

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**RAISSA PRADO ROCHA**

**ESTUDO PRECLÍNICO DE UMA VACINA EXPERIMENTAL CONTRA DENGUE  
COMPOSTA POR VETORES ADENOVIRAIS E POXVIRAIS RECOMBINANTES**

**BELO HORIZONTE/MG**

**2019**

**RAISSA PRADO ROCHA**

**ESTUDO PRECLÍNICO DE UMA VACINA EXPERIMENTAL CONTRA DENGUE  
COMPOSTA POR VETORES ADENOVIRAIS E POXVIRAIS RECOMBINANTES**

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

Colaboração: Dr. Arturo Reyes Sandoval

**BELO HORIZONTE/MG  
2019**

043 Rocha, Raissa Prado.  
Estudo preclínico de uma vacina experimental contra dengue composta por vetores adenovirais e poxvirais recombinantes [manuscrito] / Raissa Prado Rocha. - 2019.

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

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

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

1. Microbiologia. 2. Vacinas contra Dengue. 3. Proteínas não Estruturais Virais. 4. Adenovirus. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Quinan, Bárbara Resende. III. Sandoval, Arturo Reyes. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE RAISSA PRADO ROCHA  
Nº REGISTRO: 2016667561

Às 8h30 horas do dia 20 de dezembro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Alexandre de Magalhães Vieira Machado, Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Pedro Augusto Alves, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, e o(a) Prof(a). Flávio Guimarães da Fonseca – Orientador(a), para julgar o trabalho final ESTUDO PRECLÍNICO DE UMA VACINA EXPERIMENTAL CONTRA DENGUE COMPOSTA POR VETORES ADENOVIRAIS E POXVIRAIS RECOMBINANTES, da aluna Raissa Prado Rocha, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR 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 ao(à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A)**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) 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, 20 de dezembro de 2019. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

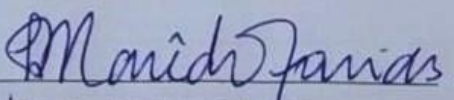
Prof(a). Dr(a). Alexandre de Magalhães Vieira Machado \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). Pedro Augusto Alves \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). Rodrigo Araújo Lima Rodrigues \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador) \_\_\_\_\_

  
p/ Profa. Betânia Paiva Drumond  
Vice-Coordenadora

## AGRADECIMENTOS

Com toda certeza, ao final destes quatro anos de doutorado, concluo que a minha formação foi além da formação acadêmica contemplado também minha formação humana e espiritual. Percebo que fui formada em muitos aspectos de minha vida e hoje, o sentimento que fica é o de gratidão.

Agradeço a Deus por todo amor e todas as bênçãos derramadas sobre minha vida, sobretudo neste período de formação acadêmica.

À minha família que nunca mediu esforços para tornar meus sonhos reais mesmo quando nem eu mesma conseguia acreditar. A minha mãe, Stael, por toda a prece feita com uma vela acesa na certeza que meu sucesso chegaria. Ao meu pai, Belmiro, que hoje no céu vibra com cada uma de minhas conquistas. E aos meus irmãos, Rafaela e Lucas, que sempre estiveram ao meu lado em toda essa jornada.

Ao meu orientador, Professor Flávio Fonseca, por toda confiança depositada em meu trabalho e por toda palavra de conforto que foi dirigida a mim nos dias difíceis.

Às professoras Edel e Jordana, pelo exemplo de competência e força que demonstraram a mim nestes anos de convivência.

Ao professor Dr. Arturo Reyes Sandoval e toda sua equipe, por todos os ensinamentos que me foram dados com muita paciência e dedicação.

À Tânia Mara, que esteve comigo nos primeiros anos de doutorado, e com toda dedicação me deu ensinamentos valiosos que nunca esquecerei.

À Dra. Barbara Quinan, pela orientação e ajuda na execução desse trabalho.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório, em especial, Gaby, Sabrynna, Ângela, Dany, Lethícia, Adriana, Duda, Thaís, Flávia e Karine pela convivência diária e pelos momentos compartilhados.

Às minhas amigas de república por todo o amor e companheirismo.

Ao Ministério Universidades Renovadas, em especial ao GOU ICB e GPP UFMG, e a todos os amigos que conquistei nesta caminhada, por viverem comigo esse Sonho de Amor.

Aos professores, técnicos e toda equipe do departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais por todo serviço prestado a mim e aos demais alunos.

“Ainda que tivesse o dom de profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência, ainda que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, e não tivesse o amor, nada seria”.

**1 Coríntios 13:2**

## RESUMO

A dengue é uma arbovirose que se destaca como um grave problema de saúde pública no Brasil. O *Dengue virus* (DENV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e seu genoma é composto por uma fita simples de RNA, com polaridade positiva. Atualmente, são caracterizados quatro sorotipos do DENV, os quais são geneticamente e antigenicamente distintos. A dengue é endêmica em mais de 100 países e aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas, o que corresponde a aproximadamente 40% da população mundial, vivem em áreas de risco para dengue. Vacinas baseadas em vetores virais têm sido amplamente estudadas tendo em vista a habilidade dos vírus recombinantes em carrear genes que codificam proteínas exógenas para dentro das células de organismos hospedeiros de forma segura e eficaz. Assim, vetores virais são caracterizados por serem excelentes imunógenos, ótimos veículos de entrega de antígenos vacinais e adicionalmente, são capazes de favorecer uma resposta imune celular, baseada em células T, as quais são benéficas em um contexto de infecção viral. Apesar do recente licenciamento de uma vacina para dengue, esta vacina vem sendo alvo de intensas discussões acerca de sua eficácia e segurança, colocando em dúvida sua aplicabilidade em programas de vacinação contra a dengue. Assim, o desenvolvimento de vacinas alternativas ainda se mantém como uma prioridade em relação à doença. Neste trabalho, sete combinações vacinais tetravalentes para dengue foram construídas a partir de dois vetores virais (Adenovírus e MVA) e administradas em camundongos através da estratégia de dose-reforço heterólogo. Tanto os ensaios para avaliação destas vacinas quanto a habilidade das mesmas em conferir proteção após o desafio intracranial com DENV em modelo murino mostraram que as vacinas NS1, as quais foram geradas contendo sequências conservadas da proteína NS1 dos DENV, não foram capazes de conferir proteção. Por outro lado as vacinas NSALL (2NSALL, 3NSALL e 4 NSALL), as quais contêm sequências concatenadas de epítomos oriundos das proteínas não estruturais do DENV, conferiram proteção parcial ou total em ensaios de desafio intracranial com os DENV. Para o desafio com a amostra de DENV-1 Mochizuki as porcentagens de sobrevivência foram 42,86% (2NSALL), 28,57% (3NSALL) e 42,86% (4NSALL). As taxas de sobrevivência resultantes no desafio com DENV-2 New Guinea C foram de 100% (2NSALL), 71,43% (3NSALL) e 71,43% (4NSALL/DENV-2). Por fim, quando os animais foram desafiados com DENV-3 amostra MG20 as taxas de sobrevivência foram de 100% (2NSALL), 100% (3NSALL) e 85,71% (4NSALL). A vacina 1NSALL não apresentou proteção na maioria dos desafios realizados. Entretanto, as vacinas 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL apresentaram resultados extremamente motivantes e os ensaios demonstram a capacidade multivalente destes candidatos vacinais em gerar resposta imune protetora para mais de um sorotipo do DENV. A imunogenicidade das vacinas foi testada em camundongos BALB/c e C57BL/6 e em ambos os modelos as vacinas foram capazes de ativar células T com atividade polifuncional. Além disso, identificamos em nosso estudo 12 epítomos de células T que são localizados nas proteínas NS3 e NS4B do DENV os quais já foram previamente descritos na literatura como epítomos promissores no desenho de imunógenos para dengue, demonstrando que as construções vacinais NSALL apresentam um grande potencial para serem utilizadas como uma vacina para dengue.

Palavras-chave: Dengue. Proteínas não estruturais. Adenovírus. MVA. Vacina.

## ABSTRACT

Dengue is an arbovirose that has been highlighted in recent years as a serious public health problem in Brazil. *Dengue virus* (DENV) belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* and its genome is composed of a single strand of RNA, with positive polarity. Currently four DENV serotypes are described, which are genetically and antigenically distinct. Dengue is endemic in more than 100 countries and approximately 2.5 billion of people, it represents approximately 40% of the world's population, live in areas at risk for dengue. Vaccines based on viral vectors have been extensively studied due to the ability of recombinant viruses to carry genes which encode exogenous proteins into the cells of host organisms in a safe and effective manner. Thus, viral vectors are characterized as excellent immunogens, excellent vaccine antigen delivery vehicles and additionally, are capable of favoring a cellular immune response, based on T cells, which are beneficial in a context of viral infection. Despite the recent licensing of a dengue vaccine, intense discussions about its efficacy and safety are still ongoing, casting doubts on its applicability in dengue vaccination programs. Thus, the development of alternative vaccines still remains a priority in relation to the disease. In this work, seven tetravalent vaccine combinations for dengue have been constructed from two viral vectors (Adenovirus and MVA) and administered to mice through the heterologous prime-boost strategy. The assays for the evaluation of these vaccines as to their ability to confer protection after the intracranial challenge with DENV showed that the NS1 vaccines, which were generated containing conserved sequences of the DENV NS1 protein, were not able to confer protection in murine model. On the other hand, NSALL vaccines (2NSALL, 3NSALL and 4NSALL), which contain sequences of the non-structural proteins of DENV, showed partial or total protection in intracranial challenge assays with the DENVs. Regarding the challenge with the DENV-1 Mochizuki strain the survival percentages were 42.86% (2NSALL), 28.57% (3NSALL) and 42.86% (4NSALL). The survival rates resulting from the challenge with DENV-2 New Guinea C were 100% (2NSALL), 71.43% (3NSALL) and 71.43% (4NSALL). Finally, when the animals were challenged with DENV-3 MG20 strain the survival rates were 100% (2NSALL), 100% (3NSALL) and 85.71% (4NSALL). The 1NSALL vaccine did not show protection in most of the challenges. However, the 2NSALL, 3NSALL and 4NSALL vaccines showed motivating results and the trials demonstrate the multivalent ability of these vaccine candidates to generate protective immune responses to more than one DENV serotype. Thus, the studies involving these vaccines can be carried out for the evaluation of the immune response and in new challenge models for dengue. In addition, in our study we identified 12 T-cell epitopes that are localized to DENV NS3 and NS4B proteins which have been previously described in the literature as promising epitopes in dengue immunogen design, demonstrating that our NSALL vaccine constructs have great potential to be used as a dengue vaccine.

Key words: Dengue. Non-structural proteins. Adenovirus. MVA. Vaccine.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia da partícula viral do <i>Dengue virus</i> .....	19
Figura 2 – Representação da estrutura dimérica da proteína E do <i>Dengue virus</i> .....	20
Figura 3 – Representação das proteínas do <i>Dengue virus</i> .....	21
Figura 4 – Esquema do ciclo de multiplicação do <i>Dengue virus</i> . .....	23
Figura 5 – Distribuição da dengue no mundo, 2014 .....	24
Figura 6 – Figura esquemática representando a hipótese do Aumento da infecção mediada por anticorpos (ADE) .....	29
Figura 7 - Teoria de células T de reação cruzada.....	30
Figura 8 – Representação da composição e estrutura do Adenovírus.....	39
Figura 9 – Partícula viral do MVA .....	42
Figura 10 - Esquema representativo da metodologia utilizada.....	55
Figura 11-Representação esquemática das vacinas NS1 nas construções em Vetor Adenoviral .....	59
Figura 12 – Representação esquemática das vacinas NSALL.....	59
Figura 13 – Avaliação da proteção das vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-1 .....	71
Figura 14 - Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-1 .....	72
Figura 15 – Avaliação da proteção das vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-2 .....	73
Figura 16 - Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-2. DENV-2).....	74
Figura 17 –Avaliação da proteção das vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-3. ....	75
Figura 18 - Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-3.....	77
Figura 19 – Avaliação da proteção das vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-1.....	78
Figura 20- Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-1 .....	80

