foram feitos controles de crescimento de bactérias quimiocompetentes não transformadas, em placas de LB-ágar contendo ou não ampicilina.

### 5.2.4 Produção dos plasmídeos de trabalho em pequena escala

As colônias obtidas nas placas de transformação foram crescidas, individualmente, em 5 mL de meio LB (triptona 10 g; NaCl 10 g; extrato de levedura 5 g) contendo ampicilina, por 16 h, a 37°C sob agitação de 200 rpm. Os plasmídeos foram extraídos pelo Kit Wizard Plus SV *Miniprep* (Promega®), conforme instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria e a integridade verificada por corrida de eletroforese em gel de agarose a 1%.

### 5.2.5 Obtenção dos genes DENV1E, DENV2E, DENV4E

Com o objetivo de excisar os genes de interesse dos plasmídeos pBSK-DENV1E, pEZ-DENV2E, pEZ-DENV4E as amostras obtidas por *Miniprep* foram submetidas à restrição enzimática em duas etapas. Na primeira etapa, foram adicionados, em microtubo, aproximadamente 2000 ng de DNA plasmidial, 1 µL de tampão D (Promega®), 1 µL da enzima *Sal I* (Promega®) e H<sub>2</sub>O nucleasse *free* qsp 10 µL. O *mix* foi incubado por 1 h a 37°C. Na segunda etapa, foram adicionados, ao mesmo tubo, 1 µL de tampão H (Promega®), 1 µL da enzima *Pst I* (Promega®) e H<sub>2</sub>O nucleasse *free* qsp 20 µL. O *mix* foi incubado por mais 1 h a 37°C e em seguida as enzimas foram inativadas por 15 min a 65°C. Concomitantemente, foi realizada, nos mesmos parâmetros já descritos, a restrição enzimática do plasmídeo pLW44 - usado posteriormente para o processo de ligação. O tamanho esperado do inserto liberado após a restrição era de 1274 pb para todos os três plasmídeos.

A verificação do produto da restrição se deu por corrida de eletroforese em gel de agarose a 1%. A purificação do produto da restrição plasmidial do gel de agarose foi realizada pelo *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN®), segundo instruções do fabricante.

### 5.2.6 Desfosforilação plasmidial

O plasmídeo pLW44 vazio usado no processo de ligação passou por uma etapa de desfosforilação plasmidial. Assim, foi adicionado 1 µL da enzima SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Promega®) para cada 1 µg do vetor. O tubo contendo o *mix* foi incubado por 1 h a 37°C e em seguida a enzima foi inativada por 15 min a 65°C. O produto final foi armazenado a -20°C até uso posterior.

### 5.2.7 Ligação do inserto no vetor

Os genes DENV1E, DENV2E, DENV4E previamente excisados dos plasmídeos pBSK e pEZ, respectivamente, foram inseridos, individualmente, em plasmídeos pLW44. Foi utilizada a enzima *T4 ligase* (Promega®), 10

unidades/ $\mu\text{L}$  e 1.000 unidades/ $\mu\text{L}$ , e seu respectivo tampão. A ligação do inserto no vetor foi baseada no seguinte cálculo:

$$ng \text{ do inserto} = \frac{ng \text{ do vetor} \times kb \text{ do inserto}}{kb \text{ do vetor}} \times taxa \text{ molar}$$

A fim de padronizar as condições ótimas de ligação para cada gene foram realizadas ligações com taxas molares 3:1, 5:1 e 10:1 com incubações por 2 h a 37°C. O produto final da ligação foi utilizado para transformação bacteriana. O processo de transformação foi realizado com pLW44 desfosforilado e não desfosforilado. A confirmação da ligação foi realizada através de digestão enzimática de plasmídeos extraídos de colônias possivelmente positivas que cresceram na transformação bacteriana.

#### **5.2.8 Obtenção e verificação dos plasmídeos de transferência**

Para a obtenção dos plasmídeos em pequena escala, as colônias possivelmente positivas obtidas nos processos de transformação bacteriana foram crescidas em 5 mL de meio LB + ampicilina por 16 h a 37°C sob agitação a 200 rpm. As culturas obtidas foram submetidas ao *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN®). O produto obtido foi dosado no *Nanodrop Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) e verificado quanto à presença do inserto por restrição enzimática.

#### **5.2.9 Restrição enzimática**

Foi realizada a restrição padrão com as enzimas *Sal I* e *Pst I*, além de reações complementares para cada construção (Tabela 4).

**Tabela 4: Painel de enzimas de restrição utilizadas para a confirmação da construção dos plasmídeos de transferência e fragmento esperados.**

Construção	Enzimas	Fragmentos esperados
pLW44+ DENV1E	<i>Kpn I + Hind III</i>	3623 + 1307 + 772 + 586
	<i>Xba I + Pvu II</i>	2463 + 1314 + 1243 + 668 + 584 + 117
	<i>Ban HI + Pvu II</i>	2364 + 1905 + 1431 + 590
pLW44+ DENV2E	<i>Hind III</i>	5161 + 1110
	<i>Eco RI + Pst I</i>	3194 + 3077
	<i>Kpn I + Hind III</i>	3625 + 1110 + 772 + 764
	<i>Xba I + Pvu II</i>	2364 + 1954 + 1243 + 668 + 42
pLW44+ DENV4E	<i>Sal + Sac</i>	5241 + 1049
	<i>Eco RI + Pst I</i>	3213 + 3077
	<i>Ban HI + Hind III</i>	4482 + 1808
	<i>Ban HI + Pvu II</i>	2364 + 2021 + 1905
*	<i>Sal I + Pst I</i>	1272 pb + 5018

\*Restrição enzimática realizada para todas as construções. **Fonte:** Tabela autoral.

### 5.2.10 Sequenciamento

Com o objetivo de verificar se as sequências dos plasmídeos pLW44-DENV1E, pLW44-DENV2E, pLW44-DENV4E estavam corretas, as amostras obtidas por *Midiprep* (metodologia descrita no item 5.2.11) foram submetidas ao protocolo de sequenciamento segundo a metodologia utilizada na Rede de Plataformas Tecnológicas do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, subunidade RPT01A, em duplicata. Foram utilizados iniciadores internos e externos específicos para cada gene (Tabela 5) e específicos para pLW-44 (F-AAAGACCCCAACGAGAAG; R-CGCTACACCTTTTCCTCAGAC).

**Tabela 5. Iniciadores utilizados para a verificação do gene E de DENV1, 2 e 4.**

		DENV1E	DENV2E	DENV4E
Externos	F	5'GCGTGGAATAGGCAACA3'	5'TGTCGCTCCTTCAATGACAA3'	5'TGCGTAGGAGTAGGAAACAG3'
	R	5'TGCTTCCTTTCTTGAACCAGC3'	5'TCCGAATGGAGGTTCTGCT3'	5'CCTGAACCAATGGAGTGT3'
Internos	F	5'CTACGGAGCCCTCACATT3'	5'AGGCTATGGCACTGTCAC3'	5'CGGACTATGGAGAACTAACAC3'
	R	5'TGTTTGTGGACAAGCCATGAT3'	5'CAGGTCTAGGAACCATTGCCT3'	5'ATCCCAGCACTGTCACATCC3'

**Fonte:** Tabela autoral.

### 5.2.11 Produção do estoque dos plasmídeos de transferência

As colônias que foram confirmadas para a presença do inserto, por no mínimo três restrições enzimáticas, foram crescidas em 50 mL de meio LB +

ampicilina por 16 h, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida foram purificadas pelo *QIAprep® Spin Midiprep Kit* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. O produto dessa purificação foi submetido a um novo sequenciamento e utilizado, posteriormente, na geração dos vírus recombinantes.

### 5.3 CULTURA DE CÉLULAS

#### 5.3.1 Células BHK-21

As células BHK-21 foram utilizadas na multiplicação e titulação dos MVA selvagens e na seleção e amplificação dos vírus MVA recombinantes.

As células de linhagem contínua BHK-21 (*Baby hamster kidney*) utilizadas nesse estudo foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma®) suplementado (NaHCO<sub>3</sub> a 0,37%, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL], fungizona [250 ng/mL] e soro fetal bovino [SFB - Sigma®] 5-10%) sob incubação a 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O subcultivo dessas células foi realizado quando a confluência dessas atingia entre 90-100%, utilizando-se solução salina tamponada – (*Phosphate buffered saline*) PBS 1X e solução de tripsina/EDTA 0,25%.

#### 5.3.2 Células de fibroblasto de embrião de galinha

O cultivo primário de CEF (*Chicken embryo fibroblasts*) foi utilizado na geração dos vírus MVA recombinantes, na etapa de transfecção, e na multiplicação desses vírus.

Com auxílio de pinça curva e tesoura cirúrgica estéreis, embriões foram coletados de ovos de 10 dias de postura e transferidos para uma placa de Petri contendo DMEM sem adição de SFB. A cabeça, os membros superiores e inferiores e os órgãos internos dos embriões foram removidos; a carcaça dos embriões foi transferida para outra placa de Petri, na qual foi lavada com PBS 1X para limpeza e retirada do sangue. Em seguida, os embriões foram triturados por passagem em uma seringa de 10 mL e incubados em um erlenmeyer contendo cerca de 3 mL de solução de tripsina/EDTA 0,25% (SIGMA-

ALDRICH,®) por embrião. Após a incubação por 15 min, a 37°C, sob agitação, foi adicionado DMEM 10% SFB, para que a ação da tripsina fosse interrompida. Essa suspensão foi filtrada em um béquer com gaze e em seguida foi centrifugada por 10 min, a 2.500 rpm (Jouan BR4i Rotor AB 50.10) e o sobrenadante descartado. O sedimento de células foi suspenso em DMEM 10% SFB e cerca de  $1,5 \times 10^6$  células foram adicionadas às garrafas para cultura celular com área de 150 cm<sup>2</sup>. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera 5% de CO<sub>2</sub> até as células atingirem a confluência de aproximadamente 90-100%.

As células CEF utilizadas nesse estudo foram cultivadas em DMEM suplementado (NaHCO<sub>3</sub> a 0,37%, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL], fungizona [250 ng/mL] e soro fetal bovino [SFB] 5-10%) sob incubação a 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Os subcultivos foram realizados por no máximo 3 vezes e em intervalos de 3 dias.

### **5.3.3 Células C6/36**

Para a multiplicação de DENV e obtenção dos estoques virais foram utilizadas as células C6/36, oriundas de larvas de mosquitos *Aedes albopictus*.

As células foram cultivadas em meio Leibowitz (L-15) suplementado (SFB 5-10%, 100 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 250 nG/mL de anfotericina B). A cultura foi mantida a 28°C em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*). O subcultivo dessas células foi realizado quando a confluência dessas atingia entre 90-100%.

## **5.4 AMOSTRAS DE VÍRUS**

### **5.4.1 Vírus MVA selvagem**

#### **5.4.1.1 Origem**

O MVA selvagem utilizado na geração dos vírus recombinantes e como controle em alguns experimentos foi gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (*Laboratory of Viral Diseases, NIAID, National Institutes of Health - NIH, EUA*),

na passagem número 581. Desde então, esse MVA é rotineiramente multiplicado, purificado e titulado em células CEF ou BHK-21 por alunos do LVBA.

#### 5.4.1.2 Multiplicação

O vírus MVA selvagem foi multiplicado em garrafas de cultura de 150 cm<sup>2</sup> contendo cerca de  $3 \times 10^7$  células de CEF ou BHK-21. As células foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 1, onde a adsorção se deu por 1 hora a 37°C em um volume final de 5 mL de meio DMEM 2,5% SFB. A monocamada de células BHK-21 foi lavada com PBS 1X e acrescentado 25 mL de DMEM 2,5% SFB. A garrafa foi novamente incubada por aproximadamente 48 h, a 37°C, em estufa com atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, a monocamada de células foi raspada com o auxílio de raspadores de silicone e a suspensão celular foi centrifugada por 10 min a 2500 rpm (Jouan BR4i Rotor AB 50.10). O sedimento foi armazenado a -80°C até o momento da purificação viral.

#### 5.4.1.3 Purificação

Para a purificação viral, cerca de 20 garrafas com 150 cm<sup>2</sup>, contendo aproximadamente  $3 \times 10^7$  células de CEF ou BHK-21 foram infectadas com MVA selvagem de acordo com procedimento já descrito (*item 5.4.1.2*). O sedimento obtido foi suspenso em 8 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, homogeneizado e centrifugado por 15 min a 4°C a 2.500 rpm (Jouan BR4i Rotor AB 50.10). O sobrenadante foi coletado e armazenado em banho de gelo. O sedimento, por sua vez, foi suspenso em 10 mL de solução de lise (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl) e mantido em banho de gelo por 10 min. Após esse intervalo, o sedimento foi homogeneizado vigorosamente e, então, centrifugado por 15 min a 4°C a 2.500 rpm (Jouan BR4i Rotor AB 50.10), onde o sobrenadante foi coletado e adicionado ao anterior. As etapas realizadas ao primeiro sedimento foram repetidas com o novo sedimento, no entanto, dessa vez, foram utilizados 8 mL de tampão de lise. Ao juntar todos os sobrenadantes, foi obtido 26 mL de suspensão viral. Essa suspensão viral foi centrifugada em colchão de sacarose

a 36%, por 2 h, a 4°C, a 14.000 rpm (ultracentrífuga Sorvall OTD-Combi rotor AH629). O sobrenadante e a sacarose foram desprezados cuidadosamente e o sedimento, contendo as partículas virais, foi suspenso em 1 mL de 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e armazenado a -80°C para posterior titulação e uso.

#### 5.4.1.4 Titulação

A suspensão viral purificada obtida anteriormente foi, inicialmente, diluída em série em meio DMEM 2,5% SFB, sendo utilizados 500 µL de cada diluição para infectar as respectivas monocamadas de BHK-21 em uma placa para cultura celular de 6 cavidades (~1,5 x 10<sup>6</sup> células/cavidade). Um poço de cada placa foi reservado para o controle de células, onde foi acrescentado 500 µL de DMEM 2,5% SFB. A adsorção foi realizada por homogeneização constante durante 1 hora, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de DMEM 2,5% SFB em cada poço. A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram fixadas por 24 h com uma solução de metanol e acetona (1:1). A solução foi retirada e o poço lavado três vezes com PBS 1X. Após o procedimento, as células foram incubadas por 1 h com o anticorpo anti-VACV (1:5000) e lavadas três vezes com PBS 1X após o tempo de incubação. As células foram reincubadas com o anticorpo secundário (proteína conjugada com peroxidase) em PBS contendo 3% SFB. As células foram lavadas três vezes antes serem coradas. Após 24-48 h os focos fluorescentes foram contados no microscópio de fluorescência (Olympus IX70). O cálculo do título viral foi realizado pela contagem do número de placas virais detectadas multiplicado pelo inverso da diluição.

#### 5.4.2 Vírus MVA-GFP

O vírus MVA-GFP foi construído em nosso laboratório pela Dra. Danielle Soares de Oliveira Daian e Silva (DAIAN E SILVA, 2019). Desde então, o vírus é multiplicado, purificado e titulado em CEF ou BHK-21 rotineiramente, conforme descrito anteriormente. Para a titulação, as placas verdes fluorescentes, devido

à expressão do gene GFP, foram contadas ao microscópio de fluorescência (Olympus IX70) ao invés da realização do ensaio de imunomarcação.

### **5.4.3 Vírus recombinantes**

#### **5.4.3.1 Transfecção de células**

A construção dos vírus recombinantes foi baseada na recombinação homóloga dos vírus MVA selvagens em células infectadas na presença dos plasmídeos de transferência. Assim, placas de 6 cavidades contendo monocamadas de CEF ou BHK-21 com aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/cavidade foram infectadas com o vírus MVA (m.o.i. = 0,5 ou 1), onde uma cavidade da placa foi reservada para controle de células, sendo acrescentados 500  $\mu$ L de DMEM 2,5% SFB, e outra cavidade para controle de vírus, onde a transfecção foi realizada com o plasmídeo pLW44 vazio. A adsorção foi realizada por 1 hora, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas com meio Opti-MEM® I (GIBCO, EUA) e, em seguida, foi realizada a transfecção com os plasmídeos de transferência.

Para esse procedimento, uma solução contendo 2 ou 4  $\mu$ g do plasmídeo de transferência e Opti-MEM (qsp 50  $\mu$ L) foi homogeneizada com uma segunda solução contendo 5  $\mu$ L de lipofetamina (*Lipofectamine* 2000, Invitrogen, EUA) e 45  $\mu$ L de Opti-MEM. Após 30 minutos de incubação, o volume dessa mistura foi ajustado para 1 mL com Opti-MEM e adicionado a cada cavidade da placa. As células cobertas por essa solução foram, então, incubadas por 5 h, a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 5 h. Após esse período, o meio das células foi substituído por 2 mL DMEM 5% SFB em cada cavidade. A placa foi incubada por 48 h, a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo a ocorrência da recombinação homóloga entre o genoma viral e o plasmídeo de transferência. Em seguida, as monocamadas de células foram raspadas com o auxílio de raspadores de silicone e as soluções resultantes foram centrifugadas por 2 min a 2.500 rpm (microcentrífuga Eppendorf 5415R). Os sedimentos foram suspensos com 500  $\mu$ L de DMEM 5% SFB e tal suspensão foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes, para lise das células infectadas e liberação das partículas virais. Finalmente, a suspensão foi

armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior seleção dos vírus recombinantes. Esse ensaio foi repetido com pequenas variações no protocolo a fim de maximizar os resultados.

#### 5.4.3.2 Seleção dos vírus recombinantes

Os vírus recombinantes rMVA-DENV1E, rMVA-DENV2E e rMVA-DENV4E foram selecionados por meio de sucessivos ensaios de purificação de placa. Para cada ensaio, foram realizadas diluições seriadas da suspensão viral que foi obtida anteriormente. Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi utilizado para infectar as respectivas monocamadas de CEF ou BKH-21 em uma placa de 6 cavidades ( $\sim 1,5 \times 10^6$  células/cavidade), sendo uma cavidade da placa reservada para controle de célula. A adsorção foi realizada sob homogeneização constante durante 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$ , em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas com PBS 1X e foi acrescentada uma mistura contendo solução de agarose a 2% e meio MEM 2X (GIBCO®) suplementado com 5% ou 10% de SFB, antibióticos, antifúngico. As placas foram, então, reincubadas por 48-72 h, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em uma atmosfera de  $\text{CO}_2$  5%. Após esse período, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência (Olympus IX70) e as placas com fluorescência verde, devido à expressão do gene para a proteína GFP, foram coletadas com o auxílio de ponteiros e transferidas para microtubos contendo 500  $\mu\text{L}$  de DMEM 5% SFB. Essa suspensão foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes e sonicada por 30 segundos com intervalo em gelo por 30 segundos, para lise das células infectadas e, em seguida, armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para repetição do ensaio. A recorrência do ensaio promove a expansão dos vírus recombinantes por diminuição competitiva do número de partículas virais selvagens.

#### 5.4.3.3 Multiplicação e Purificação

Inicialmente, placas de 12 cavidades contendo aproximadamente  $7,5 \times 10^5$  células CEF ou BHK-21 foram infectadas com vírus rMVA-DENV1E, rMVA-DENV2E e rMVA-DENV4E, separadamente. As células foram infectadas com

100 µL da suspensão viral coletada na última rodada de seleção acrescidas a 100 µL de DMEM 5% SFB e incubadas por 1 h, a 37°C, em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%. Após esse intervalo foi adicionado 800 µL de DMEM 5% SFB, as placas foram reincubadas nas mesmas condições e a fluorescência observada após 48 h. As células foram coletadas, centrifugadas por 1 min a 13.000 rpm em micro centrífuga, os sedimentos foram suspensos com 500 µL de DMEM 5% SFB. A suspensão foi congelada e descongelada em nitrogênio líquido por três vezes e sonicada, para lise das células infectadas e liberação das partículas virais. O ensaio foi repetido até que 70% ou mais da população de células de cada poço estivesse infectada pelo vírus recombinante, ou seja, apresentasse a fluorescência característica do GFP. As células coletadas foram usadas na infecção de placas de seis cavidades.

Assim, placas de 6 cavidades contendo cerca de  $1,5 \times 10^6$  células BHK-21 foram infectadas com vírus recombinantes MVA-DENV1E, MVA-DENV2E e MVA-DENV4E, separadamente. As células foram infectadas com 200 µL da suspensão viral coletada da última amplificação em placa de 12 poços + 200 µL de DMEM 5% SFB e incubadas nas condições já descritas. Após esse intervalo foi adicionado 1.600 µL de DMEM 5% SFB, as placas foram reincubadas nas mesmas condições e a fluorescência observada após 48 h. A monocamada infectada foi coletada e armazenada, como descrito anteriormente. O ensaio foi repetido até que 70% ou mais da população de células de cada poço estivessem infectadas pelo vírus recombinante. O último experimento realizado em triplicata, sendo um poço destinado aos ensaios *Western Blot*, um poço para a extração de DNA e um poço para prosseguir com os ensaios de multiplicação viral.

A multiplicação viral seguiu com a infecção de garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> e 150 cm<sup>2</sup>. Cada garrafa de 150 cm<sup>2</sup> continha cerca de  $30 \times 10^6$  células de CEF ou BHK21. As células foram infectadas com 2 mL de suspensão viral e 2 mL de meio DMEM 5% SFB, onde a adsorção se deu por 1 hora, a 37°C. Decorrido esse intervalo, foi adicionado 10 mL de DMEM 5% SFB e a garrafa foi novamente incubada por 48 h a 37°C em estufa de células com atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, a monocamada de células foi raspada, com o auxílio de raspadores de silicone, e a suspensão celular foi centrifugada por 10 min a 2.500 rpm (Jouan BR4i Rotor AB 50.10). O sedimento foi armazenado a -80 °C até o momento da purificação viral.

A purificação viral ocorreu de acordo com o protocolo descrito anteriormente no tópico 5.4.1.3.

#### 5.4.3.4 Titulação Viral

A suspensão viral purificada obtida anteriormente foi, inicialmente, diluída em série em meio DMEM 2,5% SFB, sendo utilizados 500 µL de cada diluição para infectar as respectivas monocamadas de BHK-21 em uma placa para cultura celular de 6 cavidades ( $\sim 1,5 \times 10^6$  células/cavidade). Um poço de cada placa foi reservado para o controle de células, onde foi acrescentado 500 µL de DMEM 2,5% SFB. A adsorção foi realizada em homogeneização constante durante 1 h, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de DMEM 2,5% em cada cavidade. A placa foi incubada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24-48 h os focos fluorescentes foram contados no microscópio de fluorescência. O cálculo do título viral foi realizado pela contagem do número de placas virais detectadas multiplicado pelo inverso da diluição.

#### 5.4.3.5 Estoque Viral

Para a produção dos estoques de rMVA-DENV1, rMVA-DENV2 e rMVA-DENV4 os vírus purificados foram diluídos a uma m.o.i 0,5 em meio DMEM 2% SFB e utilizados para infecção de células CEF ou BHK-21, que foram cultivadas em garrafas de cultura celular com área de 150 cm<sup>2</sup>. Após a adição do inóculo as células foram incubadas por 1h, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, para favorecer a adsorção viral. Ao conteúdo da garrafa foi adicionado 15 mL de DMEM 5% de SFB. As células foram observadas em um intervalo de 24-48 horas de infecção até o aparecimento da fluorescência característica. O sobrenadante foi descartado, a monocamada foi raspada, lavada com DMEM sem suplementação; o sedimento foi ressuspendido, alíquotado e armazenado a -80°C até o uso.

#### 5.4.4 Confirmação da construção dos vírus recombinantes

##### 5.4.4.1 Extração de DNA

A extração do DNA viral seguiu a metodologia proposta por Sambrook e Russell (1989). O DNA total das amostras foi extraído utilizando uma solução de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (PCI), na proporção de 25:24:1, respectivamente. Para tanto, 100 µl de cada amostra processada foi previamente incubado por 1 h, a 75°C, para favorecer a desnaturação do capsídeo viral e, conseqüente liberação do material genético. Após, foram acrescentados 300 µl de PBS e mais 400 µl da solução de PCI. Essa mistura foi então agitada no vórtex, por aproximadamente 10 segundos e centrifugada, por 1 min, a 13000 rpm em micro centrífuga. Após a centrifugação e aguardados mais 10 min, a fase superior foi cuidadosamente coletada, medida, com o auxílio de uma micropipeta e transferida para um novo microtubo. Para a precipitação do material genético foi adicionado 2,5 vezes o volume coletado do sobrenadante de etanol absoluto (96%) gelado e 0,1 vezes o volume coletado do sobrenadante de acetato de sódio pH 5,5 a 3M. Em seguida, essa mistura foi homogeneizada, invertendo o microtubo cinco vezes, e centrifugada por 5 min, a 4°C, a 13000 rpm. Logo após, o sobrenadante foi descartado por inversão e o tubo foi mantido aberto, em estufa, para evaporar o restante do etanol. O sedimento gerado, foi então ressuscitado com 50µL de água estéril aquecida à 37°C e a qualidade e concentração de DNA foi então dosada em *Nanodrop Spectrophotometer* (*Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*).

##### 5.4.4.2 Sequenciamento nucleotídico dos vírus recombinantes

O DNA extraído dos vírus recombinantes foi submetido ao sequenciamento nucleotídico usando os iniciadores descritos na tabela 3. O sequenciamento das amostras foi realizado na Rede de Plataformas Tecnológicas do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, subunidade RPT01A de acordo com protocolo já descrito (5.2.10).

#### 5.4.4.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Com o objetivo de confirmar a presença do gene da proteína E nos vírus recombinantes, as amostras de DNA extraídas foram submetidas à amplificação da região alvo por iniciadores específicos para DENV1, DENV2 ou DENV4 (Tabela 5). Inicialmente, para cada reação foram utilizados: 2 µL de tampão 10X; 0,25 µL de enzima Taq DNA polimerase; 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL de cada iniciador (senso e anti-senso); 0,4 µL de dNTP; entre 20 e 200 ng de DNA; H<sub>2</sub>O *nuclease free* qsp (quantidade suficiente para) 20 µL. As reações ocorreram em termociclador seguindo a ciclagem: desnaturação inicial - 95°C por 5 min; desnaturação - 95°C por 1 min, anelamento - 55°C por 30 seg, extensão - 72°C por 2 min (30 vezes); extensão final - 72°C 10 min. O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

#### 5.4.4.4 Avaliação da expressão da proteína E pelos vírus recombinantes por citometria de fluxo

Células BHK-21 foram infectadas com os vírus recombinantes, m.o.i. 1, por 48h. Após o período de infecção, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS 1x. A monocamada foi raspada e ressuspendida em DMEM 2,5% SFB. As células foram coletadas e o volume centrifugado por 5 min à 1500 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 1mL de DMEM 2,5% SFB. Em uma placa de 96 cavidades foi adicionado 4x10<sup>4</sup> células/poço e em seguida 20 uL de Brefeldina A (50ug/mL/poço); as células foram incubadas por 3h. Em seguida, a placa foi centrifugada por 3 min à 2100 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado o anticorpo primário (anticorpos monoclonais de camundongos contra *Dengue virus* 1+2+3+4, ab9202, Abcam®), ao passo que a placa foi incubada novamente por 30 min a 37°C. O anticorpo ab9202 foi utilizado na diluição 1:2000.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS *wash* e em seguida incubadas por 30 min a 37°C com o anticorpo secundário (anti-mouse IgG TRITC - Sigma). O anticorpo secundário foi utilizado na diluição 1:100. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS *wash* e ressuspensas em 50 uL de paraformaldeído 1%, com incubação de 20

minutos. Após sucessivas lavagens, as células foram transferidas para tubos de citometria e lidas em citômetro de fluxo FACS.