Figura 21 – Avaliação da proteção das vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-2 .....	81
Figura 22 - Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-2 .....	82
Figura 23 - Avaliação da proteção das vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-3 .....	83
Figura 24 - Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-3. ....	84
Figura 25 - Avaliação da resposta imune celular após imunização em regime heterólogo com as vacinas NSALL .....	86
Figura 26 - Desenho da placa de ELISpot para triagem dos peptídeos sobrepostos de NS3, NS4 e NS5 .....	87
Figura 27 - Resultado da placa ELISpot após estimulação das células com os peptídeos sobrepostos de NS3 e marcação com anticorpos anti- IFN- $\gamma$ .....	88
Figura 28 - Triagem dos peptídeos cobrindo a proteína NS3, NS4 e NS5 do DENV em camundongos BALB/c.....	90
Figura 29 -Estratégia de gate para a identificação de linfócitos TCD8+ e TCD4+ produtores de IFN- $\gamma$ .....	92
Figura 30 - Identificação dos epítomos de células T por FACS .....	93
Figura 31 - Análise as produção da citocina TNF- $\alpha$ e do marcador de superfície CD107a por linfócitos TCD8+ de camundongos BALB/c estimulados com os peptídeos de NS3 .....	96
Figura 32 - Alinhamento dos peptídeos identificados como epítomos de células T CD8+ para camundongos BALB/c com a poliproteína do Dengue virus .....	98
Figura 33 - Avaliação da resposta imune celular após imunização em regime heterólogo com as vacinas NSALL.....	99
Figura 34 - Triagem dos peptídeos cobrindo a proteína NS3, NS4 e NS5 do DENV em camundongos C57BL/6. ....	100
Figura 35– Identificação dos epítomos de células T por FACS.....	102
Figura 36 - Análise da produção da citocina TNF- $\alpha$ e do marcador de superfície CD107a por linfócitos TCD8+ de camundongos BALB/c estimulados com os peptídeos de NS3. ....	104
Figura 37– Alinhamento dos peptídeos identificados como epítomos de células T CD8+ para camundongos C57BL/6 com a poliproteína do Dengue virus.....	107

<b>Figura 38– Variantes dos peptídeos NS4-19, NS4-20 e NS4-32 preditos pelo programa NetMHC.....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 39 - ELISpot para a obtenção da sequência otimizada dos epítomos de células T .....</b>	<b>110</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dengue no Brasil, 1845-2010.....	25
Tabela 2 – Nova classificação dos casos de Dengue, 2014.....	27
Tabela 3 – Resumo dos estudos com DENV desenvolvidos em modelo animal.....	37
Tabela 4 – Adenovírus de Chimpanzé como vetores vacinais.....	41
Tabela 5 – Aplicações do MVA como vetor vacinal.....	44
Tabela 6 – Vacinas licenciadas ou em estudos de fase clínica para dengue. ....	51
Tabela 7 – Parâmetros avaliados pelo protocolo SHIRPA.....	64
Tabela 8- Determinação das doses letais de DENV por infecção pela via intracraniana.....	70
Tabela 9 – Avaliação da proteção gerada após imunização com as vacinas NSALL após o desafio intracranial com os sorotipos do DENV. ....	85
Tabela 10 - Peptídeos positivos no ensaio de ELISpot para camundongos BALB/c.....	91
Tabela 11 - Produção da citocina IFN- $\gamma$ pelas células CD4+ ou CD8+ frente à estimulação com os peptídeos. ....	94
Tabela 12 - Peptídeos identificados como regiões imunodominantes para camundongos BALB/c (alelos H2-Kd, H2-Dd e H2-Ld) presentes nas vacinas NSALL. ....	95
Tabela 13 - Porcentagem de linfócitos TCD8+ de camundongos BALB/c que apresentaram o fenótipo IFN+TNF+ e IFN+CD107+ após estimulação com os peptídeos.....	97
Tabela 14 - Peptídeos positivos no ensaio de ELISpot para camundongos BALB/c.....	101
Tabela 15 - Produção da citocina IFN- $\gamma$ pelas células CD4+ ou CD8+ frente à estimulação com os peptídeos. ....	103
Tabela 16 - Peptídeos identificados como regiões imunodominantes para camundongos C57BL/6 (alelos H2-Db e H2-kb) presentes nas vacinas NSALL. ....	104
Tabela 17 - Porcentagem de linfócitos TCD8+ de camundongos C57BL/6/c com fenótipo IFN+TNF+ e IFN+CD107+ após estimulação com os peptídeos.....	106

Tabela 18 - Peptídeos preditos pelo programa NetMHC para a ligação ao MCH de classe 1 para os haplótipos H-2-Db e H-2-kb. ....	108
Tabela 19 - Epítomos de células TCD8+ para camundongos da linhagem C57BL/6.....	110

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ADE - *Antibody-dependent enhancement*

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHK-21 - Baby Hamster Kidney cells

BOD - Biologic oxigen demand

C - proteína do Capsídeo

CEF - Fibroblastos de Embrião de Galinha

CLEL5A - *C-type lectin domain family 5 member A*

DC-SIGN - *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*

DENV - *Dengue virus*

DG - dengue grave

DSA - dengue com sinais de alarme

DI – domínio I

DII – domínio II

DIII – domínio III

DMEM - Meio Mnimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO - dimetilsulfxido

DR – dose reforço

E - proteína do Envelope

ELISpot - Enzyme-linked immune absorbent spot

FACS - Fluorescence Activated Cell Sorter

FD – Febre do Dengue

FHD - Febre Hemorrgica do Dengue

FRhL - Fetal rhesus monkey lung cells

GSK - *GlaxoSmithKline*

HIV-1 - *Human Immunodeficiency Virus type 1*

HLA - Human leukocyte antigen

HSC - *hematopoietic stem cells*

ICS - Citocinas Intracitoplasmáticas

IFN - interferon gama

IL - interleucina

Kb – kilobases

kDa – kilodaltons

L15 - *Leibowitz medium*

LD<sub>50</sub> – dose letal cinquenta

M - proteína de Membrana

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos- 1

MHC-I - major histocompatibility complex class I

MOI – multiplicidade de infecção

MVA - Vaccinia Ankara Modificado

NGC - New Guinea C

NIAID - Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas

nm – nanômetros

NMRC - Naval Medical Research Center

NS – proteína não estrutural

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF - *open reading frame*

*PDK - primary dog kidney cells*

*PMA - Phorbol 12-myristate 13-acetate*

*prM - proteína precursora de membrana*

*qPCR – PCR quantitativo*

*RdRp - RNA polimerase dependente de RNA*

*SCD - Síndrome do Choque da Dengue*

*SCID - Severe Combined Immunodeficiency*

*SE – semana epidemiológica*

*RE - retículo endoplasmático*

*Rpm – rotações por minuto*

*RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*

*TCID<sub>50</sub> - Median Tissue Culture Infectious Dose*

*TNF - fator de necrose tumoral*

*UFP – Unidade formadora de placa*

*VACV - Vaccinia virus*

*UTR - untranslated region*

*WRAIR - Walter Reed Army Institute of Research*



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	<i>Dengue virus</i> .....	18
1.2	CICLO DE MULTIPLICAÇÃO .....	22
1.3	DENGUE: EPIDEMIOLOGIA .....	23
1.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÊNESE .....	26
1.5	MODELOS MURINOS .....	30
1.5.1	Camundongos imunocompetentes.....	31
1.5.1.1	Infecção intracraniana como estratégia para validação de imunógenos para dengue	32
1.5.2	Camundongos imunodeficientes .....	33
1.5.3	Camundongos humanizados .....	35
1.6	VÍRUS RECOMBINANTES COMO VETORES VACINAIS .....	37
1.6.1	Adenovirus recombinantes como vetores vacinais .....	38
1.6.2	Poxvírus recombinantes como vetores vacinais .....	41
1.6.3	Protocolo heterólogo como estratégia para aumentar eficácia de candidatos vacinais.....	46
1.7	VACINAS PARA A DENGUE.....	47
2	JUSTIFICATIVA.....	52
3	OBJETIVOS.....	54
3.1	OBJETIVO GERAL .....	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	54
4	METODOLOGIA .....	55
4.1	ESTRATÉGIA DE TRABALHO RESUMIDA.....	55
4.2	CÉLULAS .....	56
4.2.1	Células C6/36 ( <i>Aedes albopictus</i> ).....	56
4.2.2	BHK-21.....	56
4.3	VACINA TETRAVALENTE EXPERIMENTAL CONTRA DENGUE .....	56
4.4	<i>Dengue virus</i> .....	59
4.4.1	DENV-1, DENV-2 E DENV-3.....	60
4.5	CAMUNDONGOS .....	60
4.6	PRODUÇÃO DE ESTOQUES DE <i>Dengue virus</i> 1, 2, e 3 .....	60
4.7	TITULAÇÃO VIRAL .....	61

4.8	DETERMINAÇÃO DAS DOSES LETAIS DOS DENVs POR INOCULAÇÃO INTRACRANIANA DE CAMUNDONGOS .....	62
4.9	ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO .....	62
4.10	DESAFIO .....	63
4.11	SHIRPA.....	63
4.12	ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE.....	64
5	RESULTADOS.....	69
5.1	DETERMINAÇÃO DAS DOSES LETAIS .....	69
5.2	DESAFIOS E ANÁLISES COMPORTAMENTAIS .....	70
5.2.1	Vacinas NS1 .....	70
5.2.2	Vacinas NSALL .....	78
5.3	ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE FRENTE A IMUNIZAÇÃO COM AS VACINAS NSALL .....	85
5.3.1.1	Análises da imunogenicidade das vacinas NSALL.....	85
5.3.1.2	Identificação de epítomos de células T por ELISpot.....	86
5.3.1.2	Identificações de epítomos de células T por FACS.....	91
5.3.1.1	Identificação de epítomos de células T por ELISpot.....	99
5.3.2.2	Identificação de epítomos de células T por FACS.....	101
5.3.2.3	Predição de epítomos de células T pelo software NetMHC.....	108
6	DISCUSSÃO .....	111
7	CONCLUSÕES .....	116
8	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	117
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	118
	ANEXO I (CEUA) .....	128
	ANEXO II .....	129
	ANEXO III .....	134
	ANEXO IV .....	139

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Dengue virus*

O *Dengue virus* (DENV) é um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*. Atualmente são caracterizados quatro sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), os quais são geneticamente e antígenicamente distintos. A transmissão do vírus para os seres humanos é dada através da picada de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* (CHAWLA; YADAV; CHAWLA, 2014; SCREATON et al., 2015).

O DENV apresenta partícula viral envelopada, com tamanho aproximado de 50 nanômetros (nm) de diâmetro. Seu genoma é constituído por RNA de fita simples com polaridade positiva e tamanho aproximado de 11 kilobases (Kb), que possui uma janela de leitura aberta (ORF) que codifica uma única poliproteína que deve ser processada para dar origem a três proteínas estruturais (proteína do Capsídeo - C, proteína de Membrana - M e proteína do Envelope - E) e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (DE ANGEL; VALLE, 2013; SCREATON et al., 2015).

Além disso, o genoma viral contém regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR) que contém estruturas secundárias essenciais para a tradução, replicação do genoma e montagem da partícula viral e uma estrutura de cap na região 5', a qual previne a degradação do RNA e permite sua interação com o ribossomo para a tradução (DECROLY et al., 2012; SAHILI; LESCAR, 2017).

Assim, a partícula viral é composta por um RNA genômico, envolvido por um capsídeo proteico formado pela proteína C e este, envolto por uma membrana lipídica, onde se encontram inseridas as proteínas E e M (Figura 1) (DE ANGEL; VALLE, 2013; SCREATON et al., 2015).

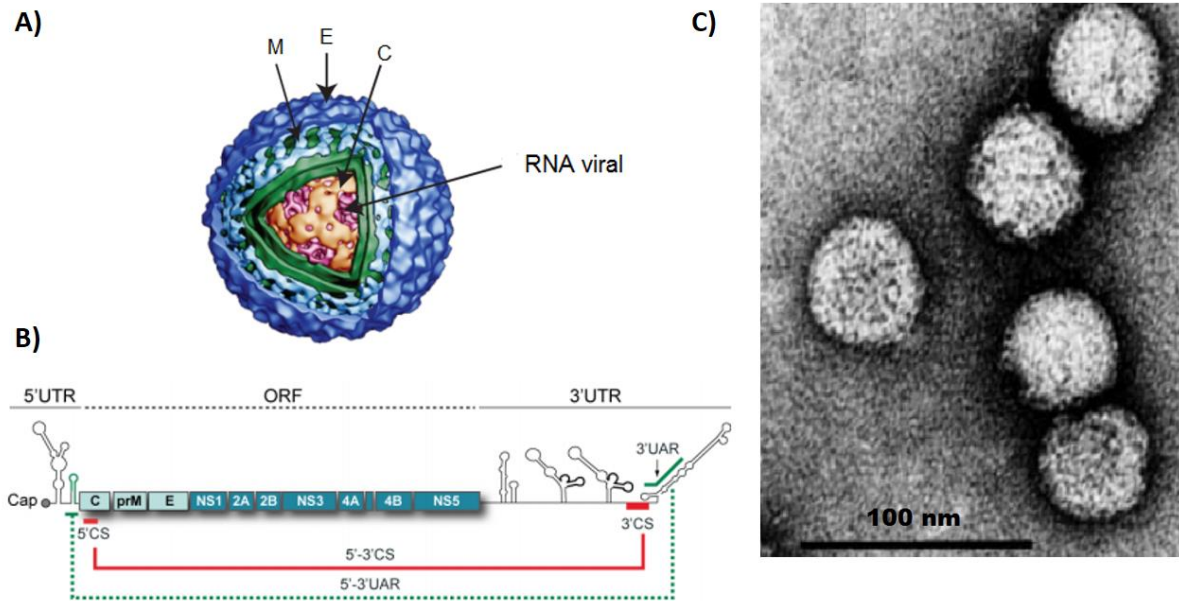


Figura 1 – **Morfologia da partícula viral do *Dengue virus*.** A) Desenho da partícula viral evidenciando a posição do genoma viral (RNA viral) e suas proteínas estruturais: membrana (M), envelope (E) e capsídeo (C). B) Estrutura do RNA viral. C) Micrografia eletrônica da partícula do *Dengue virus*. Fonte: Adaptado de DE ANGEL; VALLE, 2013; GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011; LINDENBACH; RICE, 2003.

A proteína do capsídeo possui massa atômica de 11 Kilodaltons (kDa). Com caráter altamente básico, esta proteína possui resíduos carregados encontrados nas extremidades amina e carboxi terminais e participa da formação do complexo ribonucleoprotéico através do empacotamento do RNA genômico (LINDENBACH; RICE, 2003; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A proteína precursora de membrana (prM) é uma proteína glicosilada de massa aproximada de 21 kDa. O processamento da prM ocorre durante a maturação e no processo de liberação das partículas virais por exocitose. A proteína prM é clivada por proteases do tipo furina, permitindo a liberação do fragmento pr da proteína M (8 kDa). O fragmento pr permanece associado à partícula viral até que esta seja liberada da célula infectada (LINDENBACH; RICE, 2003; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A proteína E é a proteína do DENV melhor caracterizada. Sua estrutura tridimensional (Figura 2) é formada por um complexo dimérico com duas subunidades iguais, sendo que cada monômero é subdividido em três domínios distintos: o domínio I (DI), ou domínio central, com aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos, o qual está envolvido na mudança conformacional gerada por alterações no pH. O domínio II (DII), ou também chamado de

domínio de dimerização, possui uma alça altamente conservada que funciona como um peptídeo de fusão interna, desempenhando um papel importante na fusão do envelope viral à membrana endossomal. O domínio III (DIII) está envolvido com a ligação aos receptores celulares e é responsável pela indução de elevados títulos de anticorpos neutralizantes específicos anti-DENV (HUANG et al., 2010; REY et al., 1995).

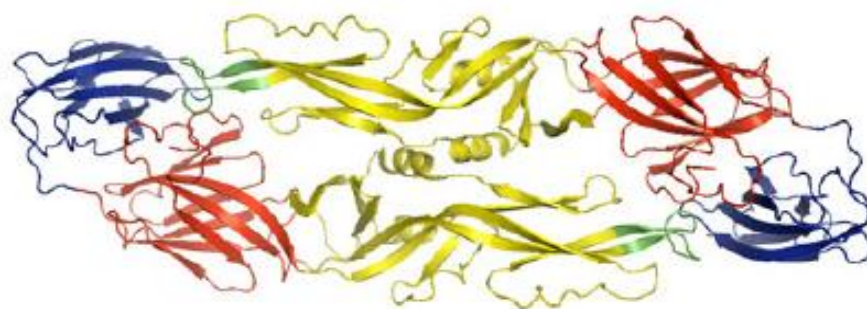


Figura 2 – **Representação da estrutura dimérica da proteína E do *Dengue virus*.** Em vermelho, o domínio I, em amarelo, domínio II com a alça de fusão em verde e em azul, domínio III. Fonte: RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010.

As proteínas não estruturais do DENV estão envolvidas com a replicação viral, montagem e a modulação da resposta imune (LINDENBACH; RICE, 2003; SAHILI; LESCAR, 2017).

A proteína não estrutural NS1 possui aproximadamente 46 kDa e pode ser encontrada no interior da célula infectada, em sua superfície ou ainda pode ser secretada para o meio extracelular. Esta proteína é altamente conservada entre os sorotipos de DENV, está envolvida na replicação viral e na inibição da resposta imune do hospedeiro mediada por complemento. Além disso, estudos apontam que o aumento de NS1 solúvel no soro está relacionado com o aumento da viremia e gravidade da doença (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; LINDENBACH; RICE, 2003; PAWITAN, 2011).

A proteína NS2a (22 kDa) é uma proteína de membrana de caráter hidrofóbico e é necessária para replicação e montagem do vírus, enquanto NS2B (14 kDa) é associada à membrana e atua como cofator para a proteína NS3 viral (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; LINDENBACH; RICE, 2003).

Desempenhando um dos maiores papéis na replicação viral, a proteína NS3 (70 kDa), possui diversas atividades enzimáticas, contendo um domínio serino-protease localizado na porção C-terminal e domínios helicase, NPTase e RTPase presentes na região N-terminal. Esta proteína é conservada entre os sorotipos do DENV e considerada um dos maiores alvos de linfócitos T CD4+ e CD8+ durante a infecção viral. Adicionalmente, a proteína NS3 está envolvida no processamento da poliproteína viral e na replicação do RNA (HURTADO-MELGOZA et al., 2016; ROTHMAN, 2004; SAHILI; LESCAR, 2017).

NS4a e NS4b são proteínas de massa 16 e 27 kDa, respectivamente. NS4a atua como uma estrutura de suporte para o complexo de replicação, está envolvida no rearranjo de membranas celulares e induz aumento da replicação viral, enquanto NS4b tem capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro suprimindo as vias de sinalização de interferon  $\alpha/\beta$  e também atua na replicação viral em associação com a proteína NS3 (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; LINDENBACH; RICE, 2003; SAHILI; LESCAR, 2017; UMAREDDY et al., 2006).

A proteína NS5 possui massa de 102 kDa e é a proteína mais conservada entre os sorotipos virais. Esta, contém domínios com atividade metiltransferase e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), estando portanto, envolvida na replicação do RNA e possuindo também, atividade do tipo *capping* (adição de nucleotídeo metilado à extremidade 5') do RNA viral. Além disso, a proteína NS5 é capaz de interferir na resposta imune do hospedeiro pela diminuição da resposta de interferon e atua no escape do sensoriamento por células hospedeiras (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; SAHILI; LESCAR, 2017).

As principais proteínas do DENV citadas anteriormente estão representadas na Figura 3.

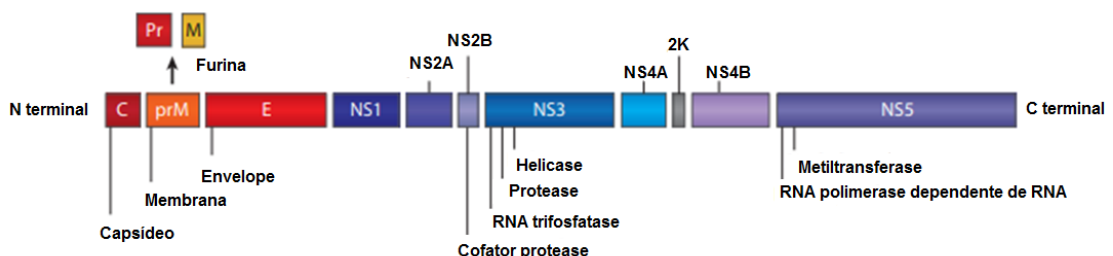


Figura 3 – **Representação das proteínas do *Dengue virus***. As proteínas do DENV com suas principais funções descritas na literatura. Fonte: Adaptado de ELONG NGONO; SHRESTA, 2018.

## 1.2 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO

Ao ser inoculado no hospedeiro através da picada de mosquitos fêmeas infectadas, do gênero *Aedes* sp, o DENV se adere às células alvo, através da interação de sua proteína E com receptores presentes em diversas linhagens celulares, tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas (incluindo células de Langerhans residentes na pele), linfócitos, hepatócitos, células de Kupffer, neurônios e micloglia (REYES-DEL VALLE et al., 2014). Diversos trabalhos apontam que esta interação se dá através de receptores DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), receptores de manose, várias glicoproteínas (como por exemplo Sulfato de Heparina) e o receptor do tipo lectina C (CLEL5A) (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013).

Esta interação ocasiona a formação de uma vesícula endocítica que permite a penetração do vírus na célula. A acidificação da vesícula ( $\text{pH} < 6,5$ ) induz uma alteração conformacional da proteína E, favorecendo assim o rearranjo dos dímeros de proteína E para trímeros. Este fenômeno propicia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e permite a liberação do capsídeo no citoplasma da célula juntamente com o RNA viral. Após o desnudamento e liberação do RNA viral, este é traduzido em uma poliproteína associada ao retículo endoplasmático rugoso, a qual é clivada por proteases celulares e virais. Após a tradução do RNA e síntese da poliproteína viral, inicia-se a replicação do genoma do vírus por meio da produção de uma fita molde de polaridade negativa e subsequente geração de novas fitas de RNA de polaridade positiva (Figura 4) (HEINZ; STIASNY, 2012; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

O RNA genômico de polaridade positiva é sintetizado e subsequentemente empacotado pela proteína C para formar o nucleocapsídeo. As proteínas prM e E formam heterodímeros que são orientados para dentro do lúmen do retículo endoplasmático. A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE) conduzindo à formação de partículas imaturas não infecciosas, que são transportadas através da via exocítica da célula. O pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) provoca um rearranjo das proteínas do envelope, o que favorece a clivagem da proteína prM pela protease celular furina em fragmentos denominados de pr e M. Desta forma, a partícula viral torna-se madura, e o vírus infeccioso é liberado para o meio extracelular (HEINZ; STIASNY, 2012; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

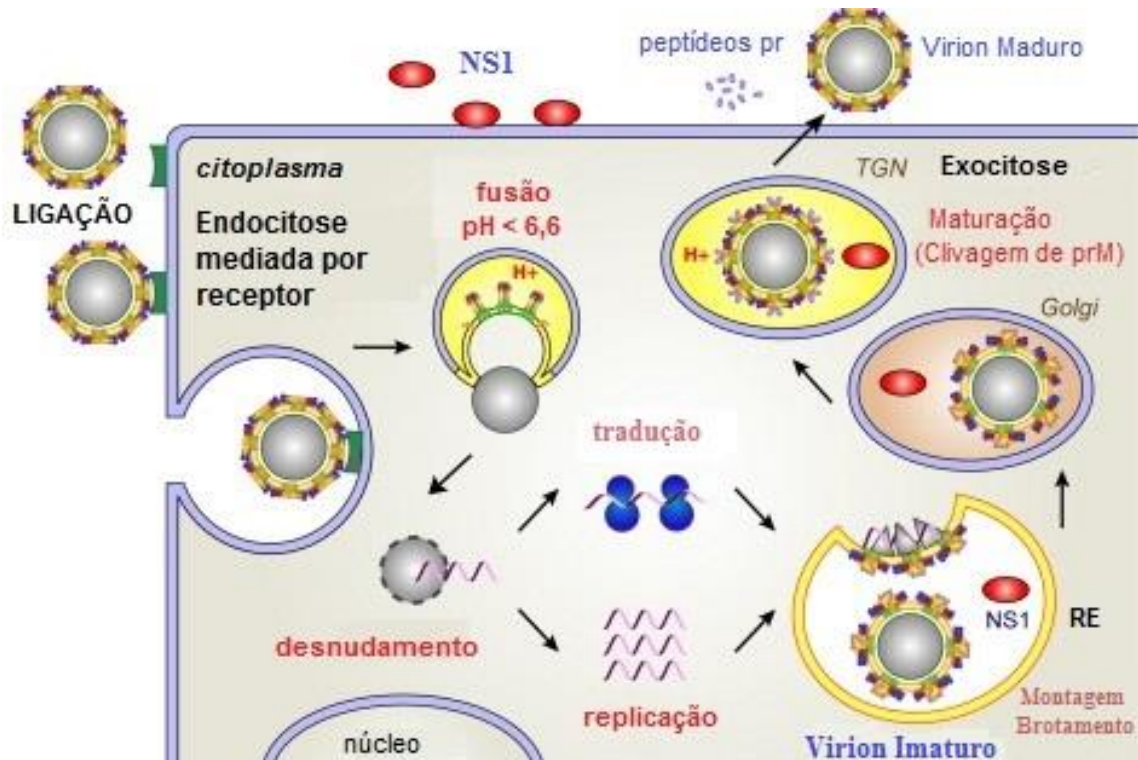


Figura 4 – **Esquema do ciclo de multiplicação do Dengue virus.** O DENV se adere às células alvo e a interação de sua proteína E com os receptores celulares leva à formação de uma vesícula endocítica que permite a penetração do vírus na célula. A acidificação da vesícula ( $\text{pH} < 6,5$ ), propicia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e permite a liberação do capsídeo no citoplasma da célula, juntamente com o RNA viral. Após a tradução do RNA e síntese da poliproteína viral, inicia-se a replicação do genoma do vírus. O RNA genômico é sintetizado e subsequentemente empacotado. A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE) conduzindo à formação de partículas imaturas não infecciosas, que são transportadas através da via exocítica da célula. O pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) provoca um rearranjo das proteínas do envelope, o que favorece a maturação da partícula viral, e o vírus infeccioso é liberado para o meio extracelular. Fonte: Adaptado de HEINZ; STIASNY, (2012, p. 4303).