#### **5.4.5 Obtenção das amostras de DENV**

##### 5.4.5.1 Origem

A amostra de DENV1 Mochizuki é adaptada e foi isolada durante uma epidemia de dengue no Japão, em 1943, por passagens em cérebro de camundongos (HOTTA, 1952). A amostra DENV3 MG20 foi isolada no ano de 2004 no estado de Minas Gerais do soro de um paciente com FHD. Esta amostra é capaz de induzir uma infecção virulenta com envolvimento do sistema nervoso central em modelo murino, resultando em morte de camundongos imunocompetentes sem a necessidade de adaptação ao hospedeiro. Ambas as amostras são bem caracterizadas para uso em pesquisa laboratoriais e foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Erna G Kroon (Depto. De Microbiologia, ICB/UFMG) (DE SOUZA et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2008). A amostra a ser futuramente usada para proteção contra DENV2 é a amostra New Guinea C (MOORE et al., 2017). Já a amostra para testes contra infecções pelo DENV4 depende da obtenção de uma amostra neuro-adaptada ao hospedeiro murino. Esta adaptação encontra-se em andamento e é tema da tese de Doutorado da Doutoranda Raíssa P. Rocha, aluna do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG.

##### 5.4.5.2 Estoque

Para a produção dos estoques de DENV, os vírus foram diluídos a uma m.o.i de 0,01 em meio Leibowitz L-15 (Cultilab, Brasil) suplementado (SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 250 ng/mL de anfotericina B [Sigma-Aldrich, EUA]) e utilizados para infecção de células C6/36 que foram cultivadas em garrafas de cultura celular com área de 150 cm<sup>2</sup>. Após a adição do inóculo as células foram incubadas por 1 h, à temperatura ambiente, para favorecer a adsorção viral. O conteúdo da garrafa foi descartado e adicionou-se 20 mL de meio L-15 2% SFB. As células foram observadas em um intervalo de

5-7 dias de infecção (dependendo do sorotipo viral) até o desenvolvimento do efeito citopático característico de DENV em células C6/36 (formação de sincícios). O sobrenadante foi coletado, clarificado por centrifugação por 15 min, a 3000 rpm (Eppendorf 5810R, Alemanha), aliquoteado e armazenado a -80°C até o uso.

#### 5.4.5.3 Titulação

A suspensão viral clarificada obtida anteriormente foi, inicialmente, diluída em série em meio DMEM 2,5% SFB, sendo utilizados 500 µL de cada diluição para infectar as respectivas monocamadas de BHK-21 em uma placa para cultura celular de 6 cavidades ( $\sim 1,5 \times 10^6$  células/cavidade). Um poço de cada placa foi reservado para o controle de células, onde foi acrescentado 500 µL de DMEM 2,5% SFB. A adsorção foi realizada em homogeneização constante durante 1 h, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as diluições foram descartadas e adicionou-se 2 mL de meio DMEM 2% SFB contendo 1,6% de CarboximetilCelulose (Synth, Brasil). A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em um intervalo de 5 a 7 dias, dependendo do sorotipo viral. Posteriormente, o meio foi removido e as placas foram fixadas com Solução PBS-Formaldeído a 10% por 3-24 h, lavadas e coradas com Solução de Cristal Violeta 1% por 1 h. O cálculo do título viral foi realizado pelo número de placas virais detectadas multiplicados pelo inverso da diluição.

## 5.5 CAMUNDONGOS

Camundongos C57/BL6 fêmeas de 8 a 10 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central (UFMG). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo CEUA – UFMG (protocolo nº 317/2018 – anexo 4) e realizado de acordo com as regulamentações do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DAS DOSES LETAIS

A dose letal utilizada em experimentos de desafio é configurada pela dose que induz óbito em 100% dos animais no grupo não imunizado. No entanto, é necessário levar em consideração que doses muito elevadas podem acabar mascarando a eficiência do imunógeno, levando a obtenção de resultados inferiores aos esperados. Dessa forma, é necessário que haja um experimento de curva de dose letal, onde várias concentrações do vírus são testadas.

Para a amostra de DENV1 foram testadas as doses  $2,5 \times 10^1$ ,  $2,5 \times 10^{1,5}$ ,  $2,5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$  e  $5 \times 10^3$  pfu (*plaque forming unit* - unidades formadoras de placa) de vírus. A amostra de DENV3 foi avaliada nas doses  $2 \times 10^3$ ,  $1,5 \times 10^3$  e  $1 \times 10^3$  pfu. Todas as doses testadas foram baseadas em dados já descritos na literatura ou em resultados obtidos previamente em nosso grupo de pesquisa. Assim, 6 camundongos C57BL/6 fêmeas com 14 a 16 semanas foram anestesiados pela via intraperitoneal com uma solução de Ketamina (100 mg/Kg), Xilasina (10 mg/Kg) e PBS. Esses animais foram posteriormente inoculados pela via intracranial, com as amostras de DENV em diferentes doses diluídas em 20  $\mu$ L de PBS 1X estéril, por animal. Como controle da infecção, animais foram inoculados via intracranial com 20  $\mu$ L PBS 1X. Os animais foram monitorados diariamente em até 21 dias após a infecção para a obtenção das curvas de sobrevivência.

## 5.7 ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

As vacinas foram testadas em esquema dose-reforço homólogo. Camundongos C57BL/6 fêmeas de 8-10 semanas de idade foram mantidas com livre acesso a alimento e água. Após uma semana de ambientação em gaiolas no biotério, os camundongos foram imunizados via intradérmica na orelha, com intervalo de 28 dias entre as doses (QUINAN et al, 2014). As doses foram compostas por  $1 \times 10^7$  ou  $1 \times 10^8$  pfu de rMVA-DENV1. Foram incluídos grupos vacinados apenas com o vetor vazio (sem a sequência do DENV), controles negativos de infecção (inoculados apenas com PBS), além de um grupo controle positivo, inoculado com a vacina rMVA-DENV3, testada em experimentos

anteriores (QUINAN et al., 2016). Os grupos vacinais utilizados estão esquematizados na Tabela 6.

**Tabela 6. Esquema de imunização dose-reforço homólogo para a vacina rMVA-DENV1.**

GRUPO (N=7)	GRUPO	DOSE (D0)	REFORÇO (D28)
1	MOCK	PBS 1X	PBS 1X
2	PBS	PBS 1X	PBS 1X
3	MVA-GFP	MVA-GFP	MVA-GFP
4	rMVA-DENV1	rMVA-DENV1	rMVA-DENV1
5	rMVA-DENV3	rMVA-DENV3	rMVA-DENV3

Desenho dos grupos experimentais. Intervalo de 28 dias entre dose e reforço. **Fonte:** Tabela autoral.

## 5.8 DESAFIO

Os camundongos imunizados foram desafiados com o DENV respectivo à vacina em teste (Tabela 7). Desta forma, após 21 dias da segunda dose do imunógeno, os camundongos foram infectados, pela via intracranial, com doses letais determinadas no item 5.6. Após o procedimento, os camundongos foram observados diariamente em relação ao surgimento de sinais da infecção ou óbito. Os animais que perderam 15% de seu peso inicial em um intervalo de 48h ou apresentaram paralisia parcial ou total foram eutanasiados de acordo com as indicações do CEUA. A partir destes dados foram geradas as curvas de sobrevivência. Os dados de sobrevivência foram analisados pelo teste Mantel-Cox e seguido pelo método Gehan-Breslow-Wilcoxon e os dados de peso pelo Two-ways ANOVA, através do software GraphPad Prism 6.01.

**Tabela 7. Esquema de desafio intracranial dos grupos imunizados com as vacinas recombinantes.**

GRUPO (N=7)	GRUPO	DESAFIO
1	MOCK	PBS 1X
2	PBS	DENV1
3	MVA-GFP	DENV1
4	rMVA-DENV1	DENV1
5	rMVA-DENV3	DENV3

Desafio intracranial realizado após 21 dias do reforço. **Fonte:** Tabela autoral.

## 5.9 SHIRPA

O protocolo SHIRPA foi utilizado para análise comportamental e avaliação funcional de doenças neurológicas. Os parâmetros avaliados foram reunidos em 5 categorias: força e tônus muscular, comportamento motor, estado neuropsiquiátrico, função autônoma e função e reflexo sensorial (Tabela 8). Os animais foram avaliados em um intervalo de dois dias para cada análise. Análises estatísticas foram feitas através do software *GraphPad Prism* 6.01 pelo teste Two-way ANOVA (LACKNER et al., 2006; ROGERS et al., 2001). No Anexo 5 encontram-se as planilhas contendo os parâmetros avaliados e seus respectivos *scores*.

SHIRPA é um protocolo de três estágios projetado como uma série de testes individuais que em si fornecem dados quantitativos sobre um desempenho individual. Esse desempenho específico do teste é diretamente comparável entre animais, ao longo do tempo e entre grupos. Além disso, os testes também oferecem a oportunidade de definir anormalidades ou variações no animal, com cada teste fornecendo informações sobre o padrão de função de um sistema particular, por exemplo, o cérebro e o sistema neuromuscular. O agrupamento e análise dos dados de todos os testes podem ser somados para dar um perfil de função, ou *score*.

**Tabela 8. Parâmetros avaliados pelo protocolo SHIRPA.**

<b>Categorias</b>	<b>Parâmetros avaliados</b>
Força e tônus muscular	Força ao agarrar, peso corporal, tônus dos membros, tônus abdominal
Comportamento motor	Posição corporal, tremor, atividade locomotora, elevação pélvica, ambulação, elevação da cauda, encurvamento de tronco, segurar as patas, manobra no arame, geotaxis negativa
Estado neuropsiquiátrico	Atividade espontânea, excitação de transferência, escape ao toque, passividade posicional, mordida provocada, medo, irritabilidade, agressão, vocalização
Função autônoma	Taxa de respiração, defecação, micção, reflexo corneal, piloereção, cor da pele, batimentos cardíacos, lacrimejação, salivação
Função e reflexo sensorial	Escape ao toque, posicionamento visual, pina reflexo, reflexo corneal, beliscada nos dedos, reflexo postural.

**Fonte:** Baseado em LACKNER et al., 2006.

## 5.10 COLETA E PROCESSAMENTO DE ÓRGÃOS

O sangue coletado foi incubado por 30 min a 37°C e centrifugado por 5 min a 1500 rpm. O soro coletado foi armazenado a -80°C para testes da análise da função hepática e avaliação da presença de anticorpos neutralizantes contra DENV1. Os cérebros foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior análise da carga viral de DENV1 por titulação. Os baços coletados foram macerados com o auxílio de lâminas de borda fosca e centrifugados por 5 min a 1500 rpm a 4°C. O sedimento celular foi ressuscitado em tampão de lise, lavado com PBS e armazenados a -80°C para posterior análise da resposta imune. Os fígados foram coletados e armazenados em solução de formol até análise histopatológica.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 GENES DA PROTEÍNA E

Foram obtidas junto ao banco de sequências gênicas do NCBI 65 sequências de amostras para DENV1, 98 sequências de amostras para DENV2 e 48 sequências de amostras para DENV4. Foram consideradas amostras depositadas na base de dados correspondentes ao genoma total desses três sorotipos do vírus da dengue isolados na América Latina entre os anos de 2005 e 2014. As sequências de cada sorotipo foram alinhadas; a região correspondente à proteína E foi selecionada e a porção transmembrana de cada uma foi removida. A sequência consenso da proteína E de cada vírus, gerada com base nessas amostras, foi ainda otimizada e o produto final foi uma sequência de 1274 pb. As figuras 17, 18 e 19 mostram as sequências consenso otimizadas de DENV1, DENV2 e DENV 4, respectivamente.

**A** AAA**GTTCGACACCATG**GGATCATTTTCATCTTGCTGATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGAATAGGCAA  
 CAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAACGTGGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCT**TC**GATGGCA  
 AAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACCTTTGAAGACGGAGTCCAGAACCCCTGCCGTCTTGCCGAAACTGTGCATTGAAGCT  
 AAAATATCAAAACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGAAGAACAAGACGCGAACTTTGT  
 GTGTGCCGGAAGCTTTGGACAGAGGCTGGGTAATGGCTGCGGACTATTCGGAAAGGGAAGTCTATTGACGTGTGCCAAG  
 TTCAAGTGTGTGACAAAAGTGAAGGAAAGATGTTCAATATGAAAACCTAAAATATTCAGTGATGCTACTGTCCACTGGGG  
 ACCAGCACCAGGTGGGAAACGAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCTACGTCGGAAATACAG  
 CTGACCGACTACGGAGCCCTCACATTGGACTGCTCACCTAGAACAGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGTATTGACAAATGAA  
 AGAAAAATCATGGCTTGCCACAAACATGGTTTCTAGACTTACCCTGCCATGGACTTCGGGGGCTTCAACATCCCAAGAGAC  
 CTGGAACAGACAAGATTTGCTGGTCACATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAAACAGGAAGTAGTCGACTGGGATCACAGGAAG  
 GAGCAATGCACACTGCGTTGACTGGGGCGACAGAAATCCAGACGTCCAGAACGACAACAATCTTCGAGGACACCTGAAATGC  
 AGACTAAAAATGGATAAACTGACTTTAAAGGGGATGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCATTTAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCT  
 GAGACCCAGCATGGAAGTCTTAGTGCAGGTCAAATACGAAGGAACAGACGCGCCATGCAAGATCCCCTTCTCGACCCAAGA  
 TGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCCAATCCCATAGTTACTGACAAAAGAAAACCAAGTCAACATTGAGAC  
 AGAACACCTTTTGGTGTGAGAGCTACATCGTGGTAGGGGACAGCGAAAAGCTTTGAACTAAGCTGTTCAAGAAGGAAGCA  
 GC**TAA**GGAAAAATGTT**TTTTTATCTGCAG**AAA

**B** AAA**GTTCGACACCATG**CCCTTGATTTTCATCTTACTGACAGCTGTCGCTCCTTCAATGACAATGCGCTGCATAGGAATATCAATA  
 GAGACTTCGTAGAAGGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATCGTCTTAGAACATGGAAGTTGTGTGACG**TC**ATGGCAAAA  
 AACAAACCAACATTGGATTTTGAAGTATAAAAACAGAAGCCAAACAACTGCCACTTAAGGAAGTACTGTATAGAAGCAAAG  
 CTGACCAACACAACAACAGAATCGGTTGCCCAACACAA**GGGGA**ACCAGTCTAAATGAAGAGCAGGACAAAAGTTTCATCTG  
 CAAACACTCCATGGTAGACAGAGGATGGGAAATGGATGTGGATTATTTGAAAGGGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTTA  
 CATGCAAAAAGAACATGGAAGGAAAAGTCGTGCAGCCAGAAAATTTGGAATACACCATCGTGATAACACCTCACTCAGGAGAAG  
 AGCACGCTGTAGGTAATGACACAGGAAAGCATGGCAAGGAAATCAAATAACACCACAGAGTCCATCACAGAAAGCAGAAGTGC  
 ACAGGCTATGGCACTGCACGTGGAGTGTCTCCGAGAACGGGCTCGACTTCAATGAGATGGTGTCTCCAGATGGAAAG  
 ACAAGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCTAGACCTGCCGTTACCATGGCTACCCGGAGCGGACACACAAGGATCAAAAT  
 TGGATACAGAAAGAGACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCACGCGAAGAAACAGGATGTCGTTGTCTTAGGGTCTCAAGAGGG  
 GCCATGCACACGGCACTCACAGGGGCCACAGAAATCCAGATGTCATCAGGAAACTTACTGTTACAGGACATCTCAAGTGCAG  
 GCTGAGAATGGACAACTACAGCTCAAAGGAATGTCATACTCTATGTGTACAGGAAAGTTTAAAATTTGTGAAGGAAATAGCAGA  
 AACACAACATGGAACAATAGTTTACAGAGTACAATATGAAGGGGACGGTTCTCCATGTAAGATCCCTTTTGAAGATAACAGATTTG  
 GAAAAAGACACGCTTAGGTCGCTGATTACAGTTAACCCAATCGTAACAGAAAAGATAGCCAGTCAACATAGAAGCAGAA  
 CCTCCATTCCGAGACAGCTACATCATCGTAGGAGTAGAGCCGGGACAACCTGAACTCAATTGGTTTAAAGAGGGAAGTTC**TAA**  
 GCCAAATGTT**TTTTTATCTGCAG**AAA

**C** AAA**GTTCGACACCATG**ACTGTCTTCTTTGCTTAATGATGCTGGTGCCTCCATCCTACGGAATGCGATGCGTAGGAGTAGGAAAC  
 AGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGGAGCATGGGTGGACCTGGTGTAGAACATGGAGGATGCGTCACAT**TC**BATGGCCC  
 AGGAAAAACCAACTTGGATTTTGAAGTACCAAGACACAGCAAGGAAGTGGCTCTGTTAAGAACCTATTGCCATTGAAGCCT  
 CAATATCAAACATAACTACGGCAACAAGATGTCCAACGCAAGGACGCTTATCTGAAAGAGGAACAGGACACACAGTACATCT  
 GCCGGAGAGATGTGGTAGATAGAGGATGGGGCAATGGCTGTGGCTTGTGGAAAAGGAGGAGTTGTGACATGTGCGAAGTT  
 CTCATGTTCCGGGAAGATAACAGGCAATCTGGTCCAAATGAGAACCTTGAATACACAGTGGTTGTGACAGTCCACAATGGAGA  
 CACCCATGCAGTAGGAAATGACACATCCAATCATGGAGTTACAGCCACGATAACTCCCAGGTACCATCGGTTGAAGTCAAAC  
 GCCGCAACTATGGAGAACTAACACTCGATTGTGAACCCAGTCTGGAATTGACTTCAATGAGATGATCCTAATGAAAATGAAAA  
 GAAAACATGGCTCGTGCATAAGCAATGGTTTTTGGATCTGCCTCTCCATGGACAACAGGAGCAGACACATCAGAGGTTCACTG  
 GAATTACAAAGAGAGAATGGTGCATTCAAGGTTCCCTCATGCCAAGAGACAGGATGTGACAGTGTGGGATCTCAGGAAGGAG  
 CCATGCATTCTGCCCTCGCTGGAGCCACAGAAGTGGACTCCGGTGTGAAACACATGTTTGCAGGACATCTCAAGTGCAAA  
 GTCCGTATGGAGAAATGAGAATCAAGGGAATGTCATACAGATGTGTTCCAGGAAAGTTTCAATTGACAAGAGATGGCAGAA  
 ACACAGCATGGGACAACAGTGGTGAAGTCAAGTATGAAGGTGCTGGAGCTCCGTGTAAGTCCCCATAGAGATAAGAGATGT  
 AAACAAGGAAAAGTGGTTGGGCGCTTATCTCAGCCACCCCTTTGGCTGAGAATACCAACAGTGTAAACACATAGAATTAGA  
 ACCCCCTTTGGGGACAGCTACATAGTATGATAGTGTGGAAACAGCGCACTAACACTCCATTGGTTTCAAGAAAGGAGTTC**T**  
**AA**GCAAGATGTT**TTTTTATCTGCAG**AAA

**Figura 17. Sequências consenso otimizadas do gene E de DENV.** A) DENV1; B) DENV2; C) DENV4. Na porção 5' foram adicionados: adeninas iniciais (AAA) para permitir a restrição com Sal I; sítio para **SmaI** na posição -9 (em relação ao **ATG** inicial). Sequência consenso **Kozak** **Mutações** para deleção da sequência de Kozak interna. Na porção 3' foram adicionados: Códon de terminação (**TAA**) extra; Sequência espaçadora **AGAGGTGCAA**; **Motivo de terminação** de transcrição precoce de VV; sítio para **PstI**.

## 6.2 PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA

A construção dos plasmídeos de transferência e início da seleção e multiplicação dos vírus recombinantes foram realizados no laboratório de Imunologia de Doenças Virais – IDV/FIOCRUZ Minas, com a colaboração do pesquisador Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado.

Foi realizada uma transformação bacteriana de XL-10 quimiocompetente com o produto da ligação pLW44 + DENV1E/ -DENV2E/ -DENV4E, individualmente (figura 18). A ligação foi realizada com o vetor desfosforilado, a enzima T4 Ligase 1.000 unidades/ $\mu$ L e na transformação bacteriana foi utilizado o meio SOC. Da população obtida, foram selecionadas aleatoriamente colônias que possivelmente continham o inserto de DENV1E, DENV2E e DENV4E. As colônias escolhidas foram triadas inicialmente por digestão enzimática.

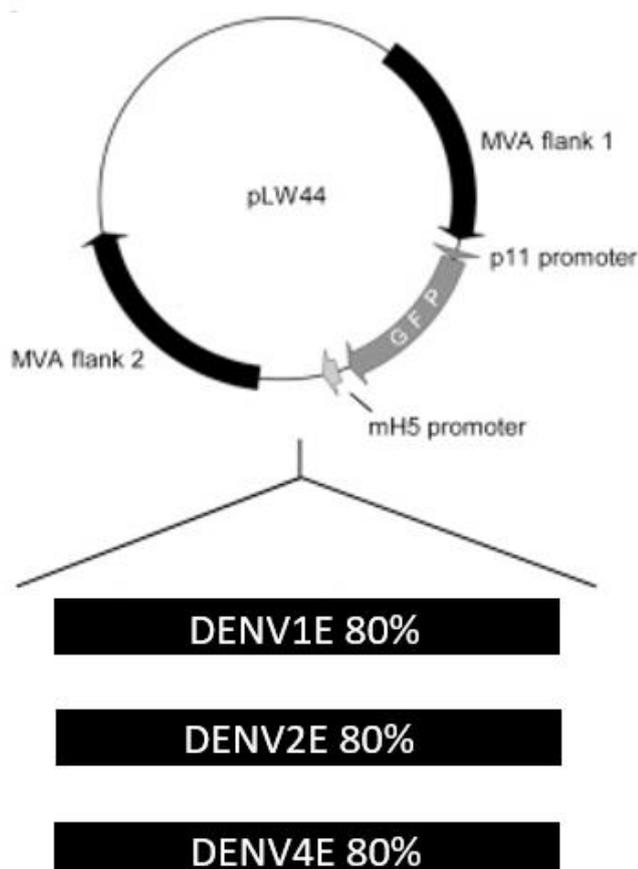
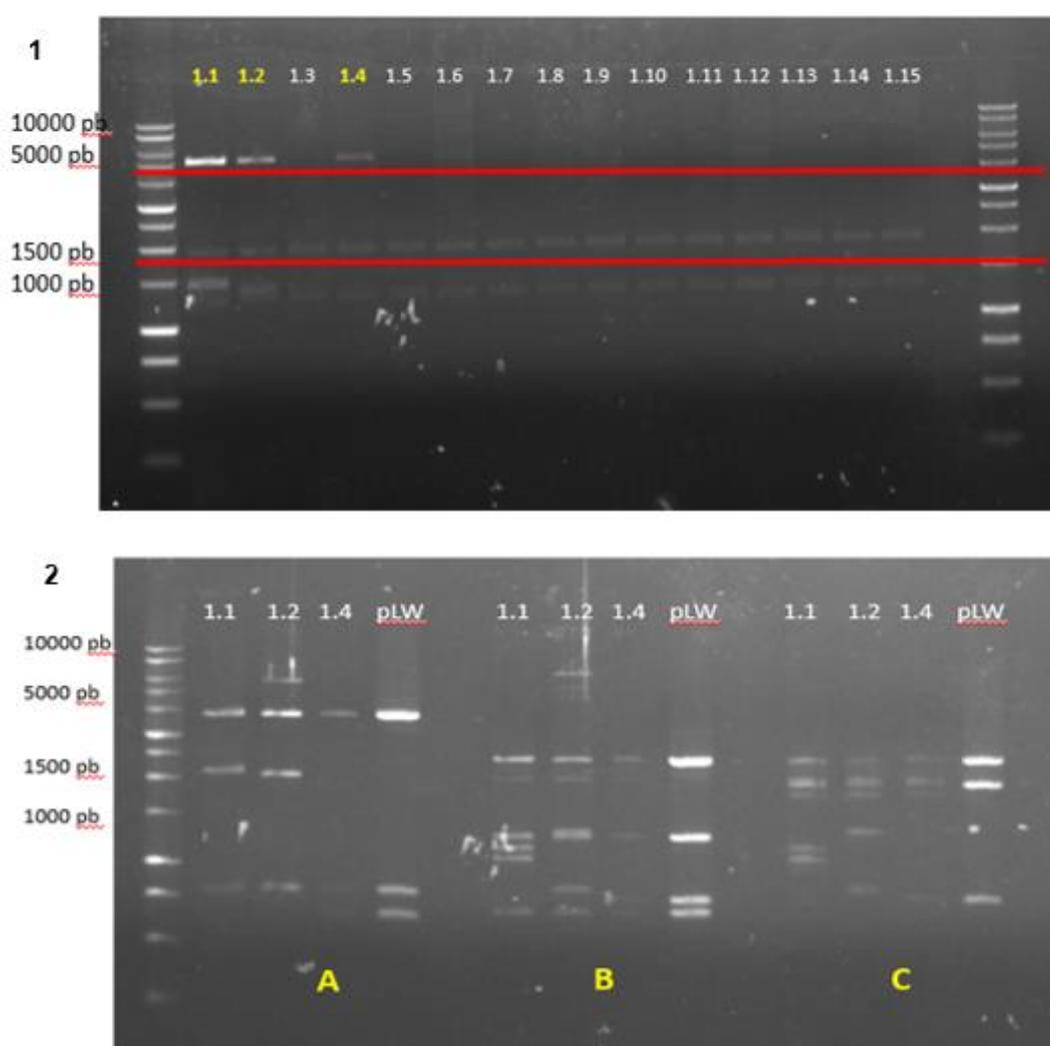


Figura 18. Desenho esquemático dos plasmídeos de transferência pLW44 contendo os genes E de DENV1, 2 e 4.

## 6.2.1 pLW44-DENV1

Foram escolhidas 15 colônias possivelmente positivas oriundas da ligação pLW44-DENV1. A primeira etapa de verificação da construção dos plasmídeos de transferência foi a restrição enzimática com as enzimas *Sal I* e *Pst I* (Figura 19.1). As colônias que apresentaram o perfil de restrição de acordo com o esperado foram verificadas, ainda, por digestões enzimáticas complementares de acordo com as reações descritas na Tabela 4.