### 1.3 DENGUE: EPIDEMIOLOGIA

As primeiras epidemias por dengue iniciaram-se nos anos 1779-1780, na Ásia, África e América do Norte. Acredita-se que a presença de mudanças ecológicas na época, combinadas ao crescimento da população e urbanização não planejada tenham favorecido a expansão geográfica do vetor e o espalhamento do DENV (FARES et al., 2015; GUBLER, 1997).

Atualmente, dengue é endêmica em mais de 100 países da África, das Américas, de Regiões do Leste Mediterrâneo, Sudeste da Ásia e Oeste do Pacífico (Figura 5). Sendo que mais de 2,5 bilhões de pessoas, o que corresponde a aproximadamente 40% da população mundial,



vivem em áreas de risco para dengue. Segundo a OMS, a incidência da dengue aumentou cerca de trinta vezes em 50 anos (WHO, 2009).

Estimativas apontam que aproximadamente 390 milhões de pessoas são infectadas pelo DENV, sendo que 96 milhões manifestam a doença no mundo todo, superando as estimativas da OMS (BHATT et al., 2013; WHO, 2018).

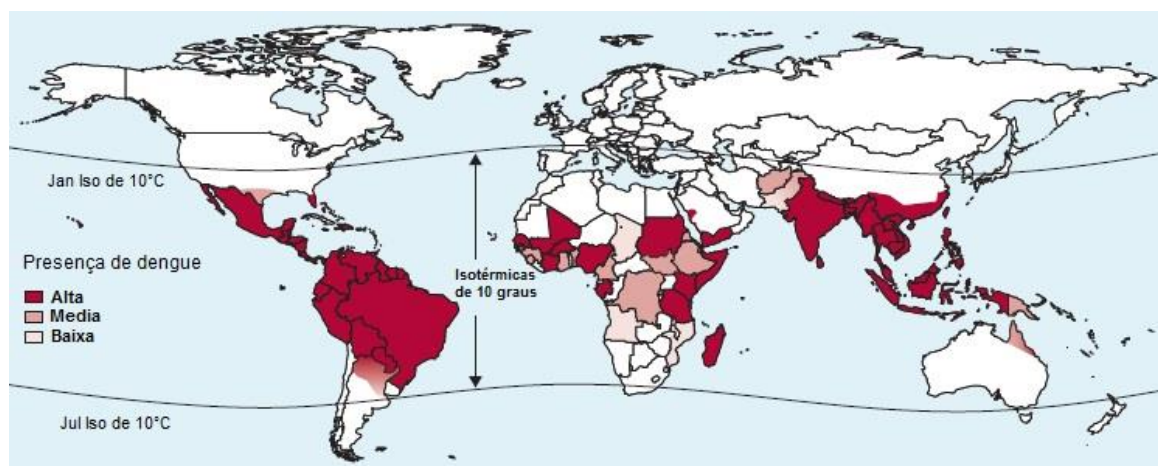


Figura 5 – **Distribuição da dengue no mundo, 2014.** A figura mostra que distribuição da dengue ocorre principalmente em regiões tropicais, caracterizadas por altas temperaturas e umidade. Os países com alta predominância do DENV estão apresentados entre as isotérmicas de 10° C (faixas de temperatura média constante), com uma coloração vermelha, e a cor vai diminuindo de acordo com a menor predominância do DENV. Fonte: Adaptado de GUZMAN; HARRIS, 2015.

O clima do Brasil propicia condições favoráveis para o desenvolvimento e sobrevivência do vetor *Aedes aegypti*, uma vez que o país se localiza em região tropical com o clima caracterizado por altas temperaturas, alta umidade e variações sazonais de chuva (PASTRANA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2013).

A presença de dengue no Brasil iniciou-se em 1845, quando foi reportada uma epidemia de dengue no Rio de Janeiro por um sorotipo desconhecido do DENV e desde então o país reportou em períodos diversos, vários casos de dengue em diferentes estados e com a presença de circulação de sorotipos distintos (Tabela 1)(FARES et al., 2015).

Tabela 1 – Dengue no Brasil, 1845-2010.

Ano	Atividade reportada	Sorotipo do DENV	Localização
1845	1º epidemia de dengue	Desconhecido	Rio de Janeiro
1981	1º epidemia de dengue no Brasil após a reinfestação de <i>Aedes aegypti</i>	DENV-1 DENV-4	Roraima
1986-1987	Epidemia	DENV-1	Rio de Janeiro
1990	Primeira identificação do DENV-2	DENV-2	Rio de Janeiro
1990-2000	DENV se espalha intensificadamente	DENV-1 DENV-2	Regiões Sudeste e Nordeste
2000	Primeira aparição do DENV-3 no Brasil	DENV-3	Rio de Janeiro
2002	Uma das maiores epidemias de dengue no Brasil desde a emergência do vírus	DENV-3	Rio de Janeiro
2000-2007	O Brasil reporta > 60% dos casos de dengue registrados no mundo	DENV-1 DENV-2 DENV-3	Todos os estados brasileiro
2007-2008	Surto intenso com altos números de casos graves e fatalidades	DENV-2	Rio de Janeiro
2009	Grande surto de dengue	DENV-2	Espírito Santo
2010	Reemergência do DENV-4	DENV-4	Roraima, Amazonas, Amapá, Pará, São Paulo e Rio de Janeiro

Fonte: Revisto por FARES et al., 2015

Segundo o Boletim Epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde, em 2019, até a Semana Epidemiológica (SE) 44 (30/12/2018 a 02/11/2019), foram registrados 1.504,700 casos prováveis de dengue no país, como uma taxa de incidência de 716,0 casos por 100 mil habitantes. Esses casos foram distribuídos pelas regiões Centro-Oeste (1.266,5 casos/100 mil habitantes), regiões Sudeste (1.155,2 casos/100 mil habitantes), Nordeste (361,6 casos/ 100 mil habitantes), Norte (154,8 casos/100 mil habitantes) e Sul (141,9 casos/100 mil habitantes) (ETAPA; EPIDEMIOL; EPIDEMIOL, 2019).

Em relação aos casos graves, até a SE 44, foram confirmados 1.334 casos de dengue grave (DG) e 17.694 casos de dengue com sinais de alarme (DSA), contudo 1.460 casos permanecem sob investigação. Até o momento, foram confirmados 710 óbitos por dengue (310 ainda estão em investigação), sendo 88 dos casos por critério clínico epidemiológico (ETAPA; EPIDEMIOL; EPIDEMIOL, 2019).

De acordo com os isolamentos virais realizados no ano de 2019, 1993 amostras (66,1%) foram positivas para o DENV-2, sendo o sorotipo viral mais frequente, como exceção da região nordeste na qual também foi detectado o sorotipo DENV-1. Nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná foram detectados três sorotipos do DENV nas amostras analisadas (DENV 1, 2 e 4) (ETAPA; EPIDEMIOL; EPIDEMIOL, 2019).

#### 1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÊNESE

A dengue possui um amplo espectro de manifestações clínicas, que varia entre uma infecção assintomática e sintomas graves que levam o indivíduo à morte. Quando manifestada sintomaticamente, a doença pode se apresentar como Febre indiferenciada, Febre do Dengue (FD) e a forma mais grave, denominada de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD). A FHD, pode atingir os graus de gravidade III e IV, sendo definida como Síndrome do Choque da Dengue (SCD) (WHO, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil adotou em 2014 uma nova classificação de casos de dengue sugerida pela OMS. Os casos são classificados como Dengue Provável, Dengue com Sinais de Alarme (DCSA) e Dengue Grave (DG) conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Nova classificação dos casos de Dengue, 2014.

**Dengue Provável**

O indivíduo vive ou tenha viajado para área endêmica, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações:

Náusea, vômitos;  
Exantema;  
Mialgias, artralgia;  
Cefaleia, dor retroorbital;  
Petéquias ou prova do laço positiva;  
Leucopenia.

**Dengue com Sinais de Alarme**

Tratam-se dos casos em que no período de defervescência da febre apresenta um ou mais dos seguintes sinais de alarme:

Dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdômen;  
Vômitos persistentes;  
Acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico);  
Sangramento de mucosas;  
Letargia ou irritabilidade;  
Hipotensão postural (lipotímia);  
Hepatomegalia maior do que 2 cm;  
Aumento progressivo do hematócrito.

**Dengue Grave**

São todos os casos de dengue que apresentem um ou mais dos seguintes resultados:

Choque, extremidades frias;  
Pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente  $\leq 20$  mm hg;  
Hipotensão arterial;  
Acúmulo de líquidos com insuficiência respiratória;  
Sangramento grave, segundo a avaliação do médico;  
Comprometimento grave de órgãos tais como: dano hepático importante (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase  $>1000$ ), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos.

Fonte: Adaptado de WHO, 2009.

O quadro clássico da febre do dengue caracteriza-se por febre alta, de início abrupto, acompanhada por cefaleia, mialgia, dor retroorbital, náuseas, exantema macular ou maculopapular, petéquias e a viremia se inicia 3-4 dias após a picada do mosquito (ELONG NGONO; SHRESTA, 2018; GARCÍA-RIVERA; RIGAU-PÉREZ, 2002).

As formas graves da doença (FHD/SSD) demandam atenção ao paciente principalmente por ser potencialmente fatal. As características clínicas da FHD estão relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular acompanhada por trombocitopenia, alteração da homeostase, além de danos ao fígado, indicado pelo aumento sérico das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, e outros órgãos, como cérebro, com aparecimento de encefalites. Observam-se, ainda, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes e de outros mediadores produzidos por células fagocíticas (ELONG NGONO; SHRESTA, 2018; HALSTEAD, 2007).

O quadro de dengue grave também pode evoluir para um quadro extremo (SCD), iniciando-se por dor abdominal intensa e apresentando sinais de insuficiência circulatória com pulso rápido e fraco, diminuição da pressão ou hipotensão, reperfusão capilar prolongada, pele fria e úmida e agitação. O choque acontece rapidamente, podendo levar o paciente ao óbito em 24 horas ou a uma recuperação quando acompanhada por reposição adequada de fluidos e eletrólitos (SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007).

A patogênese da dengue é marcada por uma hiperativação de células imunes, levando a uma produção exacerbada de citocinas e outros mediadores, que acarreta em um aumento da permeabilidade vascular e danos teciduais. Estudos clínicos em pacientes com FHD/SCD indicaram altos níveis séricos de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, CXCL8, IL-10, IL-13, IL-18, Proteína quimiotática de monócitos- 1 (CCL2), interferon gama (IFN- $\gamma$ +), interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (AZEREDO et al., 2001; BASU; CHATURVEDI, 2008; BOZZA, 2008; CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006; DONG et al., 2007; GREEN et al., 1999; HOBBER et al., 1993; KURANE et al., 1991; SHRESTA et al., 2006; SUHARTI et al., 2003 revisto por RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; KUCZERA et al., 2018).

Diversos mecanismos têm sido estudados a fim de se entender a patogênese da FHD/SCD, principalmente em infecções secundárias causadas pelo DENV. Pesquisas apontam para duas teorias que tentam explicar tal fenômeno: a) Aumento da infecção mediada por anticorpos (ADE) e b) Células T de reatividade cruzada (RAMAKRISHNAN; RADHAKRISHNA PILLAI; NAIR, 2015).