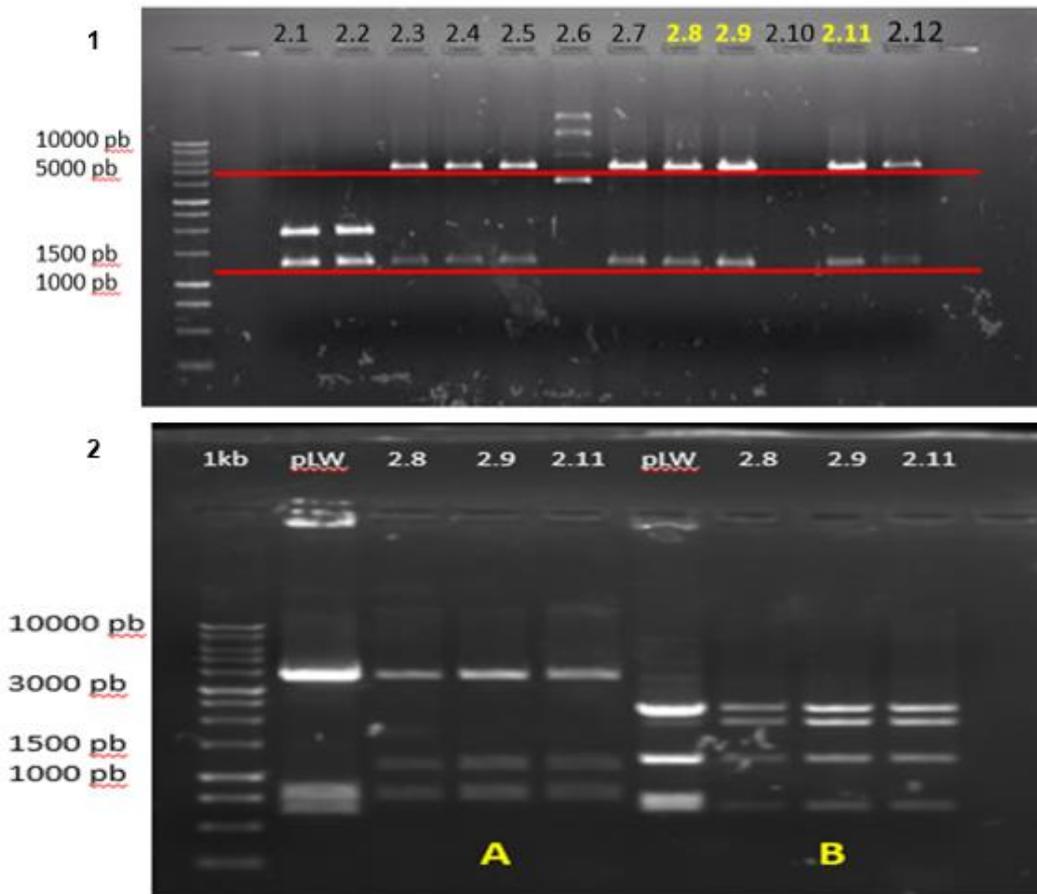
**Figura 19. Digestão enzimática dos fragmentos da proteína E de pLW44-DENV1. 1.** Digestão utilizando as enzimas de restrição *Sal I* e *Pst I*. Fragmentos esperados para amostras positivas: 1.272 pb + 5024 pb (indicados pelas linhas em vermelho). **2.** Digestão utilizando enzimas de restrição complementares. **A)** Enzimas *Kpn I* + *Hind III*; **B)** Enzimas *Xba I* + *Pvu II*; **C)** Enzimas *Bam HI* + *Pvu II*.

As colônias 1.1, 1.2 e 1.4 (destacadas em amarelo na figura 19.1) foram escolhidas para dar seguimento aos demais testes confirmatórios devido ao perfil de restrição encontrado utilizando as enzimas *Sal I* e *Pst I* estar dentro do esperado (1.272 pb + 5024 pb).

Na verificação da construção pelas digestões complementares (Figura 19.2), apenas a colônia 1.1 que apresentou o perfil de restrição dentro do esperado, sendo: A) Restrição com as enzimas *Kpn I* + *Hind III*: 3623pb + 1307pb + 772pb + 586pb; B) Restrição com as enzimas *Xba I* + *Pvu II*: 2463pb + 1314pb + 1243pb + 668pb + 584pb + 117pb; C) Restrição com as enzimas *Bam HI* + *Pvu II*: 2364pb + 1905pb + 1431pb + 590pb.

### **6.2.2 pLW44-DENV2**

Foram escolhidas 12 colônias possivelmente positivas oriundas da ligação pLW44-DENV2. Dessas, 8 colônias apresentaram o perfil de restrição esperado utilizando as enzimas *Sal I* e *Pst I* - 1.272 pb + 5024 pb (Figura 20.1).



**Figura 20. Digestão enzimática dos fragmentos da proteína E de pLW44-DENV2.** 1. Digestão utilizando as enzimas de restrição *Sal I* e *Pst I*. Fragmentos esperados para amostras positivas: 1.272 pb + 5024 pb (indicados pelas linhas em vermelho). 2. Digestão utilizando enzimas de restrição complementares. **A)** Enzimas *Kpn I* + *Hind III*; **B)** Enzimas *Xba I* + *Pvu II*.

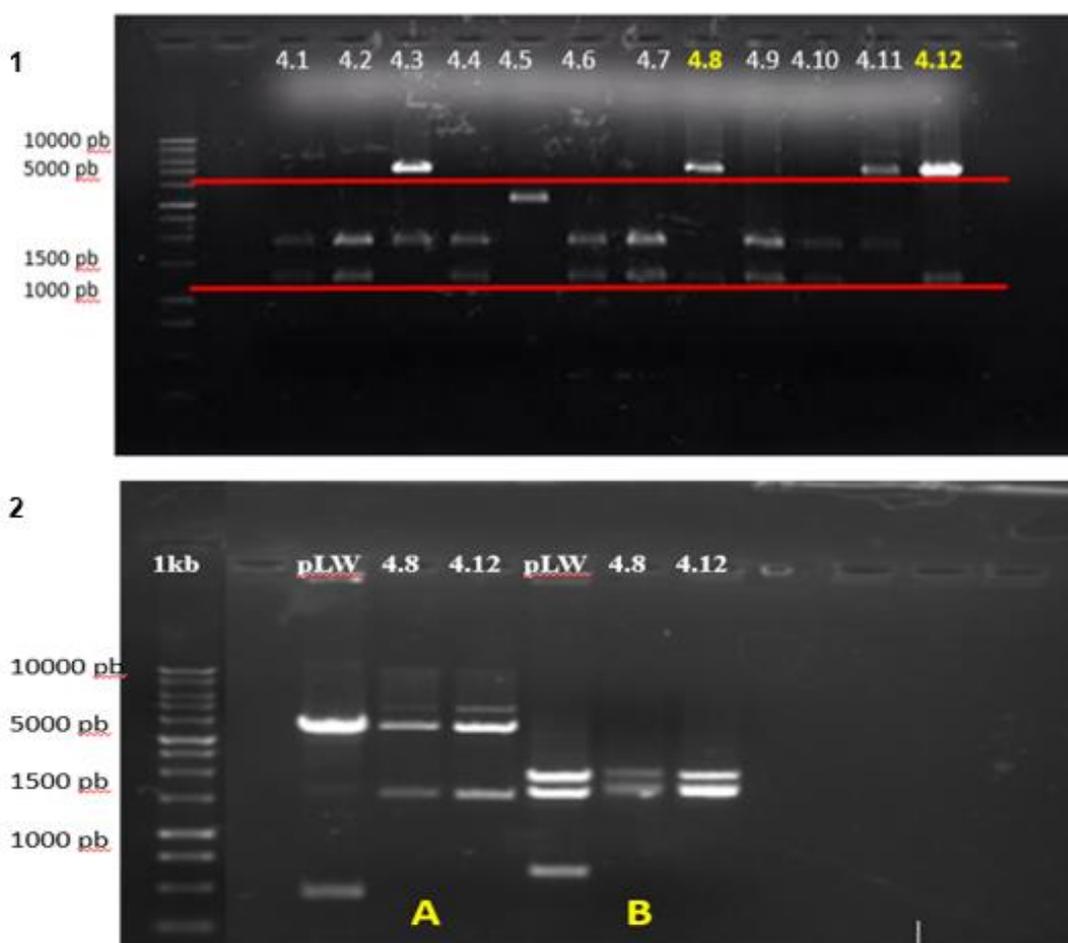
As colônias 2.8, 2.9 e 2.11 (destacadas em amarelo na figura 20.1) foram escolhidas aleatoriamente para dar seguimento aos demais testes confirmatórios.

Na verificação da construção pelas digestões complementares, as colônias apresentaram o perfil de restrição esperado (Figura 20.2), sendo: A) Restrição com as enzimas *Kpn I* + *Hind III*: 3625 pb + 1110 pb + 772 pb + 764 pb; B) Restrição com as enzimas *Xba I* + *Pvu II*: 2364 pb + 1954 pb + 1243 pb + 668 pb + 42 pb.

Como todas as amostras foram positivas por três restrições enzimáticas, escolheu-se aleatoriamente as colônias 2.9 e 2.11 para a continuidade dos experimentos.

### 6.2.3 pLW44-DENV4

Das 12 colônias escolhidas da ligação pLW44+DENV4, duas (destacadas em amarelo da figura) foram positivas para a presença do inserto de acordo com a restrição enzimática com *Sal I* e *Pst I* (Figura 21.1).



**Figura 21. Digestão enzimática dos fragmentos da proteína E de pLW44-DENV4.** 1. Digestão utilizando as enzimas de restrição *Sal I* e *Pst I*. Fragmentos esperados para amostras positivas: 1.272 pb + 5024 pb (indicados pelas linhas em vermelho). 2. Digestão utilizando enzimas de restrição complementares. **A)** Enzimas *Ban HI* + *Hind III*; **B)** Enzimas *Ban HI* + *Pvu II*.

As colônias 4.8 e 4.12 foram testadas por restrições complementares (Figura 21.2) e apresentaram o perfil de restrição esperado, sendo: A) Restrição com as enzimas *Ban HI* + *Hind III*: 4482pb + 1808pb; B) Restrição com as enzimas *Ban HI* + *Pvu II*: 2364 + 2021 + 1905.

Ao todo, foram construídos cinco plasmídeos de transferência, sendo dois pLW44-DENV2E, dois pLW44-DENV4E e um pLW44-DENV1E. Todas as construções obtidas foram sequenciadas e o resultado do sequenciamento dos

plasmídeos recombinantes aponta que as construções são idênticas às respectivas sequências depositadas no *GenBank*.

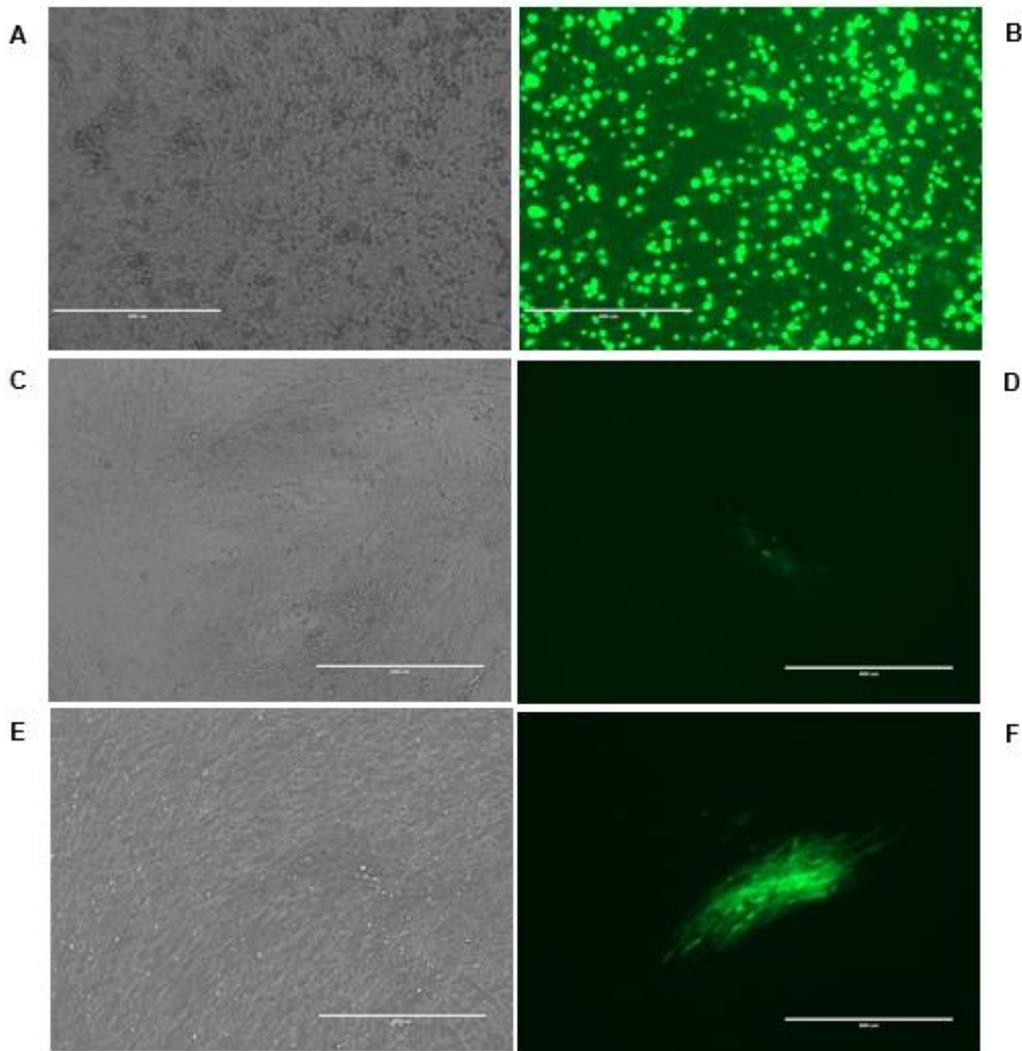
Os plasmídeos de transferência pLW44-DENV1 (colônia 2), pLW44-DENV2 (colônia 9) e pLW44-DENV4 (colônia 8) foram escolhidos para dar seguimento na construção dos vírus recombinantes.

### 6.3 VÍRUS RECOMBINANTES

#### 6.3.1 rMVA-DV1

A geração do vírus rMVA-DENV1 se deu em placas de 6 poços, em culturas de células BHK-21, em m.o.i 1, utilizando 4 µg do plasmídeo de transferência. A Figura 22 (A e B) mostra o resultado da transfecção.

A presença de fluorescência indicou a presença de vírus recombinantes que foram submetidos a rodadas sucessivas de seleção em placa. A identificação dos focos de infecção sob a forma de aglomerados de células foi realizada sob luz fluorescente, como indicado na Figura 22 (C, D, E, F).

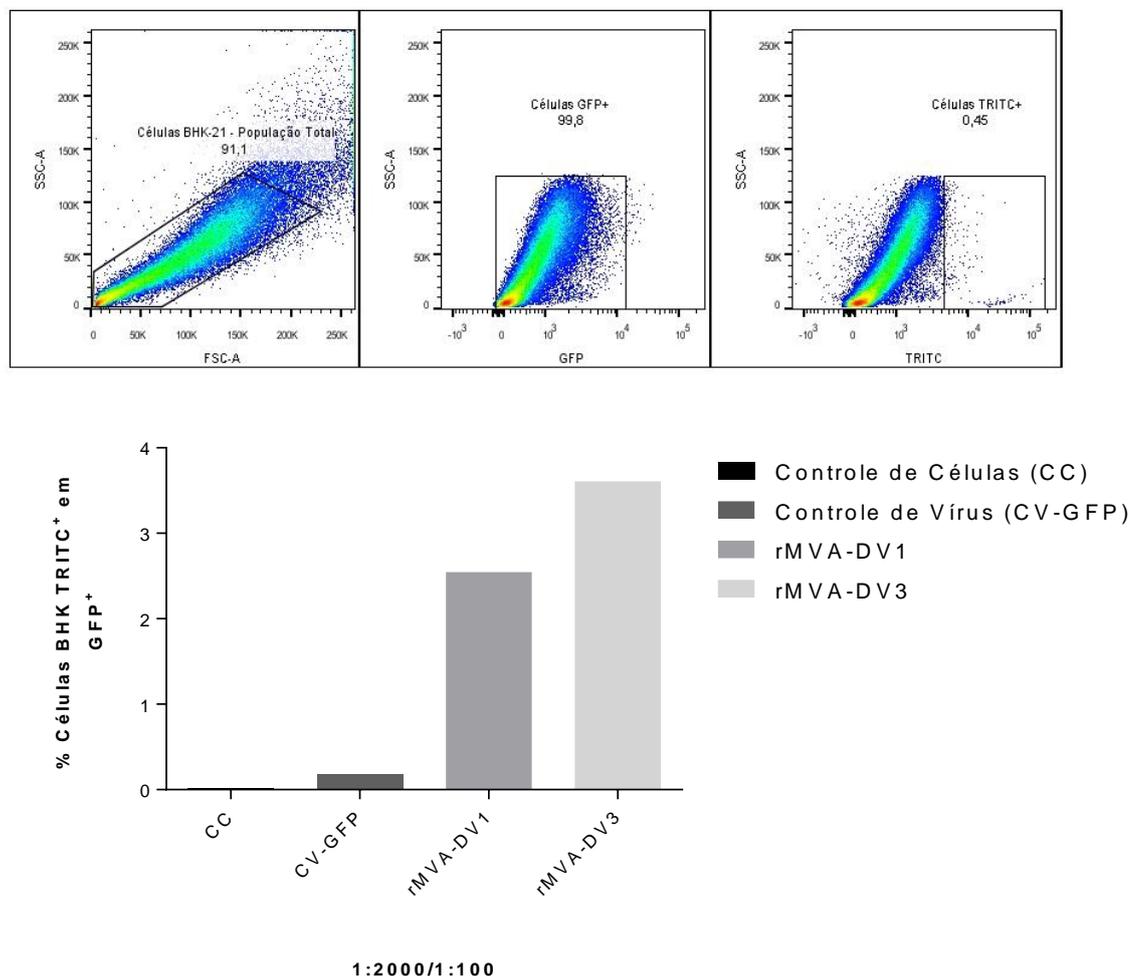


**Figura 22. Geração e seleção de vírus rMVA-DENV1 em cultura de células BHK-21.** Transfecção de células com o plasmídeo de transferência pLW-DENV1 (aumento 100X). **A)** Células BHK-21transfectadas realizada com pLW44-DENV1 (m.o.i. 1), sob microscopia óptica. **B)** Células BHK-21transfectadas realizada com pLW44-DENV1 (m.o.i. 1), sob microscopia de fluorescência. **C)** Controle – células BHK-21 infectadas com o vírus recombinantes rMVA-DENV1E na 1ª rodada de seleção sob microscopia óptica; **D)** Clone na 1ª rodada de seleção sob microscopia de fluorescência. **E)** Controle – células BHK-21 infectadas com o vírus recombinantes rMVA-DENV1E na 4ª rodada de seleção sob microscopia óptica; **F)** Clone na 4ª rodada de seleção sob microscopia de fluorescência. Aumento 400x.

O vírus rMVA-DENV1 foi amplificado em células CEF e BHK-21 e originou dois lotes diferentes cujos títulos foram  $7 \times 10^9$  e  $2 \times 10^9$  pfu/mL, respectivamente.

A presença do gene da proteína E foi confirmada por PCR. Para a verificação da expressão da proteína foram realizados sucessivos ensaios de Western Blot. No entanto, estes ensaios não indicaram com precisão a expressão da proteína recombinante de interesse (dados negativos não mostrados). Como alternativa, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo, confirmando a expressão da proteína E de DENV1 (Figura 23). O vírus rMVA-

DENV3 foi utilizado como controle positivo. O vírus recombinante produzido foi utilizado nos ensaios de imunização.

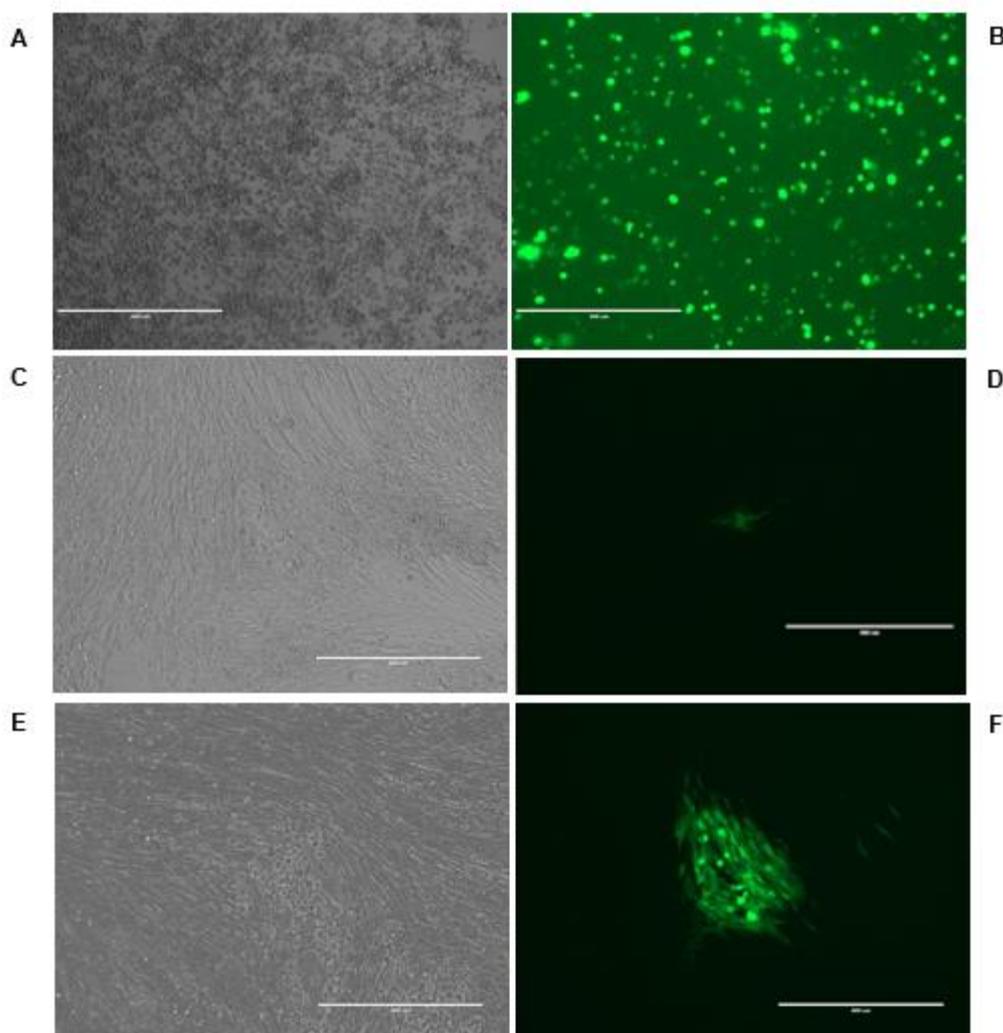


**Figura 23. Análise da expressão da proteína E de DENV1 e DENV3 pelos vetores MVA recombinantes. A)** Gráfico representativo da estratégia de *gating* utilizada nos experimentos empregando citometria de fluxo. **B)** Detecção da expressão da proteína E utilizando 1:2000 do anticorpo primário e 1:100 do anticorpo secundário. **CC:** Células BHK-21 não infectadas; **CV:** BHK-21 infectadas com vírus MVA-GFP; **rMVA-DENV1:** Células BHK-21 infectadas com o vírus recombinante expressando a proteína E de DENV1; **rMVA-DENV3:** Células BHK-21 infectadas com o vírus recombinante expressando a proteína E de DENV3.

### 6.3.2 rMVA-DV2

A geração do vírus rMVA-DENV2 se deu em placas de 6 poços, em culturas de células CEF, em m.o.i 1, utilizando 4  $\mu$ g do plasmídeo de transferência. A Figura 24 (A, B) mostra o resultado da transfecção. Após a

confirmação da expressão da proteína GFP pela observação da fluorescência verde nas células infectadas, deu-se início às rodadas de seleção em placa. A identificação dos focos de infecção foi realizada sob luz fluorescente, como indicado na Figura 24 (C, D, E, F).

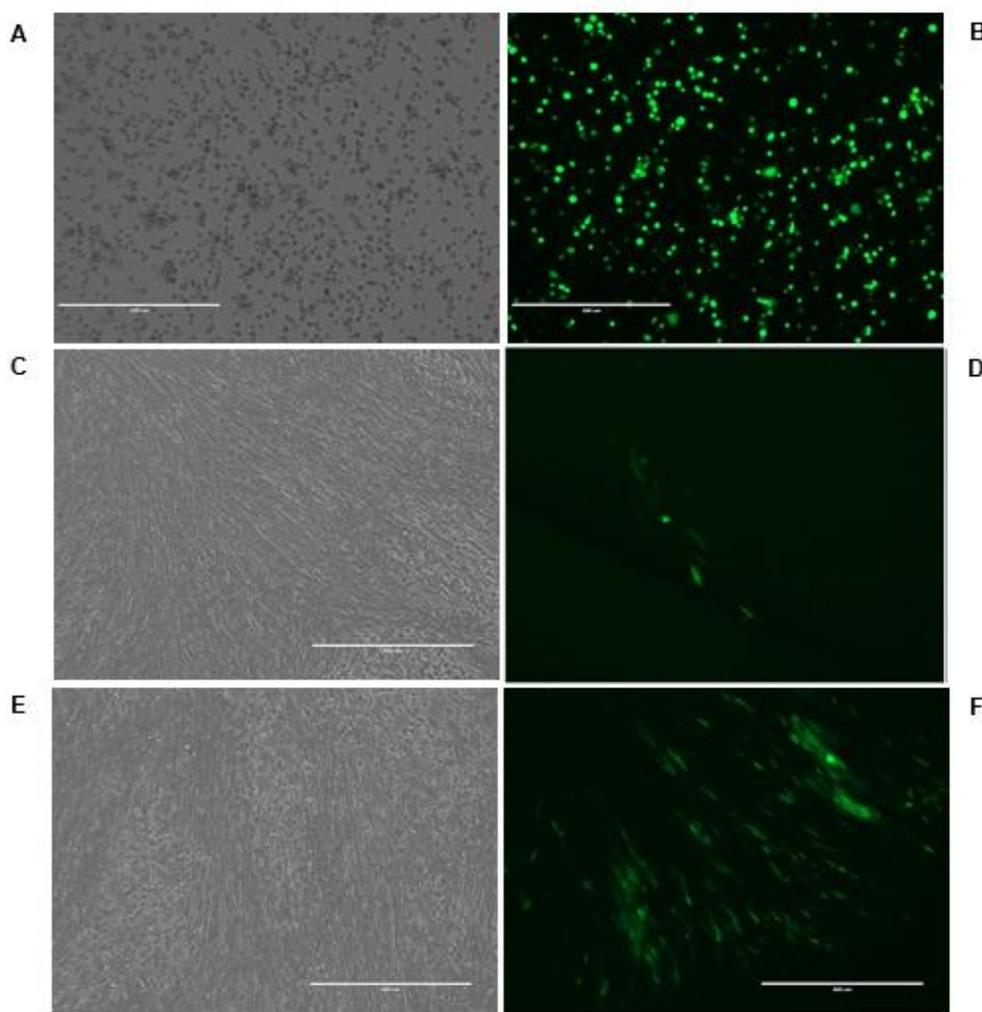


**Figura 24. Geração e seleção de vírus rMVA-DENV2 em cultura de células CEF.** Transfecção de células com o plasmídeo de transferência pLW-DENV2 (aumento 100X). **A)** Células BHK-21 transfectadas realizada com pLW44-DENV2 (m.o.i. 1), sob microscopia óptica. **B)** Células BHK-21 transfectadas realizada com pLW44-DENV2E (m.o.i. 1), sob microscopia de fluorescência. **C)** Controle – células BHK-21 infectadas com o vírus recombinantes rMVA-DENV2E na 1ª rodada de seleção sob microscopia óptica; **D)** Clone na 1ª rodada de seleção sob microscopia de fluorescência. **E)** Controle – células BHK-21 infectadas com o vírus recombinantes rMVA-DENV2E na 4ª rodada de seleção sob microscopia óptica; **F)** Clone na 4ª rodada de seleção sob microscopia de fluorescência. Aumento 400x.

O vírus rMVA-DENV2 foi amplificado em células BHK-21 e atualmente encontra-se em produção, para posterior titulação e ensaios de confirmação de sua construção.

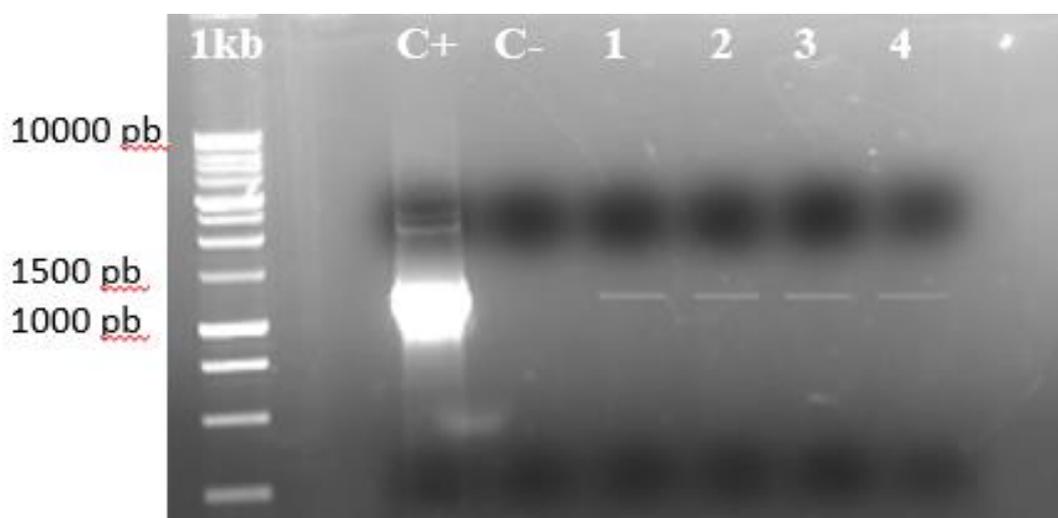
### 6.3.3 rMVA-DV4

A geração do vírus recombinante MVA-DENV4 se deu em placas de 6 poços, em culturas de células CEF, em m.o.i 1, utilizando 4 µg do plasmídeo de transferência. A Figura 25 (A e B) mostra o resultado da transfecção. Após a confirmação da expressão da proteína GFP pela observação da fluorescência verde nas células infectadas, deu-se início às rodadas de seleção em placa. A identificação dos focos de infecção foi realizada sob luz fluorescente, como indicado na Figura 25 (C, D, E, F).



**Figura 25. Geração e seleção de vírus rMVA-DENV4 em cultura de células CEF.** Transfecção de células com o plasmídeo de transferência pLW-DENV2 (aumento 100X). **A)** Células CEF transfectadas realizada com pLW44-DENV2 (m.o.i. 1), sob microscopia óptica. **B)** Células CEF transfectadas realizada com pLW44-DENV2E (m.o.i. 1), sob microscopia de fluorescência. **C)** Controle – células CEF infectadas com o vírus recombinantes rMVA-DENV2E na 1ª rodada de seleção sob microscopia óptica; **D)** Clone na 1ª rodada de seleção sob microscopia de fluorescência. **E)** Controle – células CEF infectadas com o vírus recombinantes rMVA-DENV2E na 4ª rodada de seleção sob microscopia óptica; **F)** Clone na 4ª rodada de seleção sob microscopia de fluorescência. Aumento 400x.

O vírus rMVA-DENV4 foi amplificado em células BHK-21. Nesse ínterim, o DNA das células infectadas foi extraído e foi realizado uma PCR para cada uma das quatro amostras (Figura 26).



**Figura 26. Amplificação dos fragmentos do gene que codifica a proteína E de DENV4 no vírus recombinante.** Visualização dos produtos da PCR após fracionamento em gel de agarose 1% e TBE 1X. Fragmento de aproximadamente 1.516 pb para amostras positivas e controle positivo. Canaletas: **PM:** Peso molecular “DNA ladder 1 kb”; **C-** (controle negativo): H<sub>2</sub>O; **C+** (controle positivo): pEZ-DENV4; amostras 1 a 4: clones de MVA-DENV4.

O clone 1 foi escolhido aleatoriamente para dar seguimento e atualmente o vírus encontra-se em produção para posterior titulação e ensaios de confirmação de sua construção.

## 6.4 AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DA VACINA rMVA-DENV1

### 6.4.1 Dose Letal 1

A dose letal utilizada para o primeiro ensaio de desafio foi baseada nos trabalhos do nosso grupo de pesquisa. Foi realizado uma infecção intracranial em camundongos C57/BL6 fêmeas, com idade entre 8-10 semanas. Foram utilizadas as doses de  $2,5 \times 10^2$  pfu para o desafio de DENV1 e  $2 \times 10^3$  pfu para o desafio de DENV3 (Tabela 9).

**Tabela 9. Dose letal dos vírus DENV1 e DENV3.**

<b>DENV 1</b>		
<b>2,5x10<sup>2</sup> pfu</b>	5x10 <sup>2</sup> pfu	10 <sup>3</sup> pfu
<b>87,5 % (5/6)</b>	100% (6/6)	100% (6/6)
<b>DENV 3</b>		
5x10 <sup>2</sup> pfu	10 <sup>3</sup> pfu	<b>2x10<sup>3</sup> pfu</b>
16,7% (1/6)	50% (3/6)	<b>100% (6/6)</b>

pfu - *plaque forming unit* (unidades formadoras de placa). Entre parênteses: o número de animais não sobreviventes em relação ao número total do grupo. **Fonte:** grupo de pesquisa do LVBA.

De acordo com a Tabela 9 as doses letais capazes de matar 80-100% dos animais infectados são 2,5x10<sup>2</sup> pfu de DENV1 Mochizuki e 2x10<sup>3</sup> pfu de DENV3 MG20, doses essas que foram utilizadas para o experimento de desafio.

#### **6.4.2 Desafio 1**

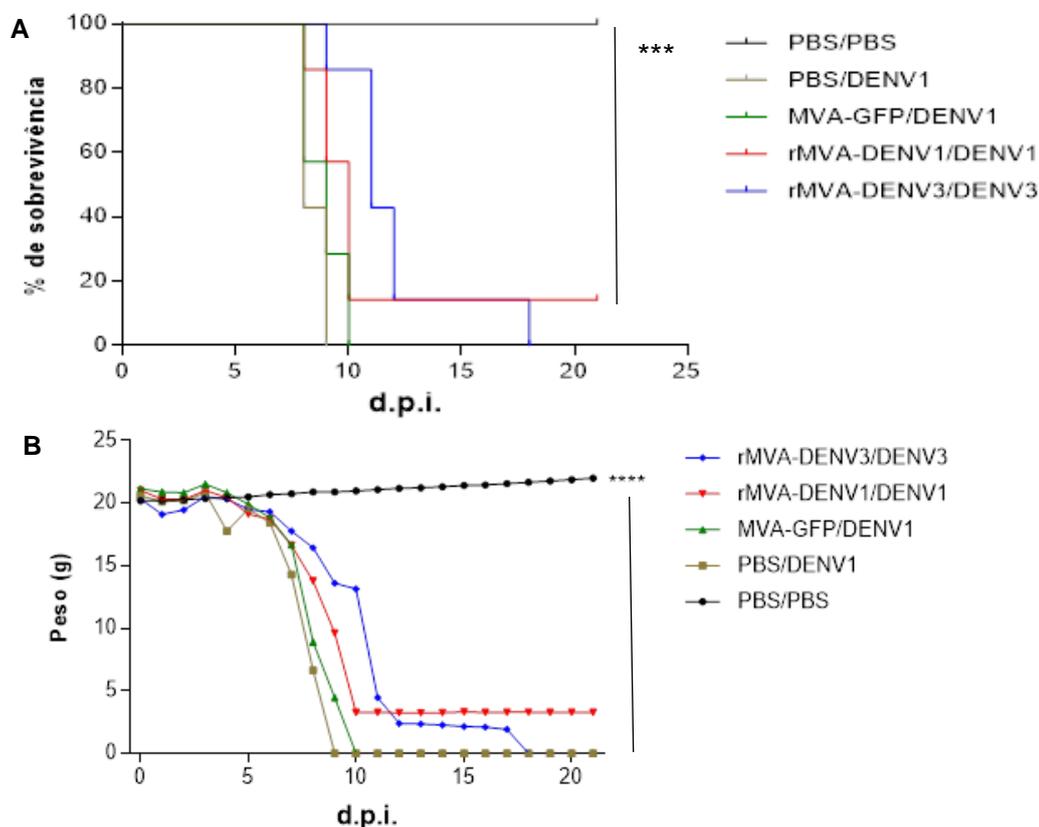
Para o experimento de desafio foram adotados os grupos descritos na Tabela 9. Os animais foram imunizados com 1x10<sup>7</sup> pfu dos vírus recombinantes e controle.

Todos os animais do grupo MOCK sobreviveram ao desafio intracranial com PBS. Os animais dos grupos PBS e MVA-GFP apresentaram sinais de encefalite a partir do 6º dia pós infecção (d.p.i.) e foram a óbito até o 10º dia (7/7). A maioria dos animais vacinados (6/7) com rMVA-DENV1 e desafiados com DENV-1 apresentaram sinais de encefalite a partir do 7º d.p.i. e tiveram óbito entre o 8º e 10º d.p.i. Um animal permaneceu vivo até o final do experimento. Os animais vacinados com rMVA-DENV3 desafiados com DENV3 apresentaram sinais a partir do 8º d.p.i. e todos tiveram óbito do 9º ao 17º d.p.i. (7/7) (Figura 27 A).

Todos os animais do grupo MOCK (PBS/PBS) sobreviveram, apresentando diferença estatística entre todos os outros grupos (p= 0,0003). O grupo vacinal rMVA-DENV1/DENV1 se comportou semelhantemente aos grupos controle, não apresentando diferença entre os grupos PBS (p= 0,2429), MVA-GFP (p= 0,1748) e rMVA-DENV3/DENV3 (p= 0,3135) no quesito sobrevida.

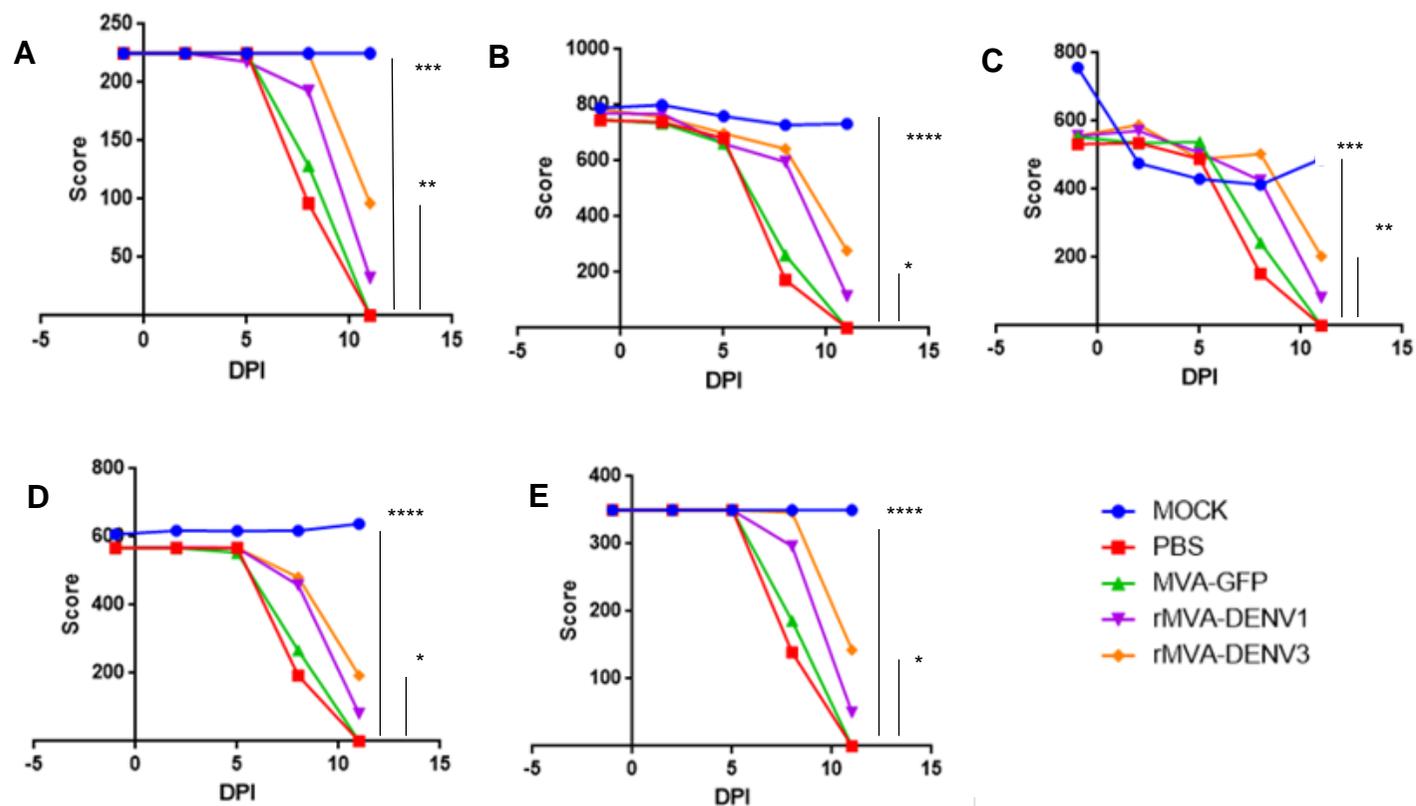
No que diz respeito à perda de peso (figura 27 B), os animais do grupo MOCK foram os únicos que apresentaram estabilidade/ganho de peso durante o experimento, diferente dos animais dos grupos imunizados contra DENV1 e DENV3, PBS e MVA-GFP (p< 0,00001). Os animais dos grupos rMVA-DENV1 e

rMVA-DENV3 tiveram comportamento semelhante aos dos grupos PBS e MVA-GFP, ou seja, apresentando perda de peso durante após o desafio.



**Figura 27. Avaliação da proteção da vacina rMVA-DENV1 após desafio intracranial com DENV1 Mochizuki.** Camundongos C57/BL6 vacinados em regime dose reforço homólogo com  $1 \times 10^7$  de rMVA-DENV1 e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2,5 \times 10^2$  pfu da amostra de DENV1 Mochizuki e monitorados diariamente até 21 d.p.i. **A)** Análise da sobrevivência. A curva de sobrevivência foi analisada usando o método estatístico Mantel-Cox e seguido pelo método Gehan-Breslow-Wilcoxon através do software GraphPad Prism 6.01. Houve sobrevivência de um animal no grupo vacinado com rMVA-DENV1 e desafiado com DENV1. **B)** Análise do peso. Média de peso do grupo. A curva de peso foi analisada usando o método estatístico Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey através do software GraphPad Prism 6.01. Foram analisados um total de 7 animais por grupo. Dados de \*\*\*\*  $p \leq 0,00005$  foram encontrados como estatisticamente significativos comparados aos scores dos animais controles (MOCK).

Os sinais da infecção também foram avaliados após o desafio pela realização do protocolo SHIRPA (figura 28), onde se avaliou a força e tônus muscular, o comportamento motor, o estado neuropsiquiátrico, a função autônoma e a função e reflexo sensorial.



**Figura 28. Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas rMVA-DENV1 E rMVA-DENV3 após desafio intracranial.** Os animais vacinados com  $10^7$  pfu e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A)** força e tônus muscular, **B)** comportamento motor, **C)** estado neuropsiquiátrico, **D)** função autônoma e **E)** função e reflexo sensorial. Os pontos apresentados são uma média de sete animais por grupo. Os scores dos animais vacinados e infectados foram comparados aos scores dos animais controle (PBS/DENV-3) e as análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 6.01 pelo teste Two-way ANOVA. Dados de \*\*\*\*  $p \leq 0,00005$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0005$ ; \*\*  $p \leq 0,005$  . \*\*  $p \leq 0,05$  foram encontrados como estatisticamente significativos comparados aos scores dos animais controles (MOCK).

A análise dos parâmetros avaliados por SHIRPA revelou que os animais imunizados com a vacina rMVA-DENV3 foram os únicos que se comportaram iguais aos do grupo MOCK em três dos cinco parâmetros utilizados: tônus e força muscular, estado neuropsiquiátrico e função e reflexo sensorial. O grupo rMVA-DENV1/DENV1 se comportou igual aos grupos PBS e MOCK em todos os parâmetros, exceto força e tônus muscular ( $p= 0,0396$ ).

Embora as taxas de mortalidade dos grupos rMVA-DENV1 e rMVA-DENV3 tenham ficado aquém do esperado, os testes comportamentais inferem que as vacinas apresentam potencial profilático, uma vez que os grupos vacinais tiveram melhor desempenho dos parâmetros de saúde quando comparados aos não vacinados, além de apresentaram retardamento do aparecimento dos sinais de encefalite e mortalidade. O cérebro, baço, fígado e soro desses animais foram coletados e estão armazenados para testes posteriores.

De acordo com Quinan e colaboradores (2016), a vacina rMVA-DENV3 apresenta potencial protetor de 100%. Esse fato nos fez rever alguns pontos da técnica e repetir o experimento. Levantou-se a hipótese de uma administração de uma superdose dos vírus DENV1 e DENV3 usados no desafio. Assim, os vírus utilizados para o desafio intracranial foram retitulados e submetidos a um novo ensaio de dose letal.

### **6.4.3 Dose Letal 2**

Para esse experimento optou-se por utilizar outro lote de vírus. Dessa forma, a dose administrada foi recalculada com base no novo título obtido e os ensaios de dose letal foram repetidos, inclusive com outras doses além das testadas por nosso grupo de pesquisa. Camundongos C57/BL6 fêmeas, com idade entre 15-18 semanas (idade provável dos camundongos no momento do desafio) foram desafiados por infecção intracranial de acordo com a Tabela 10.

**Tabela 10. Nova dose letal dos vírus DENV1 e DENV3.**

DENV 1			
<b>2,5x10<sup>2</sup> pfu</b>	2,5x10 <sup>1,5</sup> pfu	<b>2,5x10<sup>1</sup> pfu</b>	10 <sup>1</sup> pfu
<b>100% (6/6)</b>	100% (6/6)	<b>87,5 % (5/6)</b>	33,3% (2/6)
DENV 3			
<b>3x10<sup>3</sup> pfu</b>	2x10 <sup>3</sup> pfu	<b>1,5x10<sup>3</sup> pfu</b>	1x10 <sup>3</sup> pfu
<b>100% (6/6)</b>	100% (6/6)	<b>87,5% (5/6)</b>	50% (3/6)

pfu - *plaque forming unit* (unidades formadoras de placa). Entre parênteses: o número de animais não sobreviventes em relação ao número total do grupo. **Fonte:** Tabela autoral.

Os resultados apontaram que as doses capazes de matar entre 80-100% dos animais desafiados foram: 2,5x10<sup>1</sup> pfu para o desafio com DENV1 e 1,5x10<sup>3</sup> pfu para o desafio de DENV3. Essas novas doses foram utilizadas para o experimento de desafio.

#### 6.4.4 Desafio 2

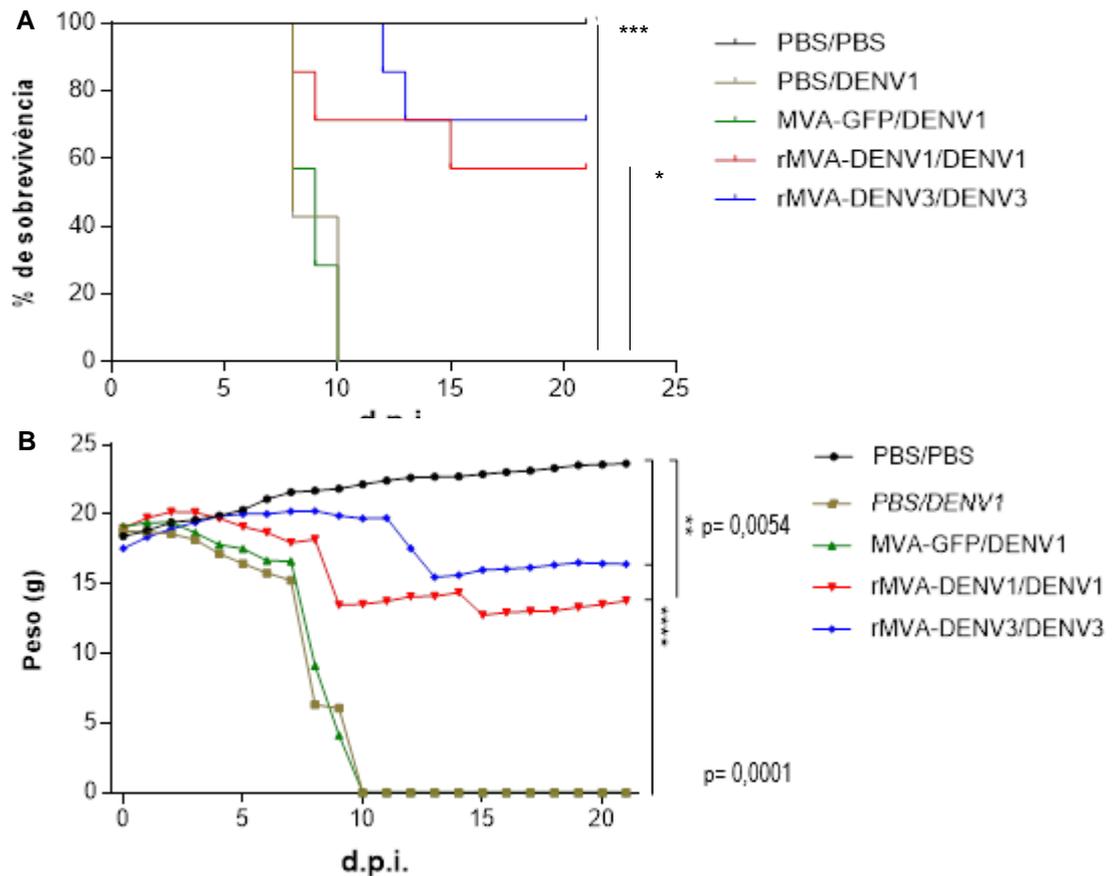
Nesse experimento os animais foram imunizados com 1x10<sup>8</sup> pfu do vírus vacinal e controles. Todos os animais do grupo MOCK sobreviveram ao desafio intracranial com PBS. Os animais dos grupos PBS e MVA-GFP apresentaram sinais de encefalite a partir do 6º d.p.i. e foram a óbito até o 10º d.p.i. (7/7). Dos animais do grupo rMVA-DENV1, três vieram a óbito; no grupo rMVA-DENV3, dois morreram. Os animais dos grupos rMVA-DENV1 e rMVA-DENV3 que vieram a óbito apresentaram sinais de infecção a partir do 9º d.p.i (Figura 29 A).

A taxa de sobrevivência dos animais vacinados rMVA-DENV1 e desafiados com DENV-1 foi de 57,14% (4/7), já dos animais vacinados com rMVA-DENV3 desafiados com DENV3 foi de 71,42% (5/7).

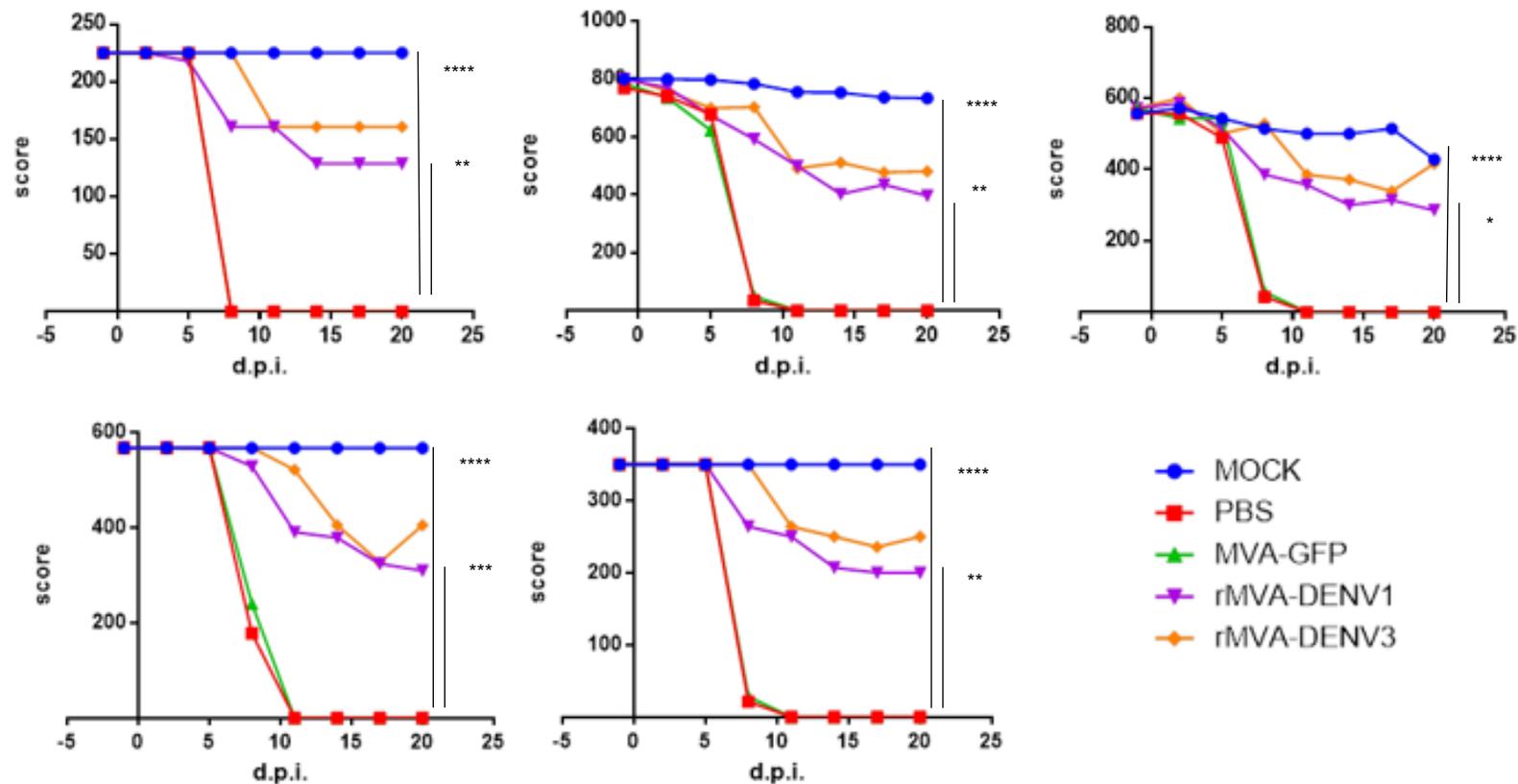
Não houve diferença estatística entre o grupo controle MOCK e os grupos imunizados com as vacinas recombinantes, apontando que os animais vacinados e desafiados com o DENV1 ou DENV3 podem ser comparados aos do grupo controle. Houve diferença estatística entre o grupo MOCK e os controles PBS (p= 0,0003) e MVA-GFP (p=0,0002); e entre o grupo vacinal rMVA-DENV1/DENV1 e os grupos PBS (p= 0,0159) e MVA-GFP (0,0125), indicando que o imunógeno protege animais vacinados contra um desafio intracranial homólogo.