A proteção homóloga após a infecção primária causada pelo mesmo sorotipo é duradoura, porém a taxa de proteção cruzada contra outros sorotipos é inexistente ou de curta duração e pode ocasionar um aumento da infecção pelo DENV mediada por anticorpos (Figura 6) (HEINZ; STIASNY, 2012).

A teoria sugere que uma segunda infecção com um sorotipo heterólogo de DENV pode levar ao desenvolvimento da FHD. Este fenômeno pode ser explicado pela presença de anticorpos preexistentes com capacidades subneutralizantes que se ligam às partículas virais e favorecem a infecção de células que possuem receptor para imunoglobulina do tipo FC $\gamma$ RII. Este evento leva a um aumento da replicação do vírus no interior destas células, com consequente aumento da viremia. Ainda se observa uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), o aumento da permeabilidade vascular e indução de apoptose induzida pela ADE. Além disso, experimentos *in vitro* demonstraram que o fenômeno da ADE ocorre em uma variedade de células primárias e em várias linhagens celulares como células

dendríticas plasmocitóides humanas, maduras e monócitos (PEIFANG SUN, 2013; WHITEHEAD et al., 2007).

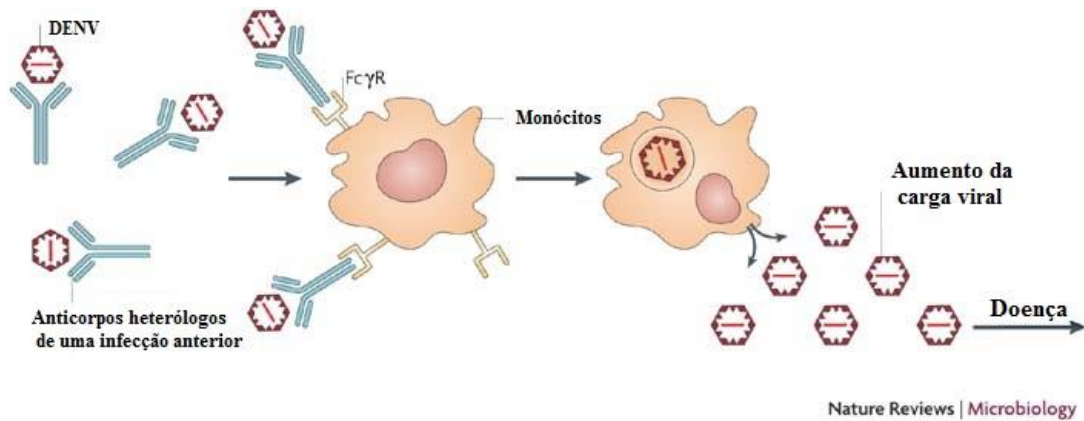


Figura 6 – **Figura esquemática representando a hipótese do Aumento da infecção mediada por anticorpos (ADE).** Anticorpos heterólogos provenientes de uma infecção anterior se ligam às partículas virais e favorecem a infecção de células que possuem receptor para imunoglobulina do tipo FcγRII. Este evento leva a um aumento da replicação do vírus no interior destas células, com consequente aumento da viremia. Fonte: Adaptado de WHITEHEAD et al., 2007.

Vários trabalhos indicam que a patogênese da FHD pode também estar relacionada à ativação de células T que apresentam um fenótipo anormal de produção de citocinas. A teoria de células T de reação cruzada preconiza que em uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo, ocorre uma ativação preferencial de linfócitos TCD4 e TCD8 de memória produzidos na infecção anterior por um sorotipo diferente, levando a uma resposta imune ineficaz caracterizada pela presença de linfócitos TCD8+ com degranulação subótima, menor produção de citocinas antivirais e alta produção de citocinas pró- inflamatórias IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Este fenômeno leva a uma falha da eliminação de células infectadas, um maior dano tecidual e, portanto, predispõe o hospedeiro a desenvolver as formas mais graves da dengue (Figura 7) (ELONG NGONO; SHRESTA, 2018; PEIFANG SUN, 2013; ROTHMAN, 2011).

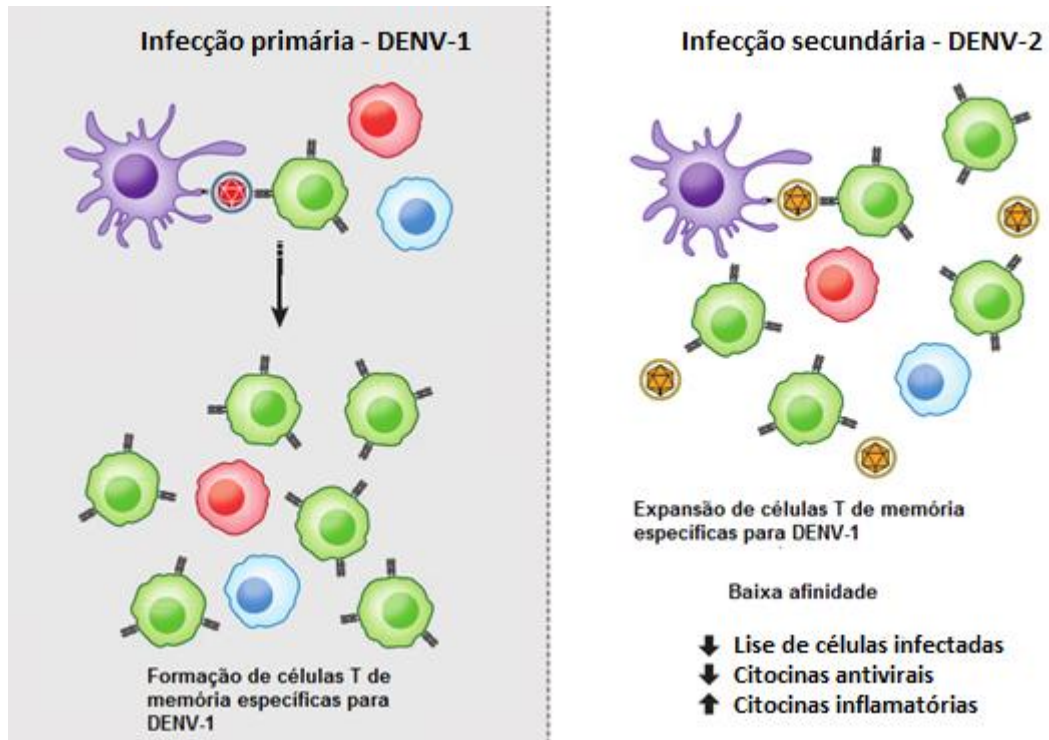


Figura 7 - **Teoria de células T de reação cruzada.** Em uma segunda infecção ocasionada por um sorotipo heterólogo, células T de memória produzidas em uma primeira infecção são ativadas preferencialmente, levando a uma menor lise de células infectadas, menor produção de citocinas antivirais e maior produção de citocinas inflamatórias. Fonte: Adaptado de NGONO, SHRESTA, 2018.

Entretanto, observam-se manifestações graves da doença mesmo em indivíduos que não foram previamente infectados por outros sorotipos. Dessa forma, as diversas formas de manifestação da doença também podem estar relacionadas a diversos fatores relacionados ao hospedeiro, como idade, estado nutricional, características imunológicas e genéticas, características do próprio vírus e carga viral (KUCZERA et al., 2018; PAWITAN, 2011).

Vale ressaltar que existe dentro de cada sorotipo, uma variação genotípica a qual está relacionada à capacidade inerente de determinados sorotipos de serem mais virulentos do que outros, embora a infecção por qualquer dos sorotipos do DENV possa levar às manifestações graves (KING; ANDERSON; MARSHALL, 2002).

## 1.5 MODELOS MURINOS

Um dos maiores desafios no estudo da patogênese da dengue é a obtenção de um modelo animal que possa se aproximar das características apresentadas no desenvolvimento da doença em humanos após infecção pelo DENV. Muitos modelos animais para dengue têm sido investigados, porém, existe uma grande dificuldade para se obter um modelo fiel que apresente replicação viral, progressão da doença e alterações patológicas como observadas em humanos. A carência de um modelo animal 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).

### 1.5.1 Camundongos imunocompetentes

O estudo da ativação do sistema imune e o desenvolvimento de respostas imunes inatas e adquiridas tornam-se de suma importância para o entendimento dos parâmetros imunológicos envolvidos no curso da infecção pelo DENV e no desenvolvimento das formas mais graves da doença. Dessa forma, um modelo experimental baseado no uso de camundongos imunocompetentes é considerado padrão para estudo da imunopatogênese da dengue.

Entretanto, 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. Apresentando assim, a ausência de sintomas da febre do dengue como visto em seres humanos nenhuma ou baixa viremia e conseqüentemente, dificuldades de recuperação do genoma do DENV nos órgãos dos animais infectados (CHAN et al., 2015; SARATHY et al., 2015; ZOMPI; HARRIS, 2012).

De maneira interessante, em um recente estudo desenvolvido, camundongos BALB/C imunocompetentes foram infectados com 10.000 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL de DENV-4 não adaptado, pela veia caudal. Após análises realizadas por qPCR, o genoma do DENV foi encontrado na saliva dos animais infectados. O presente estudo gerou o primeiro relato da presença do DENV em saliva de animais imunocompetentes (RASINHAS et al., 2018).

Uma abordagem utilizada para contornar a resistência que os camundongos imunocompetentes apresentam à infecção pelo DENV é a utilização de vírus adaptados ao



modelo murino e/ou o uso de vias de infecção artificiais, tais como intraperitoneal ou intracraniana (GUABIRABA; RYFFEL, 2014).

Em um estudo realizado, camundongos C57BL/6 imunocompetentes foram infectados pela via intraperitoneal com  $7,2 \times 10^7$  UFP de DENV-1, da linhagem adaptada Mochizuki. Os animais infectados, apresentaram uma alta carga viral e o genoma viral foi detectado por qPCR. Além disso, houve a redução significativa da contagem de plaquetas, hemorragia no baço, danos hepáticos e aumento da produção de citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (GONÇALVES et al., 2012).

Seguindo essa mesma abordagem, camundongos C57BL/6 foram infectados com  $4 \times 10^3$  UFP com uma linhagem DENV-3 não adaptada, pela via intracranial. A infecção levou ao desenvolvimento de encefalite letal e mudanças comportamentais nos camundongos infectados. As lesões no sistema nervoso central foram similares às observadas em humanos que desenvolveram encefalite após infecção pelo DENV. A resposta imune foi marcada pela presença de quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL1 e CXCL2, das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , com um aumento da adesão e rolamento de leucócitos nos vasos da meninge e pela presença de infiltrado inflamatório no cérebro (AMARAL et al., 2011).

#### 1.5.1.1 Infecção intracraniana como estratégia para validação de imunógenos para dengue

A infecção intracraniana é utilizada como ferramenta para a adaptação de isolados humanos de DENV ao modelo murino há aproximadamente 70 anos e até hoje vem sendo utilizada para isolamento viral, neuroadaptação e como estratégia para validação de imunógenos para dengue (HOTTA, 1952; SABIN AB, 1945; SARATHY et al., 2015).

Como demonstrado no tópico acima, a inoculação de DENV no cérebro leva à replicação viral, encefalite e mudanças comportamentais e morte. Os principais alvos do DENV são as micróglias, neurônios, oligodendrócitos e células endoteliais (AMARAL et al., 2011; RAMOS et al., 1998; VELANDIA-ROMERO; ACOSTA-LOSADA; CASTELLANOS, 2012).

Apesar de ser considerado um modelo artificial de infecção por muitos autores, um estudo visando descrever melhor o modelo, confirmou que a infecção pela via intracranial leva a um comprometimento sistêmico, como a participação dos dois braços da resposta imune, celular e humoral. No estudo, camundongos BALB/C foram infectados pela via intracranial com 40 LD<sub>50</sub> de DENV-2 da linhagem New Guinea C (NGC). Os resultados demonstraram

presença de partículas virais infecciosas no cérebro dos animais e presença de viremia. Além disso, a proteína NS3 do DENV foi encontrada nos hepatócitos, células de Kupffer e células endoteliais. Em análises histológicas do cérebro, foram encontrados infiltrados de células mononucleares na pia-máter e camada molecular, bem como, a migração de leucócitos dentro do córtex temporal intersticial. Os achados também revelaram o acometimento hepático, com infiltrados contendo células TCD8+ e TCD4+ ativados, o aumento de células TCD4+ e TCD8+ circulantes no sangue e presença de citocinas pró inflamatórias. A comprovação da participação de resposta humoral se deu pela detecção de linfócitos B ativados e produção de anticorpos (OLIVEIRA et al., 2016).