A análise dos parâmetros SHIRPA avaliados revelou que os animais imunizados com as vacinas recombinantes apresentaram diferenças estatísticas

quando comparados com os controles, apresentando menor perda de peso que os grupos PBS e MVA-GFP (Figura 29 B). A imunização com os vírus recombinantes também foi associada ao melhor estado de saúde dos animais (Figura 30) e retardamento do aparecimento dos sinais da infecção e mortalidade.



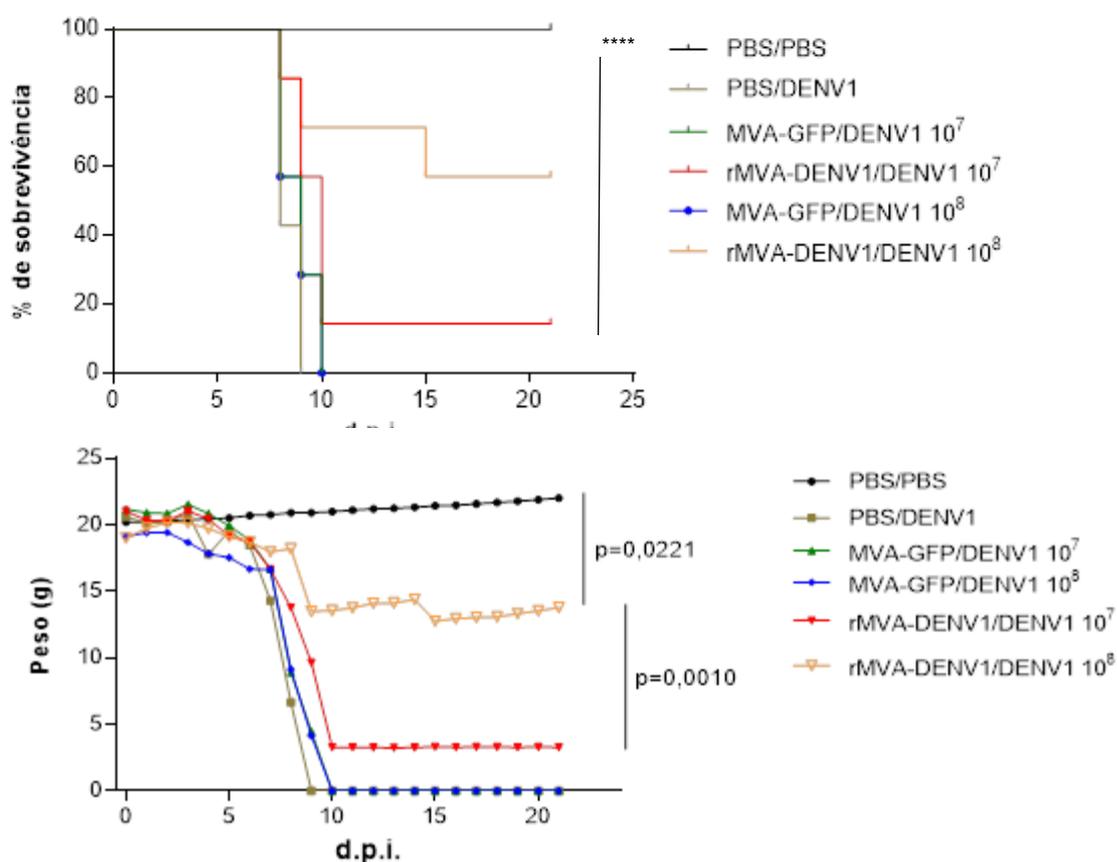
**Figura 29. Avaliação da proteção da vacina rMVA-DENV1 em alta dose após desafio intracranial com DENV1 Mochizuki.** Camundongos C57/BL6 vacinados em regime dose reforço homólogo com  $1 \times 10^8$  de rMVA-DENV1 e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2,5 \times 10^1$  pfu da amostra de DENV1 Mochizuki e monitorados diariamente até 21 d.p.i. **A)** Análise da sobrevivência. A curva de sobrevivência foi analisada usando o método estatístico Mantel-Cox e seguido pelo método Gehan-Breslow-Wilcoxon através do software GraphPad Prism 6.01. Houve sobrevivência de 4 animal no grupo vacinado com rMVA-DENV1 e desafiado com DENV1. **B)** Análise do peso. Média de peso do grupo. A curva de peso foi analisada usando o método estatístico Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey através do software GraphPad Prism 6.01. Foram analisados um total de 7 animais por grupo. Dados de \*\*\*\*  $p \leq 0,00005$  foram encontrados como estatisticamente significativos comparados aos scores dos animais controles (MOCK).



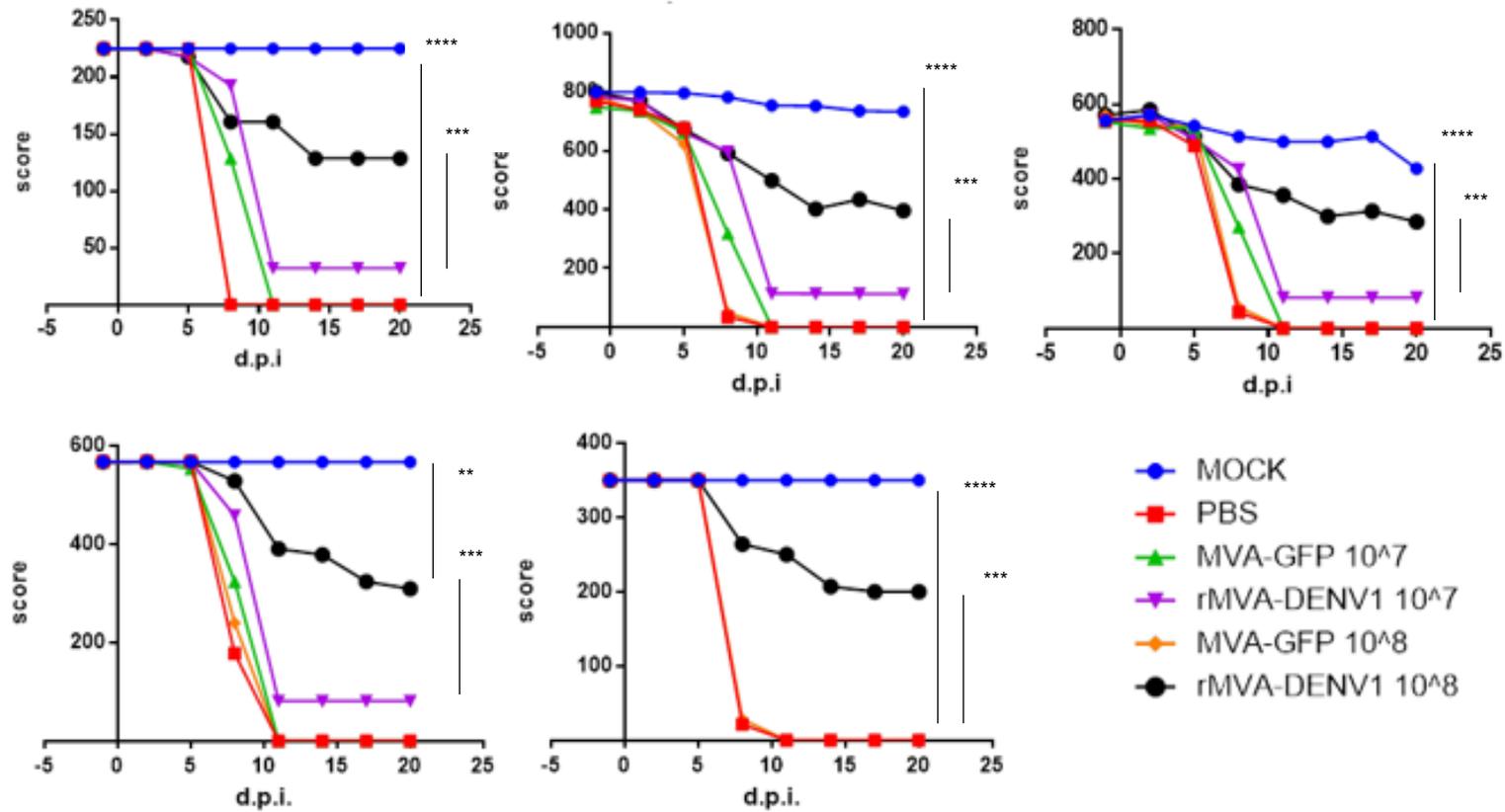
**Figura 30. Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas rMVA-DENV1 E rMVA-DENV3 após desafio intracranial.** Os animais vacinados com  $10^8$  pfu e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A) Força e tônus muscular, B) Comportamento motor, C) Estado neuropsiquiátrico, D) Função autônoma e E) Função e reflexo sensorial.** Os pontos apresentados são uma média de sete animais por grupo. Os scores dos animais vacinados e infectados foram comparados aos scores dos animais controle (PBS/DENV-3) e as análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 6.01 pelo teste Two-way ANOVA. Dados de \*\*\*\*  $p \leq 0,00005$ , \*\*\*  $p \leq 0,0005$ , \*\*  $p \leq 0,005$ , \*  $p \leq 0,05$  foram encontrados como estatisticamente significativos comparados aos scores dos animais controles (MOCK).

Em todos os parâmetros avaliados por SHIRPA, os animais imunizados com os vírus recombinantes se apresentaram como os animais do grupo MOCK. O grupo rMVA-DENV1 apresentou diferença estatística entre os grupos PBS e MVA-GFP em todos os parâmetros. Dessa forma, inferimos que o imunógeno construído parece atuar de forma profilática contra os efeitos da infecção por DENV, além de proteger os animais contra um desafio homólogo.

Ao compararmos o resultado das duas imunizações podemos observar que o grupo dos animais imunizados com a maior dose apresentou melhor perfil de proteção, menor perda de peso (Figura 31) e melhor desempenho das funções corporais (Figura 32), ou seja, melhor perfil profilático que a menor dose.



**Figura 31. Avaliação da proteção da vacina rMVA-DENV1, em dois protocolos de imunização, após desafio intracranial.** Camundongos C57/BL6 vacinados em regime dose reforço homólogo com  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  de rMVA-DENV1 e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2,5 \times 10^4$  pfu da amostra de DENV1 Mochizuki e monitorados diariamente até 21 d.p.i. **A)** Análise da sobrevivência. A curva de sobrevivência foi analisada usando o método estatístico Mantel-Cox e seguido pelo método Gehan-Breslow-Wilcoxon através do software GraphPad Prism 6.01. **B)** Análise do peso. Média de peso do grupo. A curva de peso foi analisada usando o método estatístico Two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey através do software GraphPad Prism 6.01. Foram analisados um total de 7 animais por grupo. Dados de \*\*\*\*  $p \leq 0,00005$  foram encontrados como estatisticamente significativos comparados aos scores dos animais controles (MOCK).



**Figura 32. Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com dois protocolos de imunização usando a vacina rMVA-DENV1E após desafio intracranial.** Os animais vacinados com 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> pfu e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A) Força e tônus muscular, B) Comportamento motor, C) Estado neuropsiquiátrico, D) Função autônoma e E) Função e reflexo sensorial.** Os pontos apresentados são uma média de sete animais por grupo. Os *scores* dos animais vacinados e infectados foram comparados aos *scores* dos animais controle (PBS/DENV-3) e as análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 6.01 pelo teste não paramétrico Two-way ANOVA. Dados de \*\*\*\* p ≤ 0,00005, \*\*\* p ≤ 0,0005, \*\* p ≤ 0,005, foram encontrados como estatisticamente significativos comparados aos *scores* dos animais controles (MOCK).

A tabela 11 resume os resultados do desempenho dos dois imunógenos (rMVA-DENV1E e rMVA-DENV3E) nos dois experimentos de imunização realizados.

**Tabela 11. Desempenho dos vírus recombinantes rMVA-DENV1 e rMVA-DENV3 em desafio intracranial murino.**

	rMVA-DENV1E	rMVA-DENV3E
<b>DESAFIO 1</b>		
<b>Aparecimento dos sintomas</b>	7 d.p.i	7 d.p.i.
<b>Sobrevivência</b>	1/7 (14,28%)	0/7 (0%)
<b>Manutenção e recuperação do peso</b>	Não	Não
<b>SHIRPA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comportamento motor</li> <li>• Estado neuropsiquiátrico,</li> <li>• Função autônoma</li> <li>• Função e reflexo sensorial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Força e tônus muscular</li> <li>• Estado neuropsiquiátrico,</li> <li>• Função e reflexo sensorial</li> </ul>
<b>DESAFIO 2</b>		
<b>Aparecimento dos sintomas</b>	9 d.p.i	9 d.p.i.
<b>Sobrevivência</b>	4/7 (57,14%)	5/7 (71,42%)
<b>Manutenção e recuperação do peso</b>	Sim	Sim
<b>SHIRPA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Força e tônus muscular</li> <li>• Comportamento motor</li> <li>• Estado neuropsiquiátrico,</li> <li>• Função autônoma</li> <li>• Função e reflexo sensorial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Força e tônus muscular</li> <li>• Comportamento motor</li> <li>• Estado neuropsiquiátrico,</li> <li>• Função autônoma</li> <li>• Função e reflexo sensorial</li> </ul>

d.p.i.: dias pós infecção.

## 7 DISCUSSÃO

A dengue é uma arbovirose responsável por muitos casos de internação e óbito em todo o mundo. Além disso, quase metade da população mundial está susceptível à infecção pelos quatro sorotipos de DENV. Atualmente existe uma vacina disponível para dengue, no entanto, ela apresenta falhas na proteção e esse fator suscita a continuação de estudos voltados para a produção de uma vacina tetravalente eficaz (WHO, 2019).

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa apresentaram uma vacina eficaz contra DENV3, motivando a expansão de testes para os demais sorotipos (QUINAN et al., 2014). Assim, o presente trabalho teve como objetivo construir diferentes vírus recombinantes MVA expressando a proteína E de DENV1, 2 e 4 e, em seguida, avaliar e comparar, em modelo murino, o potencial protetor dessas construções.

A escolha da proteína E para estas construções se deu com base no seu potencial imunogênico. Vários candidatos vacinais utilizam a proteína E de DENV em suas construções (CHEN, H. et al., 2013; LIU, G. et al., 2015; VALDÉS, I. et al., 2009.), incluindo a vacina licenciada CYD-TDV (SCOTT, L.J., 2016).

No entanto, o diferencial de nossa vacina é que a proteína E dos DENV foi modificada a fim de melhorar a imunogenicidade das construções. Uma das alterações diz respeito à estrutura da proteína E, sendo essa baseada nos resultados de Men e colaboradores (2000). O grupo de pesquisa desenvolveu uma vacina recombinante expressando as proteínas C, prM, E e NS1 de DENV4. Os animais imunizados apresentaram uma diminuição da concentração dos anticorpos específicos contra a proteína E; esse fato fez com que os pesquisadores investigassem a estrutura dessa proteína. Foi observado que a proteína E truncada em 80% era detectada em concentração elevada na superfície celular e secretada extracelularmente. Os pesquisadores então utilizaram a proteína E truncada em novas construções e observaram que houve aumento da imunogenicidade (MEN et al., 2000).

As demais alterações realizadas foram baseadas no trabalho de Quinan e colaboradores (2014). A proteína E utilizada na vacina recombinante para DENV3, além de conservar o peptídeo sinal natural da proteína E, foi otimizada

para a expressão em eucariotos e síntese proteica, além de apresentar sítios para enzimas de clonagem e controle da transcrição. Essa construção foi testada (QUINAN et al., 2016) e os bons perfis imunogênicos observados sugerem que as mutações não alteraram o potencial imunogênico da vacina. Dessa forma, a construção dos vírus recombinantes contendo os genes da proteína E de DENV 1, 2 e 4 se basearam nesses estudos.

A construção dos plasmídeos de transferência foi um dos pontos mais críticos desse trabalho. Por vezes, plasmídeos de transferência sem o inserto ou com inserto incompatível foram utilizados para a produção de vírus recombinantes, com insucesso. O uso de *kits* comerciais melhorou o rendimento das reações e culminou na geração de vírus recombinantes. Protocolos *in house* são usados rotineiramente em laboratórios de pesquisa, no entanto, não se mostraram eficazes para nossos objetivos. O uso de mais de uma metodologia de confirmação da clonagem também foi fundamental para a escolha correta dos plasmídeos de transferência.

Segundo Meiser e colaboradores (2003) o MVA se multiplica em células CEF e BHK-21, sendo mais eficaz nas células de cultivo primário. Nesse trabalho, a geração dos MVA recombinantes foi realizada em células de linhagem contínua com a mesma eficácia que em células de cultivo primário. Essa informação é de grande valia quando pensamos em produção em larga escala da vacina. A produção em células CEF apresentou, por vezes, títulos virais superiores, no entanto, foi mais laboriosa, dispendiosa e mais propensa à contaminação.

Nos experimentos em camundongos vários aspectos merecem destaque. O principal deles é a qualidade dos animais usados nos testes. Um animal adquirido com doença prévia pode mascarar o efeito da vacina ou potencializar os sinais da infecção craniana. Além disso, experimentos feitos com esses animais podem resultar em falsos positivos ou negativos, colocando em dúvida o resultado obtido, onerando a pesquisa e aumentando o tempo de desfecho do experimento. Para Metz e colaboradores (2009) a escolha correta do modelo animal e qualidade desses animais faz parte das questões e estratégias de controle de qualidade no desenvolvimento de vacinas e devem ser observados com rigor para não interferir no resultado do teste da vacina.

Ainda sobre experimentos murinos, ressaltamos que os títulos dos vírus recombinantes e de desafio precisam ser conferidos a cada experimento. O estoque e manipulação desses vírus podem alterar o título viral, que se não forem confirmados antes do experimento podem implicar na administração de uma subdose ou superdose dos vírus em questão. No primeiro experimento de desafio foi administrado uma superdose dos vírus DENV1 e DENV3, fazendo com que o potencial protetor da vacina fosse subestimado.

Os primeiros testes de proteção da vacina rMVA-DENV1 foram realizados com base nos experimentos com a vacina recombinante para DENV3. A dose utilizada do imunógeno foi  $10^7$  pfu, conferindo proteção de 100% em desafio intracranial contra DENV3 (QUINAN, et al., 2016). No entanto, essa dose conferiu apenas 14% de proteção em desafio intracranial contra DENV1. Essa dose parece não se adequar à vacina rMVA-DENV1 e por essa razão foram realizados outros experimentos visando ajustar a dose administrada da vacina. Observou-se que quando administrada em maior dose ( $10^8$  pfu) a vacina apresentou proteção de 57% em desafio intracranial, além disso, os animais imunizados com os vírus recombinantes adoeceram tardiamente, tiveram sinais da infecção mais brandos e menor perda de peso quando comparados aos dos grupos controle.

Whitahead e colaboradores (2016) também relatam a necessidade de estudar ajustes de vacinas monovalentes, uma vez que suas construções precisaram ser administradas em doses diferente para obterem o resultado desejado.

O perfil de proteção da vacina rMVA-DENV1 observado (57%) foi semelhante ao da vacina licenciada Dengvaxia® que confere proteção média de 58,4% para DENV1 em indivíduos que já tiveram contato com o vírus (GUY, B. et al., 2010). Outras vacinas em teste, como DENVax e TVDV, apresentam eficácia entre 80-100% (BECKETT et al., 2011; BREWOO et al., 2012). A construção monovalente da vacina TV003/TV005 apresenta proteção média entre 72-100%, enquanto a construção tetravalente apresenta em torno de 60% de proteção (WHITEHEAD et al., 2016). Em indivíduos que tiveram infecção prévia por algum sorotipo de DENV a proteção global da vacina é de 87% (WHITEHEAD et al., 2017).

As vacinas em teste que apresentam melhor perfil de proteção contra DENV1 fazem uso de adjuvantes, o que pode melhorar o desempenho do imunógeno, no entanto, se tornam inseguras para uso em humanos devido à alta reatogenicidade já relatada. Whitehead e colaboradores (2016) relataram que 62% das pessoas vacinadas apresentaram erupções cutâneas após a primeira dose da vacina TV003/TV005. Schimidth (2017) e Diaz (2018) relataram como sintomas adversos à vacina DIPV: fadiga, mialgia, dor de cabeça, dor nas articulações e *rash* cutâneo em pacientes dos Estados Unidos e Porto Rico, respectivamente. A gravidade e número de sintomas foram diretamente proporcionais à dose de adjuvante administrada. Por ser uma vacina atenuada, rMVA-DENV1 não tem a necessidade de uso de adjuvantes, o que diminui os custos e efeitos colaterais.

Através do protocolo SHIRPA foi avaliado o impacto da vacina/infecção na força e tônus muscular, comportamento motor, estado neuropsiquiátrico, função autônoma e função e reflexo. O protocolo é destinado à avaliação e diagnóstico de alterações espontâneas e induzidas em camundongos através de testes padronizados voltados à avaliação comportamental e funcional que fornecem uma medida sensível e quantitativa. Esses parâmetros foram refinados ao longo do tempo para testar a função de vias neurais, que, por sua vez, contribuem para uma maior compreensão dos distúrbios neurológicos.

A vacina rMVA-DENV3 foi superior nos quesitos avaliados por SHIRPA quando comparada a vacina rMVA-DENV1, sendo congruente com o percentual de proteção observado na curva de sobrevivência. Através do protocolo SHIRPA, observou-se que ambas as vacinas não produziram efeitos adversos aparentes e foram eficazes amenizar ou proteger os animais frente a uma infecção, uma vez que, os animais sobreviventes imunizados com os vírus recombinantes e desafiados não apresentaram sinais da infecção ou debilidades causadas pelo vírus neurovirulento/neuroadaptado ou efeito adverso associado à administração do imunógeno.

Embora a comparação entre os dois experimentos de desafio realizados tenha sido ilustrativa, nos permitiu observar que as variáveis dose do imunógeno e dose de vírus administrada no desafio intracranial podem interferir diretamente no desempenho dos vírus recombinantes testados. Dessa forma, é necessário que os experimentos com cada vírus recombinante sejam padronizados

individualmente levando em consideração as variáveis acima. Além disso, vale ressaltar que outras variáveis como animais utilizados, modelo animal e a amostra de vírus utilizada no desafio intracraniano também devem ser observadas.

Ressalta-se que o modelo de infecção intracraniano não é um bom modelo de replicação da doença causada pela infecção pelo *Dengue virus*. De fato, a maioria dos modelos de infecção pelo DENV utiliza animais imunossuprimidos ou amostras virais atenuadas (NA et al., 2017). Estas condições impõem uma dificuldade a mais para a avaliação pre-clínica de uma vacina contra dengue. Não obstante, o modelo intracraniano pode ser usado como um teste inicial de potencial profilático da vacina em teste, uma vez que a mitigação de sinais encefalíticos nos animais desafiados indicam a geração significativa de resposta imune induzida pela vacina.

Uma boa vacina contra DENV deve ser segura e eficaz, além de evitar qualquer possível potencialização dos sintomas graves. A vacina rMVA-DENV1, assim como a já produzida rMVA-DENV3, mostrou-se uma vacina segura em ensaios pré-clínicos. Essa característica é comumente associada a construções vacinais usando MVA como vetor (GOOSSENS et al., 2013, revisado por QUINAN et al., 2014b).

## 8 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que as construções dos diferentes vírus recombinantes se deram de maneira eficaz, sobretudo a de rMVA-DENV1. Observou-se que a produção dos vírus recombinantes ocorre de maneira semelhante, quanto à eficácia, em células CEF e BHK-21, o que facilitaria a produção do vírus em larga escala uma vez que BHK-21 é uma célula de linhagem contínua e de fácil manutenção.

Apesar dos contratemplos e da necessidade de experimentos adicionais, nossos resultados demonstraram que o vírus recombinante construído e analisado (rMVA-DENV1) foi eficiente em gerar proteção e conferir um bom quadro de saúde nos animais desafiados com um vírus neuroadaptado, fatos confirmados pelos ensaios de sobrevivência e avaliação dos sinais de encefalite dos grupos experimentais pelo protocolo SHIRPA.

Os ensaios para a construção e teste dessas vacinas continuam. O intuito é de, ao final, obtermos uma vacina tetravalente contra DENV. Uma vacina eficaz irá impedir o ciclo de transmissão do DENV, reduzindo os casos da doença e consequentemente o ônus econômico da dengue em todo o mundo.

## 9 PERSPECTIVAS

- Avaliar a imunogenicidade da vacina rMVA-DENV1.
- Confirmar a construção e expressão da proteína E dos vírus rMVA-DENV2 e rMVA-DENV4.
- Confirmar a proteção gerada pela imunização dos camundongos com os diferentes vírus recombinantes por meio de desafio intracerebral com dose letal de DENV2 e DENV4.
- Avaliar a imunogenicidade das vacinas rMVA-DENV2 e rMVA-DENV4.
- Testar doses diferentes dos vírus recombinantes em ensaios de proteção, conferindo o título viral antes e depois do ensaio.
- Propor alterações no protocolo de imunização e compará-los com os dados obtidos.

## 10 REFERÊNCIAS

ALVES, R. et al. Production of a Recombinant Dengue Virus 2 NS5 Protein and Potential Use as a Vaccine Antigen. *Clin Vaccine Immunol*, v. 23, n. 6, p. 460–469, 2016.

SABIN AB, S. R. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*, v. 101, p. 640–642, 1945.

SARATHY, V. V. et al. Mouse models of dengue virus infection for vaccine testing. *Vaccine*, v. 33, n. 50, p. 7051–7060, 2015.

GUABIRABA, R.; RYFFEL, B. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology*, v. 141, n. 2, p. 143–156, 2014.

CHAN, K. W. K. et al. Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, v. 123, p. 5–14, 2015.

Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, Freitas MRG, Zalis M, Puccioni-Sohler M. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. *J Neurol Sci* 2011;303:75–9.

Varatharaj A. Encephalitis in the clinical spectrum of dengue infection. *Neurol India* 2010;58:585–91.

Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci* 2008;267:36–40

ABUBAKAR, S.; WONG, P. F.; CHAN, Y. F. (2002). Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia. *Journal of general virology*, 83(10), 2437-2442.

AMARASINGHE, A.; KURITSK, J. N.; LETSON, G. W.; MARGOLIS, H. S. (2011). Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis*, 17(8), 1349-54.

AMAR-SINGH, H. S. S.; KOH, M. T.; TAN, K. K.; CHAN, L. G.; ZHOU, L.; BOUCKENOOOGHE, A.; CREVAT, D.; HUTAGALUNG, Y. (2013). Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2–11 years in Malaysia: A randomized, placebo-controlled, Phase III study. *Vaccine*, 31(49), 5814-5821.

ANDRADE, L. A. F. (2016). Geração de uma vacina recombinante experimental contra o Vírus da Imunodeficiência Felina baseada no Vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA). *Tese de doutorado*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ARAÚJO, J. M.; NOGUEIRA, R. M.; SCHATZMAYR, H. G.; PAOLO, M. D. A.; BELLO, G. (2009). Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 716-725.

BÄRNIGHAUSEN, T.; BLOOM, D. E.; CAFIERO, E. T.; O'BRIEN, J. C. (2013). Valuing the broader benefits of dengue vaccination, with a preliminary application to Brazil. In *Seminars in immunology*. Academic Press. Vol. 25, No. 2, pp. 104-113.

BECKETT, C. G.; TJADEN, J.; BURGESS, T.; DANKO, J. R.; TAMMINGA, C.; SIMMONS, M.; HAYES, C. G. (2011). Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine*, 29(5), 960-968.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J.M; BROWNSTEIN, J.S.; HOEN, A.G.; ...; FARRAR, J.J.; HAY, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 1 (496), 504-507.

BISHT H, CHUGH D, RAJE M,. Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in *Pichia pastoris* can function as a bivalent immunogen. *J Biotechnol*. 2002;99(2):97–110.

BISHT, H.; ROBERTS, A.; VOGEL, L.; BUKREYEV, A.; COLLINS, P. L.; MURPHY, B. R.; SUBBARAO, K.; MOSS, B. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6641-6646.

BLANCHARD, T. J.; ALCAMI, A.; ANDREA, P.; SMITH, G. L. (1998). Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *Journal of General Virology*, 79(5), 1159-1167.

BRADY, O. J.; GETHING, P. W.; BHATT, S.; MESSINA, J. P.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; MOYES C.L.; FARLOW A. W.; SCOTT, T. W.; HAY, S. I. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(8), e1760.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. (2007). *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e serviços de saúde*, 16(2), 113-118.

BRANDLER, S.; RUFFIE, C.; NAJBURG, V. Pediatric measles vaccine expressing a dengue tetravalent antigen elicits neutralizing antibodies against all four dengue viruses. *Vaccine*. 2010; 28 (41):6730–6739.

BRASIL. Ministério da Saúde (2002). Fundação Nacional de Saúde. *Programa nacional de Controle da Dengue*. Brasília-DF. Vo1. N1. 34p.

BRASIL. Ministério da Saúde (2017). Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue: Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de *Chikungunya* e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 31 de 2017. Brasília – DF. Vol. 48. N 26. 9p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Classificação de risco e manejo do paciente com suspeita de Dengue – Formulário de Bolso. 2019. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/folder/classificacao\\_risco\\_manejo\\_paciente\\_dengue.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/folder/classificacao_risco_manejo_paciente_dengue.pdf). Acesso 30 jul 2019.

BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO 13. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti (LIRAA). VOL. 50. 2019.

BREWOO, J. N., KINNEY, R. M., POWELL, T. D., ARGUELLO, J. J., SILENGO, S. J., PARTIDOS, C. D., OSORIO, J. E. (2012). Immunogenicity and efficacy of chimeric dengue vaccine (DENVax) formulations in interferon-deficient AG129 mice. *Vaccine*, 30(8), 1513-1520.

BYRD, C. M.; DAI, D.; GROSENBACH, D. W.; BERHANU, A.; JONES, K. F.; CARDWELL, K. B.; SCHNEIDER, C.; WINEINGER, K. A.; PAGE, J. M.; ... ; JORDAN, R. (2013). A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 15-25.

CARON, M.; GRARD, G.; PAUPY, C.; MOMBO, I. M.; NSO, B. B. B.; KASSA, F. R. K.; NKOGHE, D.; LEROY, E. M. (2013). First Evidence of Simultaneous Circulation of Three Different Dengue Virus Serotypes in Africa. *PloS one*, 8(10), e78030.

CARRINGTON, L. B.; ARMIJOS, M. V.; LAMBRECHTS, L.; BARKER, C. M.; SCOTT, T. W. (2013). Effects of fluctuating daily temperatures at critical thermal extremes on Aedes aegypti life-history traits. *PloS one*, 8(3), e58824.

CAVENAUGH, J. S.; AWI, D.; MENDY, M.; HILL, A. V.; WHITTLE, H.; MCCONKEY, S. J. (2011). Partially randomized, non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection. *PLoS One*, 6(2), e14626.

CHEN H, LIU S, LI Y. A consensus envelope protein domain III can induce neutralizing antibody responses against serotype 2 of dengue virus in non-human primates. *Arch Virol*. 2013;158(7):1523–1531.

CHEN, J., WEN, K., LI, X. Q., YI, H. S., DING, X. X., HUANG, Y. F. & FU, N. (2016). Functional properties of DENV EDIII-reactive antibodies in human

DENV-1-infected sera and rabbit antiserum to EDIII. *Molecular medicine reports*, 14(2), 1799-1808.

CHRISTENBURY, J. G.; AW, P. P.; ONG, S. H.; SCHREIBER, M. J.; CHOW, A.; GUBLER, D. J.; VASUDEVAN, S. G.; OOI, E. E.; HIBBERD, M. L. (2010). A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus. *Journal of virological methods*, 169(1), 202-206.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*, 80(23), 11418-11431.

COFFEY, L. L.; MERTENS, E.; BREHIN, A. C.; FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; AMARA, A.; DESPRÉS, P.; SAKUNTABHAI, A. (2009). Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes and Infection*, 11(2), 143-156.

COLMAN, P. M., & LAWRENCE, M. C. (2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(4), 309.

CONDIT, R. C. (2007). Vaccinia, Inc.—probing the functional substructure of poxviral replication factories. *Cell host & microbe*, 2(4), 205-207.

COSTA, R. L.; VOLOCH, C. M.; SCHRAGO, C. G. (2012). Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 309-314.

COX, J.; MOTA, J.; SUKUPOLVI-PETTY, S.; DIAMOND, M. S.; RICO-HESSE, R. (2012). Mosquito bite delivery of dengue virus enhances immunogenicity and pathogenesis in humanized mice. *Journal of virology*, 86(14), 7637-7649.

CRUZ-OLIVEIRA, C.; FREIRE, J. M.; CONCEIÇÃO, T. M.; HIGA, L. M.; CASTANHO MA, DA POIAN AT. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, fuu004.

DAIAN E SILVA, D.S.O., PINHO, T.M.G., RACHID, M.A. et al. The Perennial Use of the Green Fluorescent Protein Marker in a Live *Vaccinia Virus* Ankara Recombinant Platform Shows No Acute Adverse Effects in Mice. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50: 347. DAIAN E SILVA, D. S. O. Vacina contra Parainfluenza 5 baseada na plataforma Vaccinia de Ankara modificado (MVA) expressando a proteína do envelope hemaglutinina-neuraminidase. *Tese de doutorado*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

DALBEM, A. G.; HERLING, J. D.; VIEIRA, R. G.; DE SOUZA, V. A. I. (2014). Dengue clássica e febre hemorrágica da dengue: etiologia, fisiologia,

epidemiologia e fatores de risco. *Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina*, 1(01).

DIAZ, C.; LIN, L.; MARTINEZ, L. J.; ECKELS, K. H.; CAMPOS, M.; JARMAN, R. G.; INNIS, B. L. (2018). Phase I randomized study of a tetravalent dengue purified inactivated vaccine in healthy adults from Puerto Rico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(5), 1435-1443.

DICK, O. B.; SAN MARTÍN, J. L.; MONTOYA, R. H.; DEL DIEGO, J.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. (2012). The history of dengue outbreaks in the Americas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87(4), 584-593.

DIMIER, J.; FERRIER-REMBERT, A.; PRADEAU-AUBRETON, K.; HEBBEN, M.; SPEHNER, D.; FAVIER, A. L.; GRATIER, D.; GARIN, D.; CRANCE, J. M.; DRILLIEN, R. (2011). Deletion of major nonessential genomic regions in the vaccinia virus Lister strain enhances attenuation without altering vaccine efficacy in mice. *Journal of virology*, 85(10), 5016-5026.

DRAPER, S. J.; COTTINGHAM, M. G.; GILBERT, S. C. (2013). Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction—progress and prospects. *Vaccine*, 31(39), 4223-4230.

DREXLER, I.; STAIB, C.; SUTTER, G. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15(6): 506-12.

FAUSTINO, A. F.; GUERRA, G. M.; HUBER, R. G.; HOLLMANN, A.; DOMINGUES, M. M.; BARBOSA, G. M.; ENGUITA, F. J.; BOND, P. J.; CASTANHO, M. A. R. B.; ... ; MARTINS, I. C. (2014). Understanding Dengue Virus Capsid Protein Disordered N-Terminus and pep14-23-Based Inhibition. *ACS chemical biology*, 10 (2), 517–526.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; MAZZON, M.; JACOBS, M.; AMARA, A. (2009). Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell host & microbe*, 5(4), 318-328.

FERREIRA, B. J.; SOUZA, M. D. F. M.; SOARES FILHO, A. M.; CARVALHO, A. A. (2009). Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. *Cienc Saude Coletiva*, 14(3), 961-72.

FERREIRA, G. L. (2012). Global dengue epidemiology trends. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54, 5-6.

FILOMATORI, C. V.; IGLESIAS, N. G.; VILLORDO, S. M.; ALVAREZ, D. E.; GAMARNIK, A. V. (2010). RNA sequences and structures required for the

recruitment and activity of the dengue virus polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 6929-6939.

GOMEZ, C. E.; NAJERA, J. L.; KRUPA, M.; ESTEBAN, M. The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* 2008; 8(2): 97-120.

GÓMEZ, C. E.; PERDIGUERO, B.; CEPEDA, M. V.; MINGORANCE, L.; GARCÍA-ARRIAZA, J.; VANDERMEEREN, A.; SORZANO, C. O. S; ESTEBAN, M. (2013). High, broad, polyfunctional, and durable T cell immune responses induced in mice by a novel hepatitis C virus (HCV) vaccine candidate (MVA-HCV) based on modified vaccinia virus Ankara expressing the nearly full-length HCV genome. *Journal of virology*, 87(13), 7282-7300.

GONCALVEZ, A. P.; ESCALANTE, A. A.; PUJOL, F. H.; LUDERT, J. E.; TOVAR, D.; SALAS, R. A.; LIPRANDI, F. (2002). Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*, 303(1), 110-119.

GOOSSENS, M.; PAUWELS, K.; WILLEMARCK, N.; BREYER, D. (2013). Environmental risk assessment of clinical trials involving modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors. *Current gene therapy*, 13(6), 413-420.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging infectious diseases*, 1(2), 55.

GUBSER, C.; HUÉ, S.; KELLAM, P.; SMITH, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *Journal of General Virology*, 85(1), 105-117.

GUY, B.; SAVILLE, M.; LANG, J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Hum Vaccin*. 2010;6(9):696– 705.

GUZMAN, M. G.; GUBLER, D. J.; IZQUIERDO, A.; MARTINEZ, E. HALSTEAD, S. B. (2016). Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim*, 2, 16055.

HALSTEAD, S. B. (2008). Dengue virus-mosquito interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 273-291.

HARRISON, S. C. (2015). Viral membrane fusion. *Virology*, 12, 498 – 507.

HEINZ, F. X. & STIASNY, K. (2012). Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology*, 55(4), 289-295.

IDREES, S.; ASHFAQ, U. A. (2012). A brief review on dengue molecular virology, diagnosis, treatment and prevalence in Pakistan. *Genet Vaccines Ther*, 10(6).

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS (ICTV). *Virus Taxonomy: Current release. Taxonomy history of Poxvirus*. Disponível em: <http://ictvonline.org/>. Acesso em 19 mar 2017.

JAIN, B.; CHATURVEDI, U. C.; JAIN, A. (2014). Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; An overview. *Microbial pathogenesis*, 69, 45-52.

JOHN, A. L. S.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. (2013). Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 420-426.

KLEIN, D. E.; CHOI, J. L.; HARRISON, S. C. (2013). Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *Journal of virology*, 87(4), 2287-2293.

KLUNGTHONG, C.; ZHANG, C.; MAMMEN, M. P.; UBOL, S.; HOLMES, E. C. (2004). The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*, 329(1), 168-179.

KNUDSEN, M. L.; LJUNGBERG, K.; TATOUD, R.; WEBER, J.; ESTEBAN, M.; LILJESTRÖM, P. (2015). Alphavirus Replicon DNA Expressing HIV Antigens Is an Excellent Prime for Boosting with Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA) or with HIV gp140 Protein Antigen. *PloS one*, 10(2).

KOCHEL, T.; AGUILAR, P.; FELICES, V.; COMACH, G.; CRUZ, C.; ALAVA, A.; VARGAS, J.; OLSON, J.; BLAIR, P. (2008). Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Northern South America: 2000–2005. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 682-688.

LA ROSA, C., LONGMATE, J., MARTINEZ, J., ZHOU, Q., KALTCHEVA, T. I., TSAI, W., ... & HARDWICK, N. (2017). MVA vaccine encoding CMV antigens safely induces durable expansion of CMV-specific T cells in healthy adults. *Blood*, 129(1), 114-125.

LACKNER, P., BEER, R., HEUSSLER, V., GOEBEL, G., RUDZKI, D., HELBOK, R., & SCHMUTZHARD, E. (2006). Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathology and applied neurobiology*, 32(2), 177-188.

LIU G, SONG L, BEASLEY D. Immunogenicity and Efficacy of Flagellin-Envelope Fusion Dengue Vaccines in Mice and Monkeys. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(5):516–525.

LOPES, T. F.; HOLCMAN, M. M.; BARBOSA, G. L.; DOMINGOS, M. D. F.; BARREIROS, R. M. O. V. (2014). Laboratory evaluation of the development of *Aedes aegypti* in two seasons: influence of different places and different

densities. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(5), 369-374.

MAMMEN, M. P.; LYONS, A.; INNIS, B. L.; SUN, W.; MCKINNEY, D.; CHUNG, R. C. Y.; ECKELS, K.H; PUTNAK, R.; KANESA-THASAN, N.; ... ; VAUGHN, D. W. (2014). Evaluation of dengue virus strains for human challenge studies. *Vaccine*, 32(13), 1488-1494.

MANOFF S, GEORGE S, BETT A, et al. Preclinical and clinical development of a dengue recombinant subunit vaccine. *Vaccine*. 2015;33(50):7126–7134.

MANTEL, N.; GIRERD, Y.; GENY, C.; BERNARD, I.; PONTVIANNE, J.; LANG, J.; BARBAN, V. (2011). Genetic stability of a dengue vaccine based on chimeric yellow fever/dengue viruses. *Vaccine*, 29(38), 6629-6635.

MAYR, A.; STICKL, H.; MÜLLER, H. K.; DANNER, K.; SINGER, H. (1978). The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Reihe B: Hygiene, Betriebshygiene, präventive Medizin*, 167(5-6), 375-390.

McCURDY, L. H.; LARKIN, B. D.; MARTIN, J. E.; GRAHAM, B. S. (2003). Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. *Clinical infectious diseases*, 38(12), 1749-1753.

MEISER, A.; BOULANGER, D.; SUTTER, G.; LOCKER, J. K. (2003). Comparison of virus production in chicken embryo fibroblasts infected with the WR, IHD-J and MVA strains of vaccinia virus: IHD-J is most efficient in trans-Golgi network wrapping and extracellular enveloped virus release. *Journal of general virology*, 84(6), 1383-1392.

MEN, R., WYATT, L., TOKIMATSU, I., ARAKAKI, S., SHAMEEM, G., ELKINS, R., ... & LAI, C. J. (2000). Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine*, 18(27), 3113-3122.

MESSER, W. B.; DE ALWIS, R.; YOUNT, B. L.; ROYAL, S. R.; HUYNH, J. P.; SMITH, S. A.; CROWE JR, J. E.; DORANZ, B. J.; KAHLE, K. M.; ... ; BARIC, R. S. (2014). Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(5), 1939-1944.

MESSINA, J. P.; BRADY, O. J.; SCOTT, T. W.; ZOU, C.; PIGOTT, D. M.; DUDA, K. A.; BHATT, S.; KATZELNICK, L.; HOWES, R.E.; BATTLE, K.E.; SIMMONS,

C.P.; HAY, S. I. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends in microbiology*, 22(3), 138-146.

METZ, B.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G.; VAN ELS, C.; VAN DER GUN, J.; LEVELS, L.; VAN DER POL, L. ; KERSTEN, G. (2009). Quality-control issues and approaches in vaccine development. *Expert review of vaccines*, 8(2), 227-238.

MEYER, H.; SUTTER, G.; MAYR, A. (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol*, 72(Pt 5), 1031-1038.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., & HARRISON, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427(6972), 313.

MONDOTTE, J. A., LOZACH, P. Y., AMARA, A., & GAMARNIK, A. V. (2007). Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *Journal of virology*, 81(13), 7136-7148.

MOORE, P. R.; VAN DEN HURK, A. F.; MACKENZIE, J. S.; PYKE, A. T. (2017). Dengue viruses in Papua New Guinea: evidence of endemicity and phylogenetic variation, including the evolution of new genetic lineages. *Emerging microbes & infections*, 6(1), 1-11.

MOSS, B. (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*, 344(1), 48-54.

MULLIN, J., AHMED, M. S., SHARMA, R., UPILE, N., BEER, H., ACHAR, P., ... & LAMBE, T. (2016). Activation of cross-reactive mucosal T and B cell responses in human nasopharynx-associated lymphoid tissue in vitro by Modified Vaccinia Ankara-vectored influenza vaccines. *Vaccine*, 34(14), 1688-1695.

MUNSERI, P. J., KROIDL, A., NILSSON, C., GELDMACHER, C., MANN, P., MOSHIRO, C., ... & KALUWA, B. (2015). Priming with a simplified intradermal HIV-1 DNA vaccine regimen followed by boosting with recombinant HIV-1 MVA vaccine is safe and immunogenic: a phase IIa randomized clinical trial. *PloS one*, 10(4), e0119629.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical epidemiology*, 5, 299.

MURRELL, S.; WU, S. C.; BUTLER, M. (2011). Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology advances*, 29(2), 239-247.

MUSTAFA, M. S., RASOTGI, V., JAIN, S., & GUPTA, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), 67-70.

NA, W.; YEOM, M.; CHOI, I. K.; YOOK, H.; SONG, D. (2017). Animal models for dengue vaccine development and testing. *Clinical and experimental vaccine research*, 6(2), 104-110.

OSÓRIO, J. E.; VELEZ, I. D.; THOMSON, C.; LOPEZ, L.; JIMENEZ, A.; HALLER, A. A.; SILENGO, S.; SCOTT, J.; BOROUGHS, K. L.; ... ; STINCHCOMB, D. T. (2014). Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naïve healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(9), 830-838.

OSORIO, J.; HUANG, C.; KINNEY, R. Development of DENVax: A chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine*. 2011;29(42):7251–7260.

PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – PAHO / WHO (2019). Epidemiological Update Dengue. Disponível em: <[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=dengue-2217&alias=47782-22-february-2019-dengue-epidemiological-update&Itemid=270&lang](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2217&alias=47782-22-february-2019-dengue-epidemiological-update&Itemid=270&lang)>. Acesso em 27 jul 2019.

PARRA, M., LIU, X., DERRICK, S. C., YANG, A., MOLINA-CRUZ, A., BARILLAS-MURY, C., ... & LITILIT, D. D. (2015). Co-expression of Interleukin-15 Enhances the Protective Immune Responses Induced by Immunization with a Murine Malaria MVA-Based Vaccine Encoding the Circumsporozoite Protein. *PloS one*, 10(10), e0141141.

PERERA, R. & KUHN, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*, 11(4), 369-377.

POOJA, C.; AMRITA, Y.; VINEY, C.. (2014). Clinical implications and treatment of dengue. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7(3), 169-178.

PORTER, K. R., & RAVIPRAKASH, K. (2015). Nucleic acid (DNA) immunization as a platform for dengue vaccine development. *Vaccine*, 33(50), 7135-7140.

Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. McGraw-Hill Higher Education, 7ª edição, 2008, 1088 páginas.

QUINAN, B. R., VERSIANI, A. F., & DA FONSECA, F. G. (2016). A MVA construct expressing a secretable form of the Dengue virus 3 envelope protein

protects immunized mice from dengue-induced encephalitis. *Vaccine*, 34(50), 6120-6122.

QUINAN, B. R.; FLESCHE, I. E.; PINHO, T. M.; COELHO, F. M.; TSCHARKE, D. C.; DA FONSECA, F. G. (2014a). An intact signal peptide on dengue virus E protein enhances immunogenicity for CD8+ T cells and antibody when expressed from Modified Vaccinia Ankara. *Vaccine*, 32(25), 2972-2979.

QUINAN, B. R.; DAIAN, D. S.; COELHO, F. M.; DA FONSECA, F. G. (2014b). Modified vaccinia virus Ankara as vaccine vectors in human and veterinary medicine. *Future Virology*, 9(2), 173-187.

RAUPP, W. A.; BIEGELMEYER, S.; ALVES, C. A.; MULLER, J. R.; LARA, G. M. (2014). Dengue, uma Revisão dos Sorotipos. *NewsLab*, 122 (2), 76-80.

REMY-ZILLER, C.; GERMAIN, C.; SPINDLER, A.; HOFFMANN, C.; SILVESTRE, N.; ROOKE, R.; BONNEFOY, J. Y.; PRÉVILLE, X. (2014). Immunological characterization of a modified vaccinia virus Ankara vector expressing the human papillomavirus 16 E1 protein. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(2), 147-155.

REY, J. R.; O'CONNELL, S. M. (2014). Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Influence of congeners and of oviposition site characteristics. *Journal of Vector Ecology*, 39(1), 190-196.

ROCHA, R. P. Estudo preclínico, em modelo intracranial murino, de uma vacina experimental contra dengue composta por vetores adenovirais e poxvirais recombinants. 2018. Tesis. Universidade Federal de Minas Gerais. 94p.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; MIER-Y-TERAN-ROMERO, L.; SCHWARTZ, I. B.; BURKE, D. S.; CUMMINGS, D. A. (2014). Potential opportunities and perils of imperfect dengue vaccines. *Vaccine*, 32(4), 514-520.

ROGERS, D. C., PETERS, J. O., MARTIN, J. E., BALL, S., NICHOLSON, S. J., WITHERDEN, A. S., & FISHER, E. M. (2001). SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neuroscience letters*, 306(1-2), 89-92.

ROLLIER, C. S.; REYES-SANDOVAL, A.; COTTINGHAM, M. G.; EWER, K.; HILL, A. V. (2011). Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Current opinion in immunology*, 23(3), 377-382.

SÁEZ-LLORENS, X., TRICOU, V., YU, D., RIVERA, L., JIMENO, J., VILLARREAL, A. C.; RAUSCHER, M. (2018). Immunogenicity and safety of one versus two doses of tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2–17 years in Asia and Latin America: 18-month interim data from a phase 2,

randomised, placebo-controlled study. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(2), 162-170.

SANOFI (2017). Carta aos consumidores/pacientes. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2019/03/PDF-1.pdf>> Acesso em 06 de jul de 2019.

SCHMIDT, A. C., LIN, L., MARTINEZ, L. J., RUCK, R. C., ECKELS, K. H., COLLARD, A., ... & INNIS, B. L. (2017). Phase 1 Randomized Study of a Tetravalent Dengue Purified Inactivated Vaccine in Healthy Adults in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96(6), 2017, pp. 1325–1337.

SCOTT, L. J. (2016). Tetravalent dengue vaccine: a review in the prevention of dengue disease. *Drugs*, 76(13), 1301-1312.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. (2007). Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *Jornal de Pediatria*, 83(2), S22-S35.

SMITH, S. A., DE ALWIS, A. R., KOSE, N., HARRIS, E., IBARRA, K. D., KAHLE, K. M. & AUSTIN, S. K. (2013). The potent and broadly neutralizing human dengue virus-specific monoclonal antibody 1C19 reveals a unique cross-reactive epitope on the bc loop of domain II of the envelope protein. *MBio*, 4(6), e00873-13.

SONG, F.; FUX, R.; PROVACIA, L. B.; VOLZ, A.; EICKMANN, M.; BECKER, S.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; HAAGMANS, B. L.; SUTTER, G. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein delivered by modified vaccinia virus Ankara efficiently induces virus-neutralizing antibodies. *Journal of virology*, 87(21), 11950-11954.

SUTTER, G.; MOSS, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22), 10847-10851.

SWAMINATHAN, G., THORYK, E. A., COX, K. S., SMITH, J. S., WOLF, J. J., GINDY, M. E., ... & BETT, A. J. (2016). A tetravalent sub-unit dengue vaccine formulated with ionizable cationic lipid nanoparticle induces significant immune responses in rodents and non-human primates. *Nature - Scientific reports*, 6.

THISYAKORN, U; THISYAKORN, C. (2013). Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Therapeutic advances in vaccines*, 2051013613507862.

TWIDDY, S. S.; FARRAR, J. J.; CHAU, N. V.; WILLS, B.; GOULD, E. A.; GRITSUN, T.; LLOYD, G.; HOLMES, E. C. (2002). Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*, 298(1), 63-72.

VALDÉS I, HERMIDA L, MARTÍN J. Immunological evaluation in nonhuman primates of formulations based on the chimeric protein P64k-domain III of dengue 2 and two components of *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2009;27(7):995–1001.

VANNICE, K. S., ROEHRIG, J. T., & HOMBACH, J. (2015). Next generation dengue vaccines: A review of the preclinical development pipeline. *Vaccine*, 33(50), 7091-7099.

WALSH, S. R.; WILCK, M. B.; DOMINGUEZ, D. J.; ZABLOWSKY, E.; BAJIMAYA, S.; GAGNE, L. S.; VERRILL, K. A.; KLEINJAN, J. A.; PATEL, A.; ... ; BADEN, L. R. (2013). Safety and Immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: A Randomized, Controlled Trial. *Journal of Infectious Diseases*, 207(12), 1888-1897.

WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 523-540.

WEI, J.; CHEN, H.; AN, J. (2013). Recent progress in dengue vaccine development. *Virologica Sinica*, 29(6), 353-363.

WESTERN PACIFIC REGION ORGANIZATION – WPRO / WHO (2015). Annual dengue data in Western pacific region - Update on the dengue situation in the Western Pacific Region. Disponível em: [http://www.wpro.who.int/emerging\\_diseases/dengue\\_biweekly\\_20150224.pdf?ua=1](http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/dengue_biweekly_20150224.pdf?ua=1). Acesso em 11 jul 2019.

WHITE. L.; SARIOL, C.; MATTOCKS, M. An alphavirus vector-based tetravalent dengue vaccine induces a rapid and protective immune response in macaques that differs qualitatively from immunity induced by live virus infection. *J Virol*. 2013;87(6):3409–3424.

WHITEHEAD, S. S.; DURBIN, A. P.; PIERCE, K. K.; ELWOOD, D.; MCELVANY, B. D.; FRASER, E. A.; LOVCHIK, J. M. (2017). In a randomized trial, the live attenuated tetravalent dengue vaccine TV003 is well-tolerated and highly immunogenic in subjects with flavivirus exposure prior to vaccination. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(5), e0005584

WHITEHEAD, S. S. (2016). Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine?. *Expert review of vaccines*, 15(4), 509-517.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 518-528.

WILDER-SMITH, A., HOMBACH, J., FERGUSON, N., SELGELID, M., O'BRIEN, K., VANNICE, K.; NOVAES, H. M. (2019). Deliberations of the strategic advisory group of experts on immunization on the use of CYD-TDV dengue vaccine. *The Lancet infectious diseases*.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Disponível em. Acesso em: 16 jul 2019.