A infecção pela via intracraniana, 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 sintomas de encefalite e vão a óbito, sendo uma forma direta de mostrar atividade protetora anti-dengue (ALVES et al., 2016).

Nesse contexto, um estudo utilizando camundongos BALB/C vacinados com uma proteína recombinante derivada da proteína NS5 de DENV-2 foram desafiados pela via intracranial com  $5 \times 10^5$  UFP de DENV-2 da linhagem NGC ou  $1,5 \times 10^2$  UFP de um isolado clínico JHA1. Os resultados apontaram que a formulação vacinal induziu imunidade protetora contra as duas amostras virais testadas (ALVES et al., 2016).

De forma semelhante, em um trabalho desenvolvido por nosso grupo, resposta imune protetora anti-dengue foi avaliada a partir da imunização de camundongos C57BL/6 com um vírus MVA expressando a proteína E, truncada, de DENV-3. Os animais vacinados foram desafiados com  $10^3$  UFP de DENV-3, da linhagem MG20, e os resultados mostraram que a vacina foi capaz de gerar resposta protetora anti-dengue (QUINAN; VERSIANI; DA FONSECA, 2016).

Ambos os trabalhos apresentados, confirmam a aplicabilidade do modelo intracranial em ensaios pré-clínicos na avaliação de vacinas para dengue e reforçam a necessidade de novas averiguações para colaborar com a fundamentação e uso do modelo.

### 1.5.2 Camundongos imunodeficientes

Na busca de um modelo murino que permita a replicação do DENV e que apresente marcadores de sintomas que se assemelhem aos exibidos em humanos, camundongos com o sistema imune modificado geneticamente foram desenvolvidos como modelo animal para dengue (NA et al., 2017).

Um dos modelos pioneiros descrito para dengue, foi a partir do uso de camundongos AG129, os quais possuem deficiência nos receptores de IFN- $\alpha$  / $\beta$  e IFN- $\gamma$ , tendo em vista que a infecção pelo DENV em humanos é capaz de inibir a sinalização de IFN para estabelecer infecção. No presente estudo,  $10^6$  UFP de DENV-2, da linhagem adaptada New Guinea C, foi inoculado via intraperitoneal, levando a um pico de viremia três dias pós-infecção, comprometimento neurológico e morte (JOHNSON; ROEHRIG, 1999). Desde então, diversos autores vem aprimorando o uso de camundongos com imunodeficiência a fim de obter um modelo que seja capaz de mimetizar o curso da infecção como ocorrida em humanos (MILLIGAN et al., 2015; SARATHY et al., 2015; TAN et al., 2010).

Neste mesmo contexto, um estudo utilizou uma linhagem de DENV-2 (D2Y98P) não adaptada ao modelo murino, para a infecção de camundongos AG129, deficientes nos receptores de IFN- $\alpha$ / $\beta$  e IFN- $\gamma$ , pela via intraperitoneal. Os resultados revelaram que infecção com uma alta dose de DENV-2,  $10^4$  a  $10^7$  UFP, induziu alta produção de citocinas, danos aos órgãos e extravasamento vascular, ocasionando hemorragia e morte rápida no pico da viremia (TAN et al., 2010). Em outro trabalho do grupo, a mesma linhagem do DENV foi utilizada para infecção subcutânea de camundongos AG129, deficientes nos receptores de IFN- $\alpha$ / $\beta$  e IFN- $\gamma$ , dado que a via subcutânea se aproxima da via de infecção em humanos. A infecção levou a um aumento na permeabilidade vascular, acompanhada de características clínicas que se assemelharam às descritas em pacientes com DENV (TAN et al., 2011).

MILLIGAN e colaboradores descreveram um modelo utilizando uma linhagem de DENV-4 não adaptada ao modelo murino, a qual foi utilizada na infecção de camundongos AG129, deficientes nos receptores de IFN- $\alpha$ / $\beta$  e IFN- $\gamma$ , pela via intraperitoneal. Os camundongos infectados tiveram uma infecção letal acompanhada de extravasamento de plasma e trombocitopenia, levando-os à morte rapidamente e sem o desenvolvimento de sinais clínicos neurológicos. Além disso, foram recuperados altos títulos de vírus nos órgãos, tais como fígado, baço e intestino (MILLIGAN et al., 2015).

O silenciamento gênico de receptores de IFN- $\alpha$  / $\beta$  e IFN- $\gamma$  não reproduz de forma fidedigna o modelo de infecção do DENV em seres humanos, uma vez que a ausência dessa sinalização pode prejudicar, de forma global, a montagem de resposta imune e então, se comportar como um modelo muito artificial. Dessa forma, foi gerado um modelo no qual foi

induzido uma deleção condicional no receptor de interferon do tipo I (IFNAR) de macrófagos e células dendríticas. Assim, o estudo permitiu a geração de camundongos sensíveis a infecção pelo DENV a partir da geração de camundongos minimamente manipulados (ZUST et al., 2014).

Apesar dos camundongos imunodeficientes contribuírem para o estudo do tropismo do DENV e no entendimento da patogênese da dengue, os resultados observados baseando-se neste modelo, devem ser cuidadosamente avaliados a fim de serem comparados com a doença em seres humanos, uma vez que esta inclui sinais de fundo claramente imunopatogênico (MILLIGAN et al., 2015).

### 1.5.3 Camundongos humanizados

Camundongos humanizados são animais que foram transplantados com células/tecidos humanos ou que expressam genes humanos. Estes camundongos são gerados através da injeção de células tronco hematopoiéticas (HSC) em animais imunodeficientes, levando a um quimerismo hematopoiético humano (AKKINA, 2013).

Dessa forma, muitos modelos de camundongos imunodeficientes têm sido gerados com mutações combinadas de vários genes para favorecer o enxerto de células, resultando na geração de camundongos que carregam células do sistema imune humano, tais como células T, B, Natural Killer (NK), macrófagos e células dendríticas (AKKINA, 2013).

Estes animais têm sido utilizados como ferramentas no estudo da dengue, desempenhando um importante papel para o entendimento da patogênese viral e no teste de estratégias terapêuticas.

Com a finalidade de se melhorar a resposta de células T em camundongos humanizados, camundongos com imunodeficiência severa combinada (SCID), que tem ausência de células B e T funcionais, foram transplantados com medula óssea, fígado e timo (BLT). Este modelo, tem sido usado como modelo de infecção pelo DENV, por ser susceptível a isolados clínicos e pela geração de resposta imune adquirida específica (AKKINA, 2013; CHAN et al., 2015; FRIAS-STACHELI et al., 2014).

Utilizando a abordagem de camundongos humanizados no contexto da dengue, animais imunodeficientes foram transplantados com células tronco humanas, derivadas de sangue do

cordão umbilical. Estes animais mostraram sinais da dengue como apresentadas em humanos após infecção com DENV-2, caracterizada por febre, viremia, eritema e trombocitopenia. O estudo também detectou a secreção de citocinas e quimiocinas, tornando o modelo ainda mais relevante para o estudo da patogênese pela infecção pelo DENV (MOTA; RICO-HESSE, 2011).

Muitas são as variações de camundongos humanizados que estão sendo estudados. Apesar de recentes avanços, este modelo ainda apresenta algumas limitações como imunidade inata residual, número de células T abaixo do ideal, maturação subótima de células B, ineficiente cooperação entre células B e T, ineficiente expansão celular humana e de sua manutenção homeostática (AKKINA, 2013).

A tabela 3 apresentada resume alguns estudos com DENV em modelo animal, realizado em diferentes linhagens de camundongos com diferentes sorotipos do DENV.

Tabela 3 – Resumo dos estudos com DENV desenvolvidos em modelo animal

<b>Linhagem</b>	<b>Amostra viral</b>	<b>Dose viral</b>	<b>Via de inoculação</b>
Balb/C	DENV-2 Amostra adaptada a camundongo	5 LD <sub>50</sub>	Intraperitoneal
Balb/C	DENV-2 Amostras adaptadas a camundongo ou não	4,32 log <sub>10</sub> PFU ou 100 TCID <sub>50</sub>	Intracranial ou intraperitoneal
Balb/C	DENV-2 Amostra adaptada a camundongo	4,32 log <sub>10</sub> PFU	Intracranial
Hu-PBL-SCID	DENV-1	Dado não disponível	Intraperitoneal
K562- SCID	DENV-2 isolado clínico	10 <sup>7</sup> PFU	Intraperitoneal
HepG2-grafted SCID	DENV-2 isolado clínico	10 <sup>6</sup> PFU	Intraperitoneal
NOD/SCID	DENV-2 isolado clínico	4,7 log <sub>10</sub> PFU	Subcutânea
AG129	DENV-2 isolado clínico	10 <sup>2</sup> -10 <sup>7</sup> PFU	Intraperitoneal
C57BL/6, IgH <sup>-/-</sup> , TNFα <sup>-/-</sup> , A/HeJ e A/J	DENV-2 isolado clínico	4x10 <sup>7</sup> PFU	Intradermal
C57BL/6	DENV-2 isolado clínico	4x10 <sup>7</sup> PFU	Intradermal
C57BL/6	DENV-1 Amostras adaptadas a camundongo	7,2x10 <sup>7</sup> PFU	Intraperitoneal
C57BL/6	DENV-3 isolado clínico	4x10 <sup>2</sup> -4x10 <sup>5</sup> PFU	Intracranial
Balb/C	DENV-2 isolado clínico	300 PFU	Intracranial

Fonte: Revisto por Amorim et al, 2015.

## 1.6 VÍRUS RECOMBINANTES COMO VETORES VACINAIS

Vacinas baseadas em vetores virais têm sido amplamente estudadas tendo em vista a habilidade dos vírus recombinantes em carrear genes que codificam proteínas exógenas para dentro das células de organismos hospedeiros. Desta forma, as proteínas podem ser expressas,

processadas e apresentadas ao sistema imune (GOODMAN et al., 2011; ROCHA et al., 2004; SOUZA et al., 2005).

Para garantir a segurança desta plataforma vacinal, muitos dos vírus utilizados são modificados a fim de se reduzir ou eliminar sua patogenicidade, ou atenuados por passagens subsequentes em culturas celulares que podem levar a uma deficiência na replicação (ROLLIER et al., 2011; URA; OKUDA; SHIMADA, 2014).

Os vírus são organismos eficientes em infectar células, uma vez que são capazes de driblar as defesas do hospedeiro e, por meio da interação de receptores celulares e virais, entram na célula hospedeira e se multiplicam.

Desta forma, vetores virais são caracterizados por serem excelentes imunógenos e ótimos veículos de entrega de antígenos vacinais, principalmente pelo fato de estes vírus poderem infectar importantes células do sistema imune, como células apresentadoras de antígenos, favorecendo a ativação da resposta imunológica. Adicionalmente, vacinas utilizando vetores virais induzem resposta sistêmica de células T e têm sido caracterizadas por secreção de citocinas e ativação de células T CD8<sup>+</sup> (REYES-SANDOVAL et al., 2010; ROCHA et al., 2004).

Poxvírus e adenovírus estão entre os principais vírus utilizados como vetores vacinais, dado o potencial de ambos os vetores em induzir resposta imune principalmente baseada em linfócitos T citotóxicos (URA; OKUDA; SHIMADA, 2014).

#### 1.6.1 Adenovirus recombinantes como vetores vacinais

Adenovírus são vírus pertencentes à família *Adenoviridae*, a qual é dividida em dois gêneros, *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*. O gênero *Mastadenovirus* reúne aqueles vírus que têm capacidade de infectar mamíferos e o gênero *Aviadenovirus* engloba os vírus que infectam aves. Os Adenovírus caracterizam-se por apresentarem partícula viral não envelopada, possuindo um cápsideo proteico de simetria icosaédrica e é composto por três proteínas principais e quatro proteínas menores. Seu material genético é constituído de DNA dupla fita linear com tamanho aproximado de 36 kb (Figura 8) (ROCHA et al., 2004; URA; OKUDA; SHIMADA, 2014).