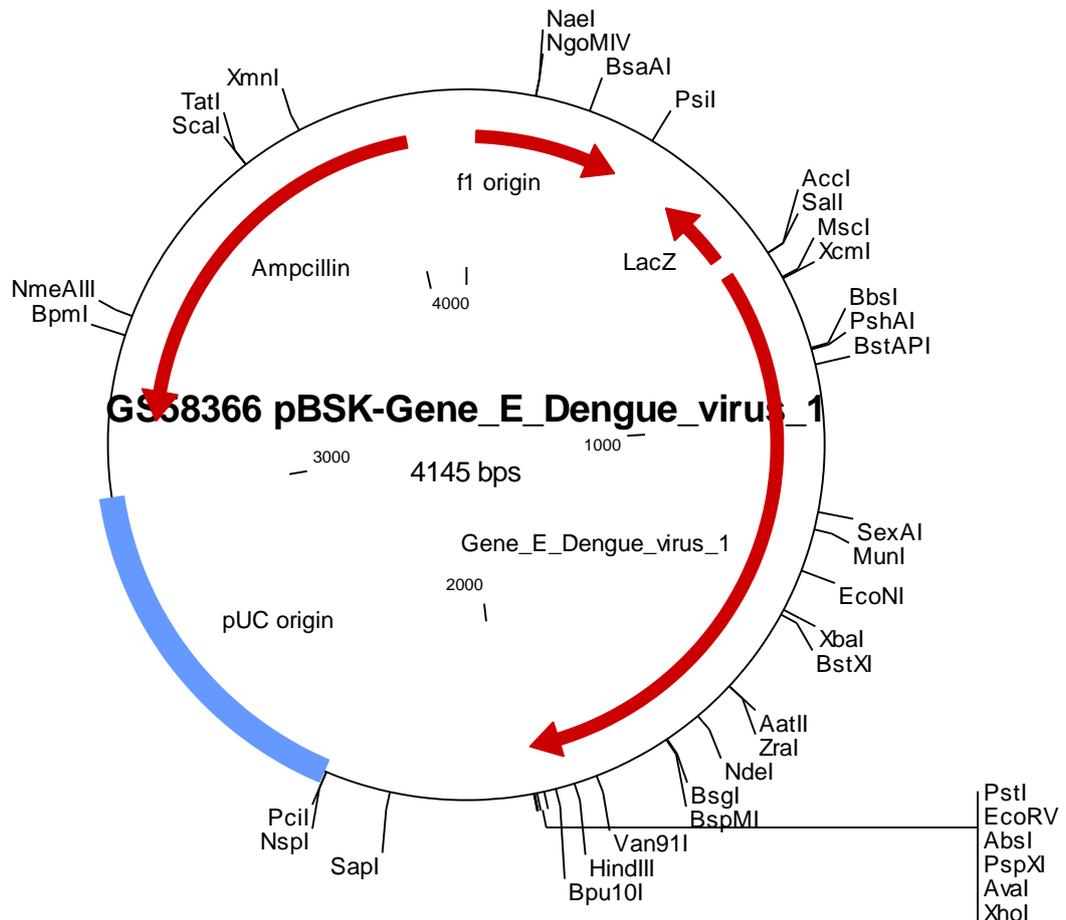
WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (2017). Dengue: Immunization, Vaccines and Biologicals – Research and Development. Disponível em: [http://www.who.int/immunization/research/development/dengue\\_vaccines/en/](http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_vaccines/en/). Acesso em 20 jul 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (2019). Dengue. *Epidemiology*. Disponível em: <<https://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>> Acesso em 29 jul 2019.

ZHOU, Y., & SULLIVAN, N. J. (2015). Immunology and evolvement of the adenovirus prime, MVA boost Ebola virus vaccine. *Current opinion in immunology*, 35, 131-136.

## ANEXOS

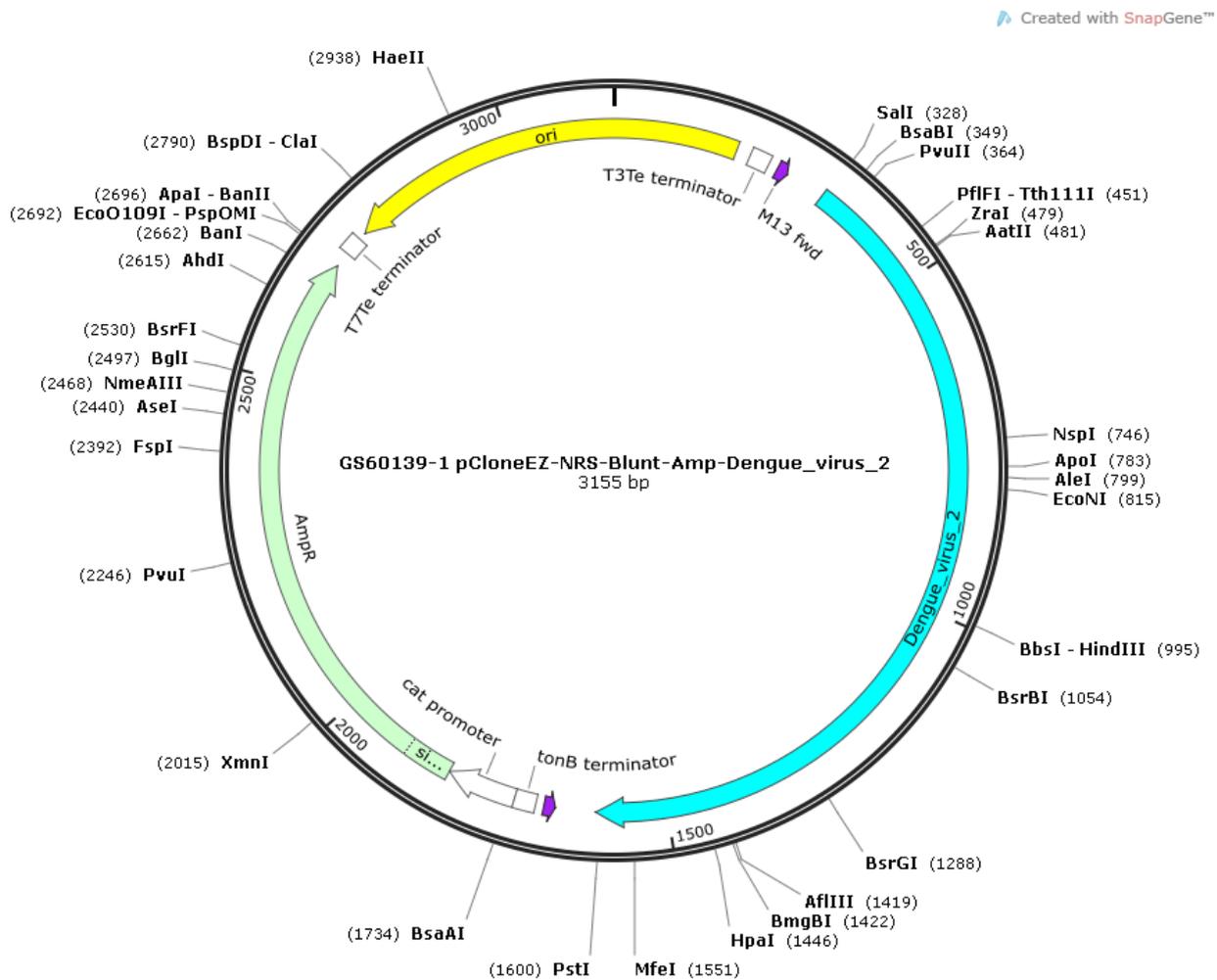
### ANEXO 1 – Gene E de DENV1 clonado em plasmídeo comercial



Synthetic gene was cloned into **SmaI** digested **pBluescript II SK(-)** derivative lacking its multiple cloning sites.

Open reading frame orientation as illustrated. Plasmid map can be reconstructed using the gene bank style txt file provided (sent by e-mail) and free software of **pDRAW32**: <http://www.acaclone.com> or directly viewed using **Clone Manager 5** or newer version (<http://www.scied.com>). **Not all unique restriction sites are shown in the map. Extra nucleotides or unique restriction sites may be found on both ends of your gene for subcloning purpose.**

## ANEXO 2 - Gene E de DENV2 clonado em plasmídeo comercial

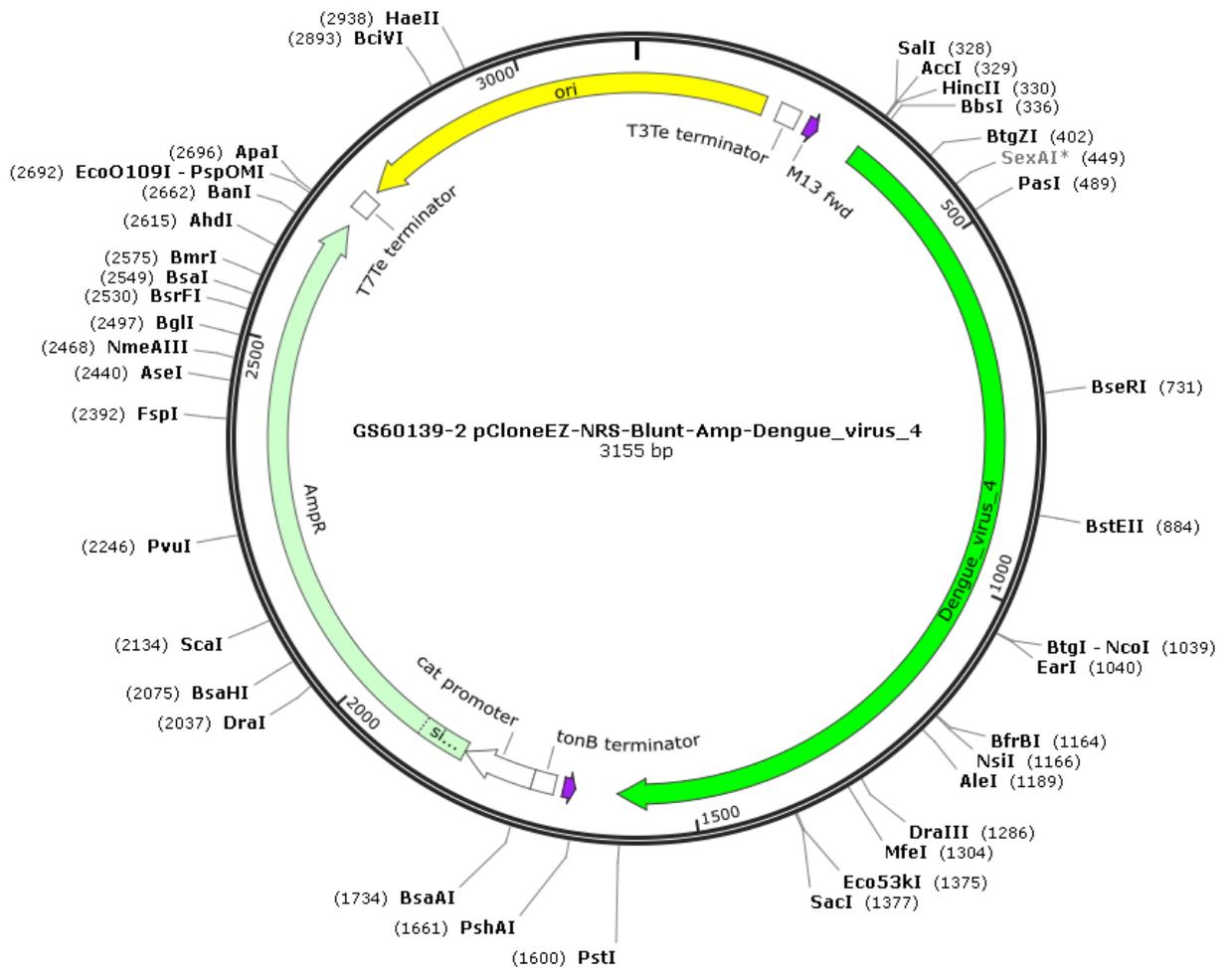


Synthetic gene was cloned into **pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp**.

Open reading frame orientation as illustrated. Plasmid map can be reconstructed using the gene bank style txt file provided (sent by e-mail) and free software of **pDRAW32**: <http://www.acaclone.com> or directly viewed using **Clone Manager 5** or newer version (<http://www.scied.com>). **Not all unique restriction sites are shown in the map. Extra nucleotides or unique restrictionsites may be found on both ends of your gene for subcloning purpose.**

## ANEXO 3 - Gene E de DENV4 clonado em plasmídeo comercial

Created with SnapGene™



Synthetic gene was cloned into **pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp**.

Open reading frame orientation as illustrated. Plasmid map can be reconstructed using the gene bank style txt file provided (sent by e-mail) and free software of **pDRAW32**: <http://www.acaclone.com> or directly viewed using **Clone Manager 5** or newer version (<http://www.scied.com>). **Not all unique restriction sites are shown in the map. Extra nucleotides or unique restriction sites may be found on both ends of your gene for subcloning purpose.**

## ANEXO 4 – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais



**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 317/2018  
**Título do projeto:** CONSTRUÇÃO, AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE E POTENCIAL PROTETOR, EM MODELO MURINO, DE DIFERENTES CONSTRUÇÕES DO VACCINIA VIRUS ANKARA MODIFICADO (MVA) EXPRESSANDO A PROTEÍNA E DE DENGUE VIRUS ESPÉCIES 1, 2 E 4.  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Flavio Guimaraes da Fonseca  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Microbiologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 12/11/2018. Validade: 12/11/2018 à 11/11/2023  
Belo Horizonte, 12/11/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)

## ANEXO 5 – Protocolo de análise de comportamento SHIRPA

### Análise de comportamento (SHIRPA)

#### **TABELA 1** – Comportamento na jarra de observação

- Registre a massa corporal (g)
- O animal é colocado na jarra de observação por 1,5 min. Defecação e micção são monitoradas ao final do período de observação. Registrar os seguintes comportamentos sem perturbar o animal:

#### **1) Posição corporal**

- 0 = Completamente deitado (“achatado”, “flat”).
- 1 = Deitado de lado.
- 2 = Deitado de bruços.
- 3 = *Sentado ou de pé.*
- 4 = Apoiado nas patas traseiras.
- 5 = Pulos verticais repetidos.

#### **2) Atividade espontânea**

- 0 = Nenhuma, descansando.
- 1 = Coçando-se ocasionalmente, *groom*, movimentos lentos.
- 2 = *Coçando-se vigorosamente, groom, movimentos moderados.*
- 3 = Movimentos rápidos, vigorosos, repentinos.
- 4 = Movimentos extremamente vigorosos, rápidos, repentinos.

#### **3) Taxa de respiração**

- 0 = Engasgado, irregular
- 1 = Lenta, superficial
- 2 = *Normal*
- 3 = Hiperventilado

#### **4) Tremor**

- 0 = *Nenhum*
- 1 = Moderado
- 2 = Marcante

#### **TABELA 2** – Comportamento registrado na arena. Uma chapa de metal é inserida sob a jarra e o animal é derrubado no chão da arena sem ser manuseado. Suas reações imediatas e por 30 segundos após o procedimento são observadas:

#### **1) Excitação de transferência**

- 0 = Coma.
- 1 = Congelamento prolongado, seguido de movimentos sutis.
- 2 = Congelamento prolongado, seguido de movimento moderado.
- 3 = Congelamento breve (poucos segundos), seguido de movimento ativo.
- 4 = Congelamento momentâneo, seguido de movimentos bruscos.
- 5 = *Sem congelamento, movimento imediato.*
- 6 = Extremamente excitado (“maníaco”).

#### **2) Atividade locomotora:** nº de entradas de quatro patas nos quadrantes em 30’’

#### **3) Fechamento de pálpebras**

- 0 = *Olhos bem abertos.*

- 1 = Olhos parcialmente fechados
- 2 = Olhos fechados
- 4) Piloereção**
  - 0 = Presente
  - 1 = Ausente
- 5) Ambulação** (perambular)
  - 0 = *Normal*
  - 1 = Fluida, mas anormal
  - 2 = Apenas movimento limitado
  - 3 = Incapacidade
- 6) Elevação pélvica**
  - 0 = Extremamente achatada.
  - 1 = Toca um pouco no chão.
  - 2 = *Normal (elevação de 3 mm).*
  - 3 = Elevada (elevação maior que 3 mm).
- 7) Elevação da cauda** (durante a caminhada para frente)
  - 0 = Arrastando.
  - 1 = *Estendida horizontalmente.*
  - 2 = Elevada.
- 8) Escape ao toque** (o experimentador encosta com o dedo por cima do animal)
  - 0 = Sem resposta.
  - 1 = Moderada (resposta de escape ao toque firme, completo).
  - 2 = *Moderada (resposta rápida ao toque leve, mal encostou).*
  - 3 = Vigorosa (resposta de escape à aproximação).
- 9) Passividade posicional** (resposta de resistência à manipulação repetida)
  - 0 = *Resiste quando segurado pela cauda.*
  - 1 = Resiste quando segurado pelo pescoço (pinçado com o polegar e o indicador).
  - 2 = Resiste quando colocado de barriga para cima.
  - 3 = Resiste quando segurado pelas pernas traseiras.
  - 4 = Não resiste.

**TABELA 3** – Comportamento registrado na arena ou sobre ela. O animal é segurado pela cauda.

- 1) Encurvamento do tronco**
  - 0 = Ausente
  - 1 = Presente
- 2) Segurar as patas**
  - 0 = Ausente
  - 1 = Presente
- 3) Posicionamento visual** (extensão das patas dianteiras ao se aproximar da grade)
  - 0 = Ausente
  - 1 = Depois do contato do focinho
  - 2 = Depois do contato das vibrissas
  - 3 = *Antes do contato com as vibrissas (18 mm)*
  - 4 = Extensão vigorosa (25 mm)

- 4) Força ao agarrar** (Puxar gentilmente o animal na extensão da grade)
- 0 = Ausente
  - 1 = Leve, semi-efetivo
  - 2 = Moderado, efetivo
  - 3 = Ativo, efetivo
  - 4 = Incomumente efetivo
- 5) Tônus corporal** (apertar as laterais do animal com indicador e polegar)
- 0 = Flácido, a cavidade não volta ao normal
  - 1 = *Resistência leve*
  - 2 = Resistência extrema, como uma tábua
- 6) Pinna reflex** (tocar a parte interna da orelha com linha de sutura)
- 0 = Ausente
  - 1 = *Retração ativa, reflexo moderado e rápido*
  - 2 = Reflexo hiperativo, repetitivo
- 7) Reflexo corneal** (Tocar levemente a córnea do animal com a linha de sutura)
- 0 = Ausente
  - 1 = *Ativo, uma piscada*
  - 2 = Ativo, múltiplas piscadas
- 8) Beliscada nos dedos das patas traseiras** (compressão gradual do dedo mediano com uma pinça)
- 0 = Ausente
  - 1 = Retirada leve
  - 2 = Retirada moderada, não brusca
  - 3 = Retirada brusca, rápida
  - 4 = Retirada muito brusca, extensão e flexão repetida
- 9) Manobra do arame**
- 0 = Agarra ativamente com as patas traseiras
  - 1 = Dificuldade de agarrar com as patas traseiras
  - 2 = Impossibilitado de agarrar com as patas traseiras
  - 3 = Impossibilitado de erguer as patas traseiras, caindo em poucos segundos
  - 4 = Cai imediatamente

**TABELA 4** – Diante restrição supina, observar:

- 1) Cor da pele**
- 0 = Alvo
  - 1 = *Rosa*
  - 2 = Brilhante, vermelho vivo
- 2) Batimentos cardíacos** (sentidos por palpitação abaixo do esterno)
- 0 = Lentos, bradicardia
  - 1 = *Normal*
  - 2 = Rápidos, taquicardia
- 3) Tônus dos membros** (resistência à pressão sobre a superfície plantar das patas traseiras)
- 0 = Sem resistência
  - 1 = Leve
  - 2 = *Moderada*

- 3 = Intensa
- 4 = Extrema

**4) Tônus abdominal** (apalpação do abdômen)

- 0 = Flácido, a cavidade não volta ao normal
- 1 = *Resistência leve*
- 2 = Resistência extrema, como uma tábua

**5) Lacrimejamento**

- 0 = Ausente
- 1 = Presente

**6) Salivação**

- 0 = Ausente
- 1 = Presente

**7) Mordida provocada**

- 0 = Ausente
- 1 = Presente

**8) Reflexo postural** (o animal é jogado para trás no ar, desempenhando um salto mortal).

Aterrisagem:

- 0 = Sem problemas
- 1 = Aterrisa de lado
- 2 = Aterrisa de costas
- 3 = Não fica de pé quando cai de costas

**9) Geotaxis negativa** (O animal é colocado na grade, que é posicionada na vertical com o focinho do animal virado para baixo. Observá-lo por 30 segundos):

- 0 = Faz a volta e sobe na grade
- 1 = Faz a volta, mas congela
- 2 = Move-se, mas não faz a volta
- 3 = Não se move por 30 segundos
- 4 = Cai

**10) Medo**

- 0 = Nenhum
- 1 = Congela durante transeferência

**11) Irritabilidade**

- 0 = Ausente
- 1 = Resiste durante a contenção em supino

**12) Agressão**

- 0 = Ausente
- 1 = Mordida provocada ou ataque

**13) Vocalização**

- 0 = Ausente
- 1 = Provocado durante manipulação

Protocolo SHIRPA Data: \_\_\_\_\_

**Tabela 1 - Comportamento na Jarra de observação**

Animal	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Peso corporal (g)																									
Defecação																									
Micção																									

Animal	n	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1. Posição corporal	3																									
2. Ativ. Espontânea	2																									
3. Taxa respiração	2																									
4. Tremor	0																									

**Tabela 2 – Comportamento registrado na arena**

Animal	n	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1. Excitação de transferência	5																									
2. Ativ. Locomotora																										
3. Fechamento de pálpebras	0																									
4. Piloereção	0																									
5. Ambulação	0																									
6. Elevação pélvica	2																									
7. Elevação de cauda	1																									
8. Escape ao toque	2																									
9. Passividade posicional	0																									

**Tabela 3 – Comportamento registrado na ou sobre a arena**

Animal	n	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1. Encurvamento de tronco	-																									
2. Segurar as patas	-																									
3. Posicionamento visual	3																									
4. Força ao agarrar	3																									
5. Tônus corporal	1																									
6. Pinna Reflex	1																									
7. Reflexo corneal	1																									
8. Beliscada dos dedos	3																									
9. Manobra no arame	0																									

**Tabela 4 – Comportamento registrado durante restrição supina**

Animal	n	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1. Cor da pele	1																									
2. Batimentos cardíacos	1																									
3. Tônus dos membros	2																									
4. Tônus abdominal	1																									
5. Lacrimejação	0																									
6. Salivação	0																									
7. Mordida provocada	-																									
8. Reflexo postural	0																									
9. Geotaxis negativo	0																									
10. Medo	0																									
11. Irritabilidade	0																									
12. Agressão	0																									
13. Vocalização	-																									

**APÊNDICE – Artigo (de acordo com exigido pelo regulamento do PPGM-ICB/UFMG)**

**Construction and evaluation of the protective potential of different doses of a vectored vaccine against Dengue Virus 1.**

OLIVEIRA, S.B.<sup>1</sup>; PINHO, T.M.G.<sup>1</sup>; QUINAN, B. R.<sup>2</sup>; MACHADO, A.V.<sup>3</sup>; DA FONSECA, F.G.<sup>1</sup>

1. Laboratory of Basic and Applied Virology, Department of Microbiology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

2. Hospital das Clínicas de Belo Horizonte, MG, Brazil.

3. Laboratório de Imunologia das Doenças Virais, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil.

**Abstract:** Dengue is arbovirus with the greatest impact on public health. A vaccine for the application of protection gaps, do the exercises for a more efficient dengue virus vaccine (DENV) continue. Our research group has been used against the virus using Modified Ankara (MVA) as a vaccine vector against DENV serotype 3. The success of a vaccine motivated the construction of a recombinant virus targeting serotype 1 (rMVA-DENV1E). This phase presents an investigation and analysis of the potential of an experimental model of murine rMVA-DENV1E against an intracranial neurovirulent DENV1. Two protocols were tested: P1) animals immunized with 107 pfu vaccine and challenged with neurovirulent DENV1 sample and P2) animals immunized with 108 pfu vaccine and challenged with neurovirulent DENV1 strain. In P1 the vaccine protected 14% of the challenged animals, in P2 the vaccine protected 57% of the challenged animals. In both protocols, the vaccine presented a therapeutic profile, since the animals immunized with recombinant viruses showed lower weight loss and better performance in tests of muscle strength and tone, motor behavior, neuropsychiatric status, autonomic function, and reflex function. sensory. This research is part of the attempt to build a tetravalent vaccine against DENV.

**Key-words:** recombinant vaccine, MVA, DENV1

## INTRODUCTION

Dengue is a systemic viral infection caused by one of four dengue virus serotypes (DENV1-4), which are genetically related and immunologically distinct. Dengue is the most prevalent arbovirus in humans, with nearly half of the world's population at risk for infection per year. The fact that the disease is untreated and vector control and control strategies are unsuccessful, researchers have focused on producing an effective dengue vaccine (WHO, 2019).

The development of DENV vaccines has been hampered by aspects inherent in the epidemiology and biology of the agent, such as limited understanding of the pathogenesis and interaction between the virus and the immune system, as well as the lack of available animal models to test immunological responses. to potential vaccines (MAMMEM et al., 2014; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2014). Even with so many difficulties, there is a commercially available dengue vaccine. CYD-TDV from Sanofi uses a yellow fever vaccine framework. In this structure are inserted the prM and E proteins of each DENV serotype, replacing the same proteins of the yellow fever vaccine sample (FA-17D). The vaccine is effective only in individuals 9-45 years old who have had the disease. Also, the vaccine has low protection for DENV serotype 2. CYD-TDV currently requires additional studies for its use in pregnant women, nursing mothers and HIV-infected individuals (SCOTT, L.J., 2016; WHO, 2017).

CYD-TDV protection failures encourage research toward a more effective dengue vaccine. Many methodologies are used: live attenuated virus, DNA vaccines, inactivated vaccine, subunit vaccine, and vectors. Attenuated poxviruses are used as vaccine vectors and have a safety record for human use. The most widely used is the MVA - Modified Ankara Virus (DRAPER et al., 2013). MVA has been considered an excellent tool for the generation of recombinant vaccines against human infectious diseases that do not yet have a prophylaxis, or even as an alternative to improve existing vaccine strategies. Currently, MVA acts as a vector in many vaccine constructs in clinical and preclinical research. Among the main ones we can mention vaccines against Human papillomavirus (REMY-ZILLER et al., 2014); Coronavirus respiratory syndrome (SONG et al., 2013); human immunodeficiency virus (KNUDSEN et al., 2015; MUNSERI et al.,

2015); Ebola virus (ZHOU & SULLIVAN, 2015); Influenza virus (MULLIN et al., 2016); Cytomegalovirus (LA ROSA et al., 2017). hepatitis B virus (CAVENAUGH et al., 2011); hepatitis C virus (GÓMEZ et al., 2013); Plasmodium falciparum (PARRA et al., 2015), besides acting in the control of tumor malignancy (WALSH et al., 2013).

MVA was also used as a vaccine vector in a monovalent vaccine against DENV serotype 3. The recombinant vaccine was able to robustly and consistently induce broad cellular and humoral responses in immunized animals. Such animals were also protected from the challenge to DENV3. The data were positive and indicate that alternative vaccine tools based on recombinant MVA virus may be extremely important for the search for an efficient dengue vaccine (QUINAN et al., 2014, 2016). Based on these results, we propose to construct and evaluate the protective potential of a recombinant MVA expressing DENV1 E proteins.

## **METHODS**

### ***Construction of recombinant virus***

DENV1E sequences were obtained from the National Biotechnology Information Center - NCBI (GenBank) database, aligned and truncated in the MEGA 6 (Evolutionary Genetics Molecular Analysis) program and analyzed in the MultAlin program for a sequence for the E gene. from DENV1. Non-GenBank circulating protein and DENV1 sequences in South America were selected between 2005 and 2014. The constructed genes were synthesized and subcloned into plasmid pLW44 (provided by Bernard Moss) for use in transfer plasmids, which were sequenced and used to generate recombinant MVAs. We use the external primers GCGTGGGAATAGGCAACA (forward primers), TGCTTCCTTTCTCTGAACCAGC (reverse primers); and the inner primers CTACGGAGCCCTCACATT (forward primers), TGTTTGTGGACAAGCCATGAT (reverse primers). Plasmids were transfected into MVA infected BHK-21 cells. The selection of recombinants was given by visualization of the GFP protein contained in the transfer plasmid. MVAs were cultured, purified and titrated on BHK-21. Protein E expression was tested by flow cytometry. Proteins were probed using mouse anti-DENV 1 + 2 + 3 + 4 (ab9202, Abcam) and rabbit anti-mouse IgG (A9044, SIGMA) as a secondary antibody.

### ***Protection rating***

Ten weeks old C57BL/6 female mice were immunized intradermally using two MVA doses of  $10^7$  or  $10^8$  PFU, 28 days apart. Immunized mice were challenged with the DENV1 Mochizuki - a neurovirulent strain 21 days after the last immunization. Animals were monitored daily up to 20 days after the challenge for the determination of the survival curve. Graphics and statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.00.

### ***SHIRPA***

The SHIRPA protocol was used for behavioral analysis and functional assessment of neurological diseases. The parameters evaluated were grouped into 5 categories: muscle strength and tone, motor behavior, neuropsychiatric status, autonomic function, and sensory reflex and function (LACKNER et al., 2006; ROGERS et al., 2001). Animals were evaluated within a maximum of two days for each analysis and scores for each category were calculated. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.01 software by the non-parametric Mann-Whitney test.

### ***Ethical Questions***

All experimental procedures were performed following the ethical requirements of the Animal Experimentation Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CETEA-UFMG), under permit # 317/2018.

## **RESULTS**

The rMVA-DENV1 vaccine virus was constructed on BHK-21 cells; the structure (data not shown) and expression of protein E by the recombinant virus (Fig. 1) confirm the success of this construct. The immunogen was tested for the protective profile in two protocols (P1 and P2).

P1 was based on QUINAN et al. (2014), which advocates a homologous booster dose protocol with  $10^7$  pfu of recombinant virus. At P2 the animals were immunized with  $10^8$  pfu of recombinant virus. In both protocols, the animals were challenged with DENV1 Mochizuki. In P1 the vaccine had a protection rate of

14%, while in P2 the vaccine gave 57% protection to immunized and challenged animals (Fig. 2). In both protocols, the vaccine was able to minimize the effects of DENV1 infection on immunized animals, including weight loss (Fig. 3) and parameters associated with muscle strength and tone, motor behavior, neuropsychiatric status, autonomic function, and function. and sensory reflex (fig. 5). Also, the immunized animals had no adverse effects on the vaccine.

## **DISCUSSION**

DENV protein E has a strong immunogenic potential and is the target of the construction of several vaccine candidates. However, the differential of our vaccine is that DENV protein E has been modified to improve the immunogenicity of the constructs. One of the changes concerns the structure of protein E, which is based on the results of Men et al. (2000). The research group developed a recombinant vaccine expressing DENV4 proteins C, prM, E and NS1. The immunized animals showed a decrease in the concentration of specific antibodies against protein E; This fact led the researchers to investigate the structure of the protein. It was observed that 80% of truncated protein E was detected at high concentration on the cell surface and extracellularly secreted. The researchers then used truncated protein E in new constructs and observed that immunogenicity increased.

The other changes made were based on the work of Quinan et al. (2014). The protein E used in the recombinant vaccine for DENV3, besides preserving the natural signal peptide of protein E, was optimized for expression in eukaryotes and protein synthesis, besides presenting sites for cloning enzymes and transcription control. This construct has been tested (QUINAN et al., 2016) and the good immunogenic profiles observed suggest that the mutations did not alter the immunogenic potential of the vaccine. Thus, the construction of rMVA-DENV1 was based on these studies.

The first rMVA-DENV1 vaccine protection tests were performed based on experiments with the recombinant DENV3 vaccine. The immunogen dose used was 107 pfu, conferring 100% protection in an intracranial challenge against DENV3 (QUINAN, et al., 2016). However, this does confer only 14% protection in an intracranial challenge against DENV1. This dose does not appear to be

suitable for the rMVA-DENV1 vaccine and for this reason other experiments have been performed to adjust the administered dose of the vaccine. When administered at a higher dose (108 pfu), the vaccine showed 57% protection in an intracranial challenge. Besides, the animals immunized with the recombinant viruses fell ill later, had milder symptoms and reduced weight loss when compared to the animals. control groups.

Whitahead et al. (2016) also report the need to study monovalent vaccine adjustments as their constructs needed to be administered at different doses to achieve the desired result.

The protection profile for DENV1, although lower than expected, is similar to the immunogenic profile of the licensed Dengvaxia® vaccine, which gives average protection of 58.4% for DENV1 in individuals who already had the virus (GUY, B. et al., 2010).

Other test vaccines, such as DENVax and TVDV, are 80-100% effective (BECKETT et al., 2011; BREWOO et al., 2012). The monovalent construction of the TV003 / TV005 vaccine has average protection of 72-100%, while the tetravalent construction has around 60% protection. (WHITEHEAD et al., 2016). In individuals who had the previous infection with some DENV serotype the overall vaccine protection is 87% (WHITEHEAD et al., 2017).

est vaccines that have a better protection profile against DENV1 make use of adjuvants, which may improve immunogen performance, but become unsafe for use in humans due to the high reactogenicity already reported. Whitehead et al. (2016) reported that 62% of vaccinees experienced a rash after the first dose of the TV003 / TV005 vaccine. Schimidth (2017) and Diaz (2018) reported as adverse symptoms to the DIPV vaccine: fatigue, myalgia, headache, joint pain and skin rash in patients from the United States and Puerto Rico, respectively. Severity and number of symptoms were directly proportional to the adjuvant dose administered. Because it is an activated vaccine, rMVA-DENV1 does not require the use of adjuvants, which reduces costs and side effects.

Among the vaccines being tested for DENV, our construct was the only one tested for their therapeutic potential in animals immunized in preclinical trials. Through the SHIRPA protocol, it was observed that both vaccines produced no adverse effects and were effective to alleviate or protect animals from infection,

as surviving animals immunized with recombinant and challenged viruses showed no sign, symptom or weaknesses. neurovirulent / neuroadaptor virus or adverse effect associated with the administration of the immunogen.

A good vaccine against DENV should be safe and effective and avoid any potential potentiation of severe symptoms. The rMVA-DENV1 vaccine, as well as the already produced rMVA-DENV3, is a safe vaccine in preclinical trials. This feature is commonly associated with vaccine constructions using MVA as a vector (GOOSSENS et al., 2013, reviewed by QUINAN et al., 2014b).

Our results demonstrated that the rMVA-DENV1 vaccine virus was effective in providing protection and good health in animals challenged with a neuroadapted virus. This research is part of the attempt to build a tetravalent vaccine against DENV. An effective dengue vaccine will prevent the DENV transmission cycle, reducing cases of the disease and consequently the economic burden of dengue worldwide.

## REFERENCES

CAVENAUGH, J. S.; AWI, D.; MENDY, M.; HILL, A. V.; WHITTLE, H.; MCCONKEY, S. J. (2011). Partially randomized, a non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection. *PLoS One*, 6(2), e14626.

DRAPER, S. J.; COTTINGHAM, M. G.; GILBERT, S. C. (2013). Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction—progress and prospects. *Vaccine*, 31(39), 4223-4230.

GÓMEZ, C. E.; PERDIGUERO, B.; CEPEDA, M. V.; MINGORANCE, L.; GARCÍA-ARRIAZA, J.; VANDERMEEREN, A.; SORZANO, C. O. S; ESTEBAN, M. (2013). High, broad, polyfunctional, and durable T cell immune responses induced in mice by a novel hepatitis C virus (HCV) vaccine candidate (MVA-HCV) based on modified vaccinia virus Ankara expressing the nearly full-length HCV genome. *Journal of virology*, 87(13), 7282-7300.

KNUDSEN, M. L.; LJUNGBERG, K.; TATOUD, R.; WEBER, J.; ESTEBAN, M.; LILJESTRÖM, P. (2015). Alphavirus Replicon DNA Expressing HIV Antigens Is an Excellent Prime for Boosting with Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA) or with HIV gp140 Protein Antigen. *PloS one*, 10(2).

LA ROSA, C., LONGMATE, J., MARTINEZ, J., ZHOU, Q., KALTCHEVA, T. I., TSAI, W., ... & HARDWICK, N. (2017). MVA vaccine encoding CMV antigens safely induces durable expansion of CMV-specific T cells in healthy adults. *Blood*, 129(1), 114-125.

LACKNER, P., BEER, R., HEUSSLER, V., GOEBEL, G., RUDZKI, D., HELBOK, R., & SCHMUTZHARD, E. (2006). Behavioral and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathology and applied neurobiology*, 32(2), 177-188.

MAMMEN, M. P.; LYONS, A.; INNIS, B. L.; SUN, W.; MCKINNEY, D.; CHUNG, R. C. Y.; ECKELS, K.H; PUTNAK, R.; KANESA-THASAN, N.;...; VAUGHN, D. W. (2014). Evaluation of dengue virus strains for human challenge studies. *Vaccine*, 32(13), 1488-1494.

MEN, R., WYATT, L., TOKIMATSU, I., ARAKAKI, S., SHAMEEM, G., ELKINS, R., ... & LAI, C. J. (2000). Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine*, 18(27), 3113-3122.

MULLIN, J., AHMED, M. S., SHARMA, R., UPILE, N., BEER, H., ACHAR, P., ... & LAMBE, T. (2016). Activation of cross-reactive mucosal T and B cell responses in human nasopharynx-associated lymphoid tissue in vitro by Modified Vaccinia Ankara-vectored influenza vaccines. *Vaccine*, 34(14), 1688-1695.

MUNSERI, P. J., KROIDL, A., NILSSON, C., GELDMACHER, C., MANN, P., MOSHIRO, C., ... & KALUWA, B. (2015). Priming with a simplified intradermal HIV-1 DNA vaccine regimen followed by boosting with recombinant HIV-1 MVA vaccine is safe and immunogenic: a phase IIa randomized clinical trial. *PLoS one*, 10(4), e0119629.

PARRA, M., LIU, X., DERRICK, S. C., YANG, A., MOLINA-CRUZ, A., BARILLAS-MURY, C., ... & LITILIT, D. D. (2015). Co-expression of Interleukin-15 Enhances the Protective Immune Responses Induced by Immunization with a Murine Malaria MVA-Based Vaccine Encoding the Circumsporozoite Protein. *PLoS one*, 10(10), e0141141.

QUINAN, B. R., VERSIANI, A. F., & DA FONSECA, F. G. (2016). MVA constructs expressing a secretable form of the Dengue virus 3 envelope protein protect immunized mice from dengue-induced encephalitis. *Vaccine*, 34(50), 6120-6122.

QUINAN, B. R.; FLESCHE, I. E.; PINHO, T. M.; COELHO, F. M.; TSCHARKE, D. C.; DA FONSECA, F. G. (2014). An intact signal peptide on the dengue virus E protein enhances immunogenicity for CD8+ T cells and antibody when expressed from Modified Vaccinia Ankara. *Vaccine*, 32(25), 2972-2979.

REMY-ZILLER, C.; GERMAIN, C.; SPINDLER, A.; HOFFMANN, C.; SILVESTRE, N.; ROOKE, R.; BONNEFOY, J. Y.; PRÉVILLE, X. (2014). Immunological characterization of a modified vaccinia virus Ankara vector expressing the human papillomavirus 16 E1 protein. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(2), 147-155.

ROCHA, R. P. Estudo pré-clínico, em modelo intracranial murino, de uma vacina experimental contra dengue composta por vetores adenovirais e poxvirais recombinants. 2018. Tesis. Universidade Federal de Minas Gerais. 94p.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; MIER-Y-TERAN-ROMERO, L.; SCHWARTZ, I. B.; BURKE, D. S.; CUMMINGS, D. A. (2014). Potential opportunities and perils of imperfect dengue vaccines. *Vaccine*, 32(4), 514-520.

ROGERS, D. C., PETERS, J. O., MARTIN, J. E., BALL, S., NICHOLSON, S. J., WITHERDEN, A. S., & FISHER, E. M. (2001). SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for a longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neuroscience Letters*, 306(1-2), 89-92.

SCOTT, L. J. (2016). Tetravalent dengue vaccine: a review in the prevention of dengue disease. *Drugs*, 76(13), 1301-1312.

SONG, F.; FUX, R.; PROVACIA, L. B.; VOLZ, A.; EICKMANN, M.; BECKER, S.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; HAAGMANS, B. L.; SUTTER, G. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein delivered by modified vaccinia virus Ankara efficiently induces virus-neutralizing antibodies. *Journal of virology*, 87(21), 11950-11954.

WALSH, S. R.; WILCK, M. B.; DOMINGUEZ, D. J.; ZABLOWSKY, E.; BAJIMAYA, S.; GAGNE, L. S.; VERRILL, K. A.; KLEINJAN, J. A.; PATEL, A.; ... ; BADEN, L. R. (2013). Safety and Immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: A Randomized, Controlled Trial. *Journal of Infectious Diseases*, 207(12), 1888-1897.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (2017). Dengue: Immunization, Vaccines and Biologicals – Research and Development. Disponível em:

[http://www.who.int/immunization/research/development/dengue\\_vaccines/en/](http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_vaccines/en/).

Acesso em 20 jul 2019.

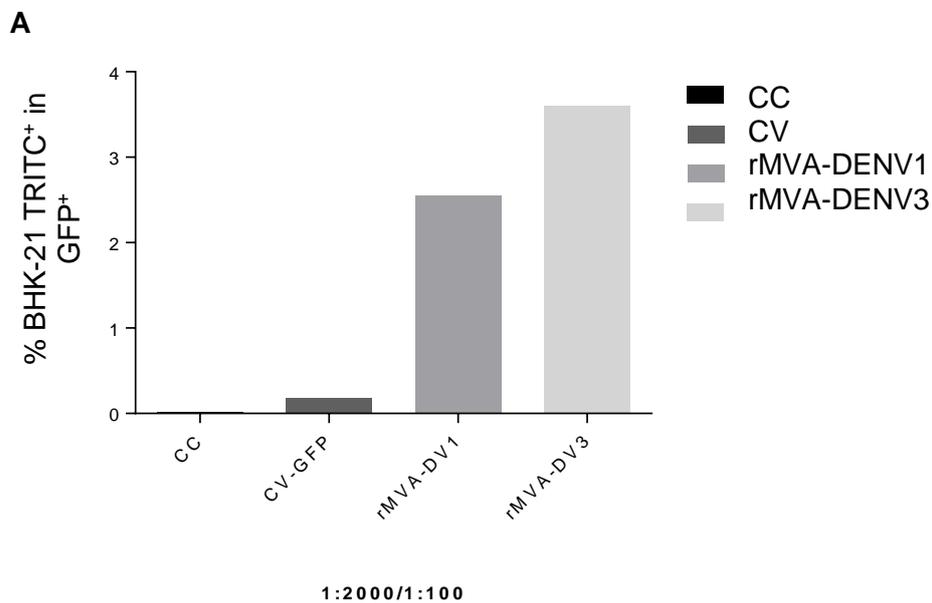
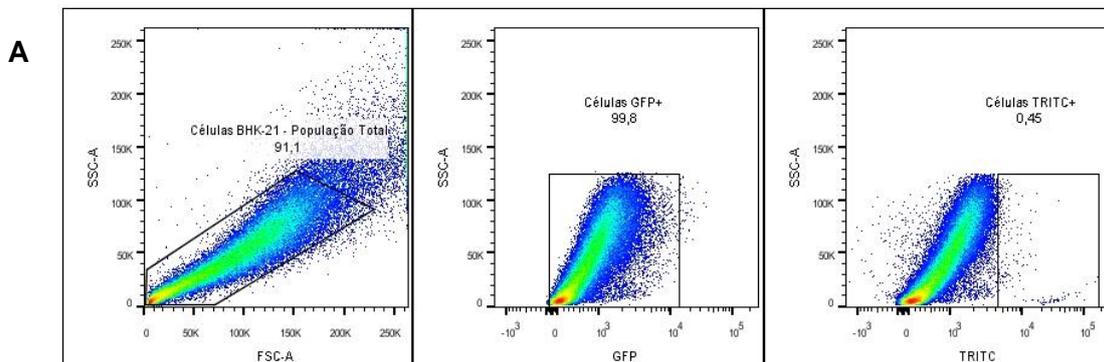
WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (2019). Dengue. Epidemiology.

Disponível em: <<https://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>> Acesso

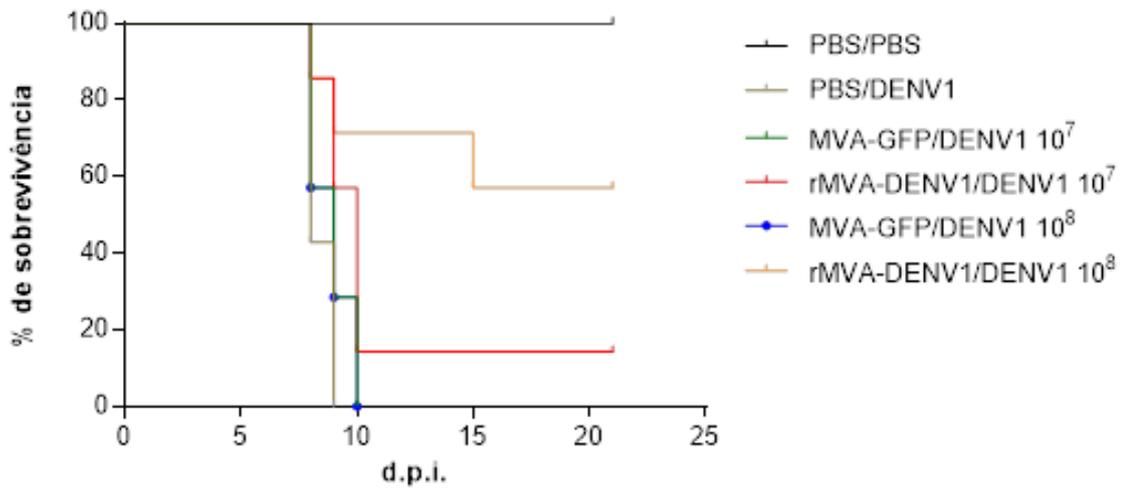
em 29 jul 2019.

ZHOU, Y., & SULLIVAN, N. J. (2015). Immunology and evolvement of the adenovirus prime, MVA boost Ebola virus vaccine. *Current opinion in immunology*, 35, 131-136.

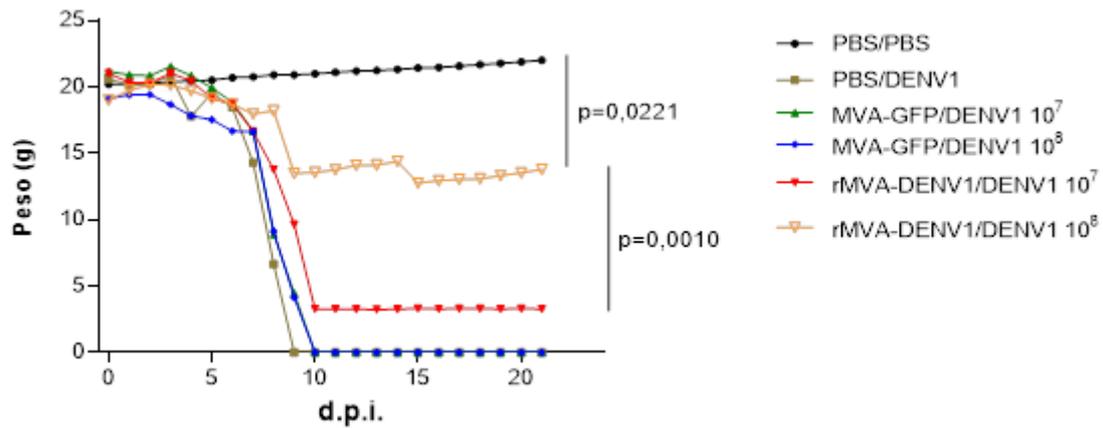
## FIGURES



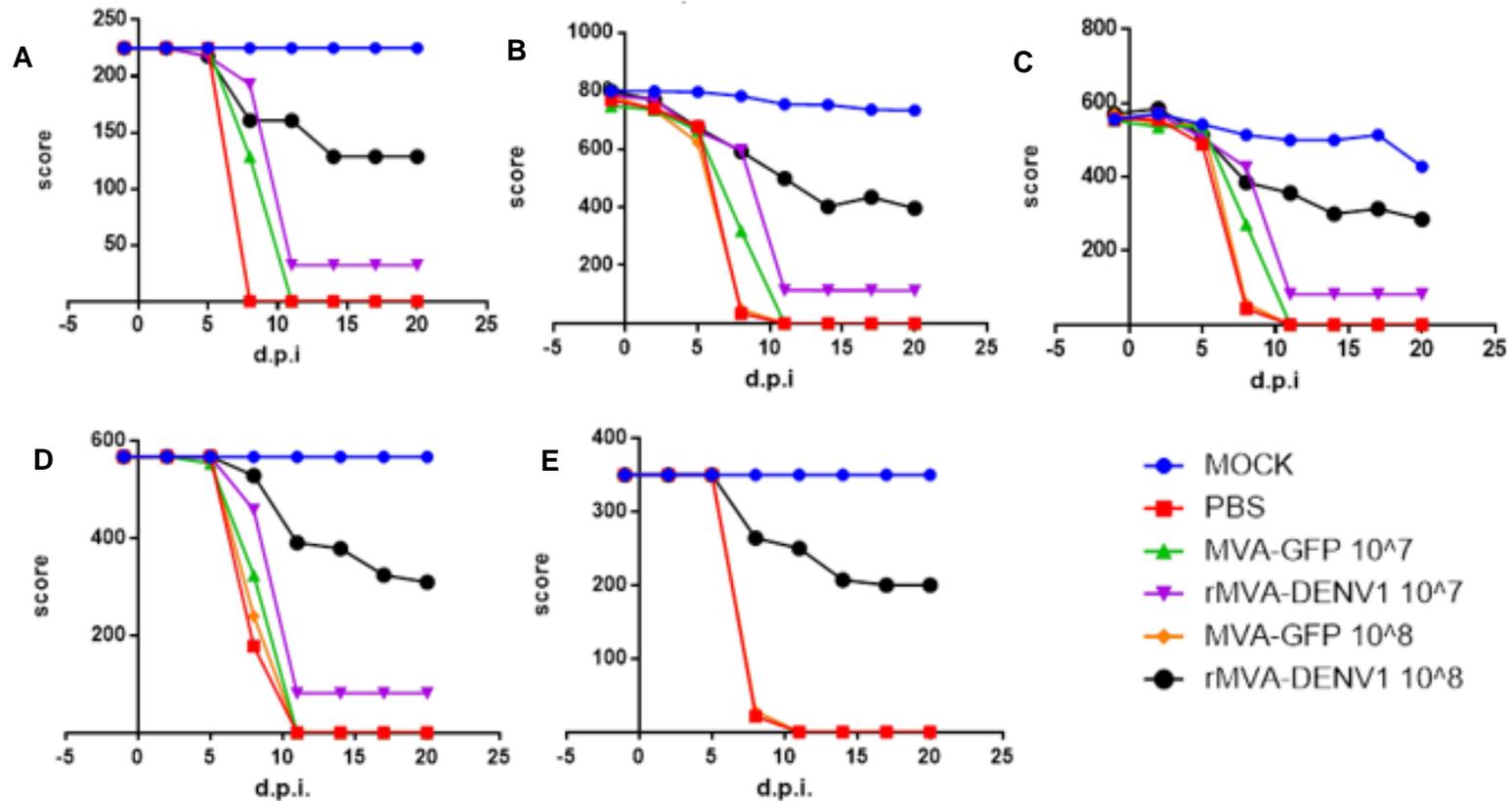
**Figure 1. Analysis of DENV1 protein E expression by recombinant MVA vectors.** A) Representative graph of the gating strategy used in the experiments using flow cytometry. B) Detection of protein E expression using 1: 200 primary ac and 1: 100 secondary ac. CC: BHK-21 cells; CV: BHK-21 infected with MVA\_GFP virus; rMVA-DENV1: BHK-21 cells infected with recombinant virus expressing DENV1 protein E; rMVA-DENV3: BHK-21 cells infected with recombinant virus expressing DENV3 E protein-positive control.



**Figure 2. Evaluation of rMVA-DENV1 vaccine protection after intracranial challenge with DENV1.** C57BL6 mice vaccinated with a homologous booster dose regimen with  $1 \times 10^7$  or  $1 \times 10^8$  rMVA-DENV1 and controls were challenged intracranially with  $2.5 \times 10^1$  of the DENV-1 Mochizuki sample and monitored daily for up to 21 days post-infection (d.p.i.) The survival curve was analyzed using the Mantel-Cox statistical method and followed by the Gehan-Breslow-Wilcoxon method using GraphPad Prism 6.01 software. A total of 7 animals per group were analyzed. Four animals survived in the  $1 \times 10^8$  rMVA-DENV1 vaccinated group and 1 animal in the  $1 \times 10^7$  rMVA-DENV1 vaccinated group, both challenged with DENV1.



**Figure 3. Weight curve of rMVA-DENV1 immunized animals at high dose following intracranial challenge with DENV1.** C57BL6 mice vaccinated with a homologous booster dose regimen with  $1 \times 10^7$  or  $1 \times 10^8$  rMVA-DENV1 and controls were challenged intracranially with  $2.5 \times 10^2$  of the DENV1 Mochizuki sample and monitored daily for up to 21 days post-infection (d.p.i.). The weight curve was analyzed using the Two-way ANOVA statistical method, followed by Tukey's test using GraphPad Prism 6.01 software. A total of 7 animals per group were analyzed.



**Figure 41. Behavioral analysis by SHIRPA protocol of animals vaccinated with the rMVA-DENV1E vaccine at different doses after intracranial challenge.** The 10<sup>7</sup> and 10<sup>8</sup> pfu vaccinated animals challenged were monitored for A) muscle strength and tone, B) motor behavior, C) neuropsychiatric status, D) autonomic function and E) sensory reflex and function. The points shown are an average of seven animals per group. The scores of vaccinated and infected animals were compared to the scores of control animals (PBS / MVA-GFP) and statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6.01 software by the nonparametric Mann-Whitney test. \* p ≤ 0.05 and \*\* p ≤ 0.005 compared to control animal scores (MOCK).