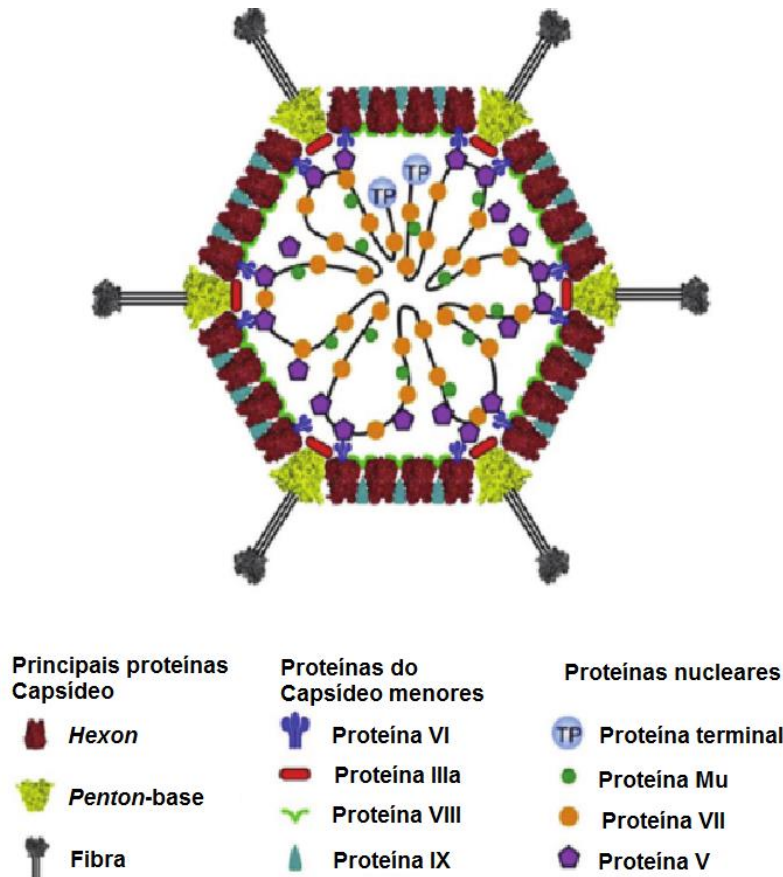


Figura 8 – **Representação da composição e estrutura do Adenovírus.** O capsídeo do Adenovírus possui simetria icosaédrica e é composto por três proteínas principais e quatro proteínas menores. Fonte: Adaptado de THACI et al., 2011.

O uso do Adenovírus como vetor recombinante teve início na metade de 1980, com a obtenção de um vírus que poderia se replicar em muitos tipos celulares. Os Adenovírus denominados de Primeira Geração foram obtidos a partir da remoção da região E1 do genoma, a qual é crítica para o início da replicação viral, ou E1/E3, a fim de se gerar mais espaço para inserir a sequência de DNA exógena. Dessa forma, foi gerado um vírus de replicação deficiente, garantindo a segurança do vetor para fins vacinais (ROCHA et al., 2004; URA; OKUDA; SHIMADA, 2014).

Os Adenovírus recombinantes são capazes de induzir uma intensa expressão do gene de interesse tanto *in vitro* como *in vivo*. Adicionalmente, o uso do Adenovírus como vetor oferece muitas outras vantagens, principalmente devido à fácil manipulação e obtenção de altos títulos virais, o fácil armazenamento e transporte após a liofilização, amplo tropismo por diversos tipos celulares por poder ser administrado em várias vias de infecção (SOUZA et al., 2005).

Um estudo utilizando um vetor adenoviral recombinante demonstrou a forte imunogenicidade desse vetor, no que tange à habilidade de entrega de grandes quantidade de



antígenos, a habilidade em induzir rápida expansão e migração de células TCD8+ e também, na habilidade em produzir uma alta resposta de células TCD8+ (YANG et al., 2003).

Nos dias de hoje, a capacidade dos vetores adenovirais em estimular repostas imune inata e potentes respostas de células B e T já é bem estabelecida. Assim, inúmeros estudos estão em fase clínicas de teste, como para HIV-1, infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Ebola virus* e *Hepatitis C virus* (BADEN et al., 2013; BARNES et al., 2013; HAYTON et al., 2014; HODGSON et al., 2015; KAGINA et al., 2014; TAPIA et al., 2016).

Entretanto, a maior limitação encontrada no uso de Adenovírus humanos como vetor é a imunidade preexistente, uma vez que esses vírus normalmente causam doenças comuns à população humana como doenças respiratórias, conjuntivite, bronquite ou pneumonia. Assim, a manifestação da imunidade existente, leva à ativação e diferenciação de células B em células secretoras de anticorpos, os quais são capazes de bloquear a entrada do vetor nas células e eliminá-lo antes mesmo de haver uma resposta imune direcionada ao antígeno de interesse (FARINA et al., 2001).

Com o intuito de se contornar este problema, muitos pesquisadores têm utilizado sorotipos adenovirais originados de macaco, os quais não circularam na população humana. Estes estudos tem relatado a capacidade desses vetores em gerar respostas imunes seguras e eficazes, baseadas na geração de células T CD8+ específicas ao antígeno transgênico (O'HARA et al., 2012; REYES-SANDOVAL et al., 2008).

A tabela 4 apresenta alguns estudos, em fase clínica de teste, utilizando Adenovírus de Chimpanzé como vetores vacinais.

Tabela 4 – Adenovírus de Chimpanzé como vetores vacinais

<b>Vetor (espécie isolamento)</b>	<b>Classificação (grupo)</b>	<b>Fase de teste</b>	<b>Patógeno/ doença</b>	<b>Referência</b>
PanAd3 (Pan paniscus)	C	I	Vírus sincicial respiratório	Clinicaltrials.gov (n° NCT01829490); GREEN et al., 2015
ChAd3 (Pan troglodytes)	C	I,II	Ebola, HCV	BARNES et al., 2013; EWER et al., 2016; KENNEDY et al., 2016; LEDGERWOOD et al., 2017; SWADLING et al., 2014
ChAd63 (Pan troglodytes)	E	I,II	Malária, HIV	HAYTON et al., 2014; O'HARA et al., 2012
ChAdOx1 (modificado de Pan troglodytes Y25)	E	I	Influenza A, cancer de próstata e tuberculose	Clinicaltrials.gov (n° NCT01829490, NCT02390063); ANTROBUS et al., 2014

Fonte: Modificado de MORRIS et al., 2016.

### 1.6.2 Poxvírus recombinantes como vetores vacinais

Poxvírus são vírus pertencentes à família *Poxviridae*, a qual é dividida em duas subfamílias *Chordopoxvirinae*, que compreende os vírus que infectam hospedeiros invertebrados e *Entomopoxvirinae*, que compreende os vírus que infectam insetos. A subfamília *Chordopoxvirinae*, inclui 12 gêneros, sendo o gênero *Orthopoxvirus* (OPXV), um dos mais bem estudados (ICTV, 2018).

Os vírus pertencentes a essa família são envelopados, apresentando-se em forma ovóide ou de tijolo. A partícula viral é formada por uma membrana lipídica, que contém túbulos de superfície arranjados de forma irregular seguida de uma membrana externa que envolve o núcleo e dois corpúsculos laterais. O núcleo viral é formado por uma membrana a qual circunda o genoma, formado por um DNA de fita dupla linear, enzimas e fatores de transcrição de genes (MOSS, 2013).

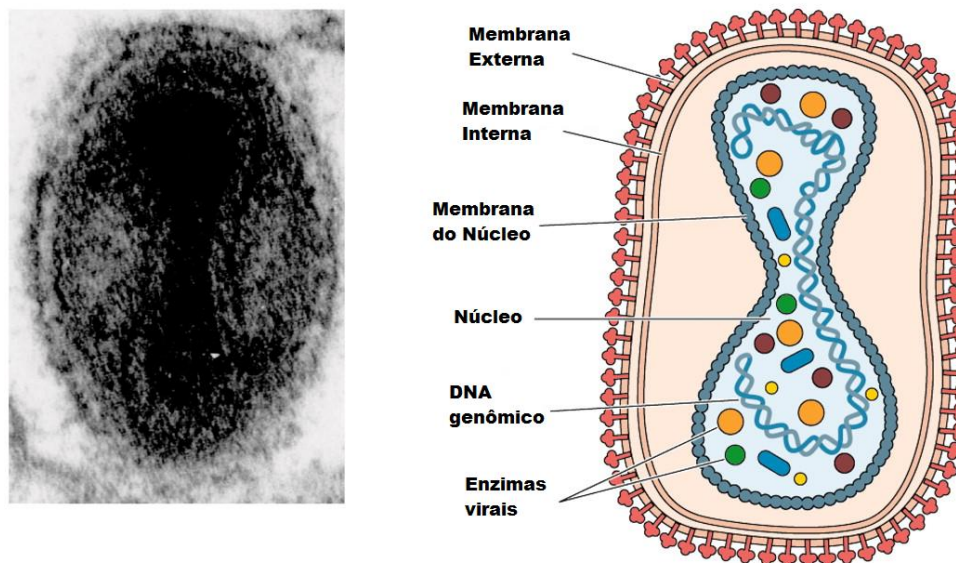


Figura 9 – **Partícula viral do MVA.** Microscopia eletrônica da partícula viral e imagem esquemática da partícula viral. Fonte: Adaptado de Flint et al, 2003.

Apesar de serem vírus de DNA, sua multiplicação ocorre no citoplasma de células infectadas devido ao fato de que o vírus codifica seu próprio maquinário de transcrição gênica e replicação do genoma (ROCHA et al., 2004; SOUZA et al., 2005).

O *Vaccinia virus* (VACV) é um dos principais e mais bem caracterizados vírus do gênero *Orthopoxvirus*, sendo considerado o protótipo do gênero. Esse vírus possui genoma de tamanho aproximado de 190 kb, o que o torna altamente flexível em permitir que parte de seu genoma seja perdido ou removido para a inserção de genes estranhos sem que haja a desestabilização viral ou perda de infectividade. Estes vetores possuem baixo custo de produção e são muito estáveis quando liofilizados, o que facilita seu transporte para as regiões mais remotas (GÓMEZ et al., 2011; SOUZA et al., 2005).

O VACV foi utilizado na Campanha de Vacinação contra a Varíola e dado seu sucesso na erradicação da doença em 1980, a vacinação foi suspensa pela OMS. Entretanto, o VACV passou a ser utilizado em pesquisas e hoje, após a obtenção de linhagens ainda mais atenuadas, é um dos mais utilizados vetores vacinais devido à sua eficácia e segurança (ROCHA et al., 2004; SOUZA et al., 2005).

Durante o Programa de Erradicação da Varíola, após a observação do aparecimento de complicações a partir da vacinação com VACV em crianças e indivíduos imunocomprometidos, uma nova abordagem utilizando o VACV foi implementada naquele contexto vacinal a fim de se garantir a segurança do agente imunizante (GÓMEZ et al., 2011).

Derivado de *Vaccinia virus* Ankara, o MVA foi gerado na Alemanha nos anos 60 e é um vírus altamente atenuado. Este vírus foi obtido por mais de 570 passagens consecutivas em Fibroblastos de Embrião de Galinha (CEF). Como resultado, o MVA perdeu aproximadamente 15% do genoma parental, o que corresponde a aproximadamente 30 Kb. Dessa forma, foi gerado um vírus de replicação deficiente em células de seres humanos e de outros mamíferos, devido à perda e/ou mutação de importantes genes envolvidos com a imunomodulação do hospedeiro e evasão do sistema imune (COTTINGHAM; CARROLL, 2013; GÓMEZ et al., 2011).

Apesar de ser um vírus de replicação defectiva, o MVA tem capacidade de produzir níveis similares de antígenos virais e recombinantes quando se comparados aos vírus de replicação competente. Além disso, MVA é altamente imunogênico, induzindo a ativação do sistema imune inato com produção de citocinas, quimiocinas e indução da migração celular; ativação de uma robusta resposta por células T CD8+ e pela geração de uma resposta de anticorpos antígeno-específica (CALVO-PINILLA et al., 2014; DUFFY et al., 2012; GÓMEZ et al., 2011; KASTENMÜLLER et al., 2013; PRICE et al., 2013).

No contexto de vacinas para dengue, como abordado no tópico 1.5.1.5, nosso grupo gerou um vírus MVA expressando a proteína E, truncada, de DENV-3. Em modelo murino, este vetor foi capaz de gerar altos níveis de imunidade humoral e celular, com presença de uma resposta de células T polifuncional, o que nessas circunstâncias aumenta a robustez da resposta imune e pode ser benéfico para resolução da infecção (QUINAN et al., 2014).

A tabela 5 evidencia as aplicações do MVA como vetor vacinal, para diversos patógenos virais, que estão em fases pré-clínicas ou clínicas de teste.

Tabela 5 – Aplicações do MVA como vetor vacinal

<b>Patógeno Alvo/ doença</b>	<b>Antígeno Heterólogo</b>	<b>Fase de teste</b>
Varíola	Vetor MVA inteiro	
HIV/AIDS	HIV-1 Gag p24 e p17 fusionados a 25 epitopos sobrepostos de LTC TCD8 (clado A) HIV-1 Env (clade E); Gag-Pol (clado A) HIV-1 Env, Gag, Tat-Rev e Nef-RT (clado C) HIV-1 Env, Gag-Pol, Nef-Tat (clados B/C) HIV-1 Gag, PR, RT, Env (clado B) HIV-1 Env/Gag, Tat/Rev/Nef-RT (clado B) HIV-1 Env, Gag-Pol-Nef (clado B) 21 LTC e 18 LTH epitopos de HIV-1 Gag, Pol, Vpr, Nef, Rev e Env HIV-1 Nef	Clínico Clínico Clínico Clínico Clínico Clínico Clínico Clínico
Influenza A	NP+M1 HA de H5N1	Clínico Clínico
Hepatite B	HBs 30 epitopos de LTC e 16 de LTH	Clínico Pré-clínico
Hepatite C	NS3, NS4 e NS5B (genótipo 1b) E1 e E2 (genótipo 1b) C, E1 e E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (genótipo 1a)	Pré-clínico e Clínico Pré-clínico Pré-clínico
CHIKV	C, E3, E2, 6K e E1 E3 and E2 E3-E2, 6K-E1 or E3-E2-6K-E1	Pré-clínico Pré-clínico
Dengue	Envelope (DENV-2) Envelope (DENV-3)	Pré-clínico Pré-clínico
Ebola CCHF	GP (amostras Zaire and Sudan) GP	Pré-clínico Pré-clínico
SARS	Proteína da espícula Proteína da espícula ou do nucleocapsídeo Nucleocapsídeo	Pré-clínico Pré-clínico Pré-clínico
MERS	Proteína da espícula	Pré-clínico Pré-clínico
FIPV RSV RVF Raiva	Proteína de Membrana Glicoproteínas F ou G Gn/Gc GP Glicoproteína	Pré-clínico Pré-clínico Pré-clínico Pré-clínico
JEV	Proteínas de membrana (prM) e do Envelope (E) (linhagem Koreana) Epitopos lineares múltiplos de células B, LTC e LTH (Linhagem SA14)	Pré-clínico Pré-clínico

Sarampo	HÁ F e HÁ	Pré-clínico Pré-clínico
CMV	GP B (gB) solúvel UL55 (glicoproteína de superfície), UL83 (proteína do tegumento) e UL123/e4 (proteína nuclear) pp65 (proteína do tegumento) e CMV gene IE1 fase precoce pp65-2, gB e IE1 (Rhesus CMV) pp65, IE1, IE2 pp65 glicoproteínas gH/gL, UL128, UL130 e UL131A (UL128C) gH, gL, UL128, UL130 e UL131A	Pré-clínico Pré-clínico  Pré-clínico Pré-clínico Pré-clínico Pré-clínico Pré-clínico
BoHV-1 EHV-1 HSV <i>Parainfluenza virus</i>	GP D secretado Receptor do complemento GP C HSV GP D (gD) (HSV-2) Glicoproteínas F e/ou HN ( <i>Parainfluenza virus 3</i> )	Pré-clínico Pré-clínico Pré-clínico Pré-clínico

Fonte: Revisto por SÁNCHEZ-SAMPEDRO et al., 2015

### 1.6.3 Protocolo heterólogo como estratégia para aumentar eficácia de candidatos vacinais

Diversos trabalhos comprovaram que a estratégia de administração sequencial de um mesmo antígeno, carregado por vetores diferentes, é capaz de potencializar a resposta imune em diferentes modelos animais, quando se comparado com a administração sequencial de um mesmo vetor. Este protocolo é conhecido com regime dose-reforço heterólogo e tem contribuído fortemente para a obtenção de respostas imunes mais robustas e eficazes contra diferentes patógenos (GOODMAN et al., 2011; KARDANI; BOLHASSANI; SHAHBAZI, 2015; REYES-SANDOVAL et al., 2010).

Em um contexto vacinal, células de memória são extremamente importantes devido ao fato de possuírem longa duração e por serem mantidas a números constantes mesmo na ausência de estimulação antigênica. As células T de memória efetora são células de memória que assumem a linha de frente em uma infecção, principalmente por serem privilegiadas quanto à sua localização, residindo nos tecidos linfáticos, sendo capazes de circular por regiões periféricas. Apesar de terem reduzida ou nenhuma capacidade de proliferação, estas células após o reconhecimento antigênico, assumem rapidamente funções efetoras como atividades citotóxicas e dessa forma, estão envolvidas em situações nas quais há necessidade de uma proteção imediata. Em contrapartida, células de memória central tem grande capacidade de proliferação, mas encontram-se nos órgãos linfóides secundários e só proliferam após a apresentação antigênica por meio de células dendríticas (SALLUSTO; LANZAVECCHIA; ARAKI, KOICHI AHMED, 2010; TATSIS et al., 2007).

Um importante estudo foi realizado por nossos colaboradores no intuito de investigar fenótipos de células T (efetora, memória central e memória efetora) gerados por diferentes combinações de vetores virais recombinantes, a partir de imunização de camundongos utilizando o regime heterólogo. Este trabalho demonstrou que quando os camundongos foram imunizados com vetor adenoviral, seguido de um reforço com MVA, esta combinação levou a uma indução preferencial de células T de memória efetora. Porém, quando a imunização foi realizada primeiramente com vetor MVA e o reforço com vetor adenoviral, o fenótipo das células T predominante foi o de memória central. Adicionalmente, o fenótipo de células T de memória efetora foi responsável pela proteção dos camundongos após um desafio com *Plasmodium berghuei* (REYES-SANDOVAL et al., 2011).

Assim, os autores do estudo acima se basearam em trabalhos nos quais foi estudado a cinética de expressão de vetores Adenovirais e MVA. Dessa forma, eles atribuíram a variação na geração da resposta imune ao fato de vetores adenovirais persistirem com a expressão do gene heterólogo por um período extremamente maior que o MVA, sendo um período de 2 anos para Adenovírus, ao passo que o MVA se mantém por apenas algumas horas. Assim, essas características podem estar associadas com a geração da resposta imune e ativação de diferentes fenótipos de células T (GEIBEN-LYNN et al., 2008; REYES-SANDOVAL et al., 2011; TATSIS et al., 2007).

Trabalhos utilizando a estratégia dose-reforço heterólogas construídas em Adenovírus e MVA demonstram que a combinação de vetores leva à geração de uma resposta imune celular robusta, polifuncional e protetora, destacando essa plataforma como uma excelente estratégia de imunização para melhorar a performance de candidatos vacinais (HILL et al., 2010; REYES-SANDOVAL et al., 2010, 2011).

## 1.7 VACINAS PARA A DENGUE

Os esforços para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue foram iniciados há mais de 70 anos, quando Sabin utilizou amostras de DENV, adaptadas ao modelo intracerebral de camundongos, para imunizar seres humanos (SABIN, 1945)

O conhecimento sobre a resposta imune para os diversos sorotipos da dengue é determinante para que se possam desenvolver vacinas seguras e eficazes contra a dengue.

Os quatro sorotipos do DENV apresentam uma variação de aproximadamente 30% em seus genomas, o que leva às variações antigênicas importantes e a existência de diferentes epítomos, os quais são importantes para a montagem de uma resposta imunológica para os diferentes sorotipos. Uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo pode levar à produção de anticorpos com baixa atividade neutralizante e com capacidade de facilitar a infecção pelo DENV. Em adição, células T de reação cruzada podem ser ativadas, levando à produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Ambos os mecanismos descritos podem levar às formas mais graves de manifestação da dengue e devem ser evitados no desenvolvimento de uma vacina para a dengue (GUZMAN; HARRIS, 2015; ROTHMAN, 2011).



A busca de uma resposta imune balanceada para todos os quatro sorotipos é um dos principais desafios para o desenvolvimento de vacinas para dengue. A soroconversão para apenas alguns sorotipos em formulações tetravalentes representa um problema para a vacinação de indivíduos que vivem em áreas endêmicas. No intervalo entre uma dose e outra de vacinação pode ocorrer a infecção por um sorotipo para qual o indivíduo não possui anticorpos capazes de neutralizar a partícula viral. Desta forma, a infecção heteróloga poderá predispor o indivíduo ao desenvolvimento das formas mais graves da dengue (RAMAKRISHNAN; RADHAKRISHNA PILLAI; NAIR, 2015).

No final do ano de 2015, a vacina Dengvaxia foi licenciada no Brasil e em outros países da América Latina e Ásia. Esta vacina, foi gerada a partir da amostra vacinal da febre amarela, porém, os segmentos gênicos que codificam as proteínas pré-membrana (prM) e do envelope (E) foram substituídos por segmentos das mesmas regiões dos quatro diferentes sorotipos do DENV. Os ensaios de fase III foram conduzidos na Ásia e América Latina, contudo, a eficácia global da vacina é de aproximadamente 60% e a porcentagem de soroconversão para sorotipo 2 do DENV é inferior aos resultados apresentados para os demais sorotipos, o que suscitou importante discussão sobre a eficácia e segurança desta vacina (CAPEDING et al., 2014; HADINEGORO et al., 2015).

Outro fator importante acerca desta vacina é que a faixa etária de administração desta é de 9 a 45 anos, excluindo importantes grupos da população (crianças e idosos) nos quais estudos anteriores já comprovaram a manifestação de formas graves de dengue (EL FEZZAZI et al., 2017).

Recentemente, a fabricante da vacina atualizou as informações do produto baseando-se em estudos realizados após 5 anos de vacinação. Os resultados sugerem que existem diferenças no desempenho da vacina entre indivíduos com ou sem infecção prévia pelo DENV (SANOFI, 2018). Diante destes dados, a ANVISA recomendou que a vacina não seja administrada em pacientes soronegativos. Portanto, a vacina vem sendo alvo de grandes discussões, colocando em dúvida sua aplicabilidade em programas de vacinação contra a dengue, especialmente em países no Brasil, onde a taxa de soroprevalência para dengue é alta (ANVISA, 2018).

Uma vacina que vem se destacando nos ensaios clínicos é a vacina TV003/TV005. Desenvolvida pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID) em parceria com o Instituto Butantan, esta vacina é formada por quatro candidatos monovalentes que foram submetidos à deleção de 30 ou 31 nucleotídeos na região 3' não traduzida dos diferentes sorotipos (3' UTR). Esta modificação genética atenuou a maioria dos sorotipos virais e manteve a sua imunogenicidade para o DENV-1, DENV-3 e DENV-4. Para conferir imunidade contra

o DENV-2, foi utilizado um vírus quimérico, no qual foi substituída as sequências codificadoras das proteínas prM e E do DENV-4 pelas do DENV-2. Os quatro candidatos monovalentes foram utilizados para compor uma vacina tetravalente. As vacinas TV003 e TV005 são compostas pelos mesmos candidatos monovalentes (rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2/4 $\Delta$ 30, rDEN3 $\Delta$ 30/31 e rDEN4 $\Delta$ 30), porém na formulação TV005, a dose de rDEN2/4 $\Delta$ 30 foi aumentada em 10 vezes quando se comparada à formulação TV003.

Em um estudo realizado por Whitehead em 2016, visando avaliar a segurança e imunogenicidade da formulação vacinal TV003 comparada à formulação TV005, demonstrou, a partir da medida de soroconversão realizada 90 dias após vacinação, que a formulação TV003 apresentou 95% de soroconversão para DENV-1, 76% de soroconversão para DENV-2, 97% de soroconversão para DENV-3 e 100% de soroconversão para DENV-4. Em contrapartida, a formulação TV005, apresentou soroconversão de 92% para DENV-1 e 97% para os demais sorotipos. O estudo em questão evidenciou a segurança e eficácia das formulações vacinais, desta forma a vacina TV003/TV005 tem sido aplicada em modelos de desafios e ensaios de fase III em regiões edêmicas para dengue, incluindo o Brasil (WHITEHEAD, 2016).

Uma terceira abordagem que também se utiliza de uma quimera viva/atenuada é a vacina tetravalente TDV, produzida pela Farmacêutica japonesa Takeda, é composta por uma linhagem DENV-2 atenuado, o qual foi também utilizado para geração de três vírus quiméricos com os genes de prM e do E de sorotipos 1, 3 e 4 inseridas em seu genoma. Estudos clínicos de fase I e II, demonstraram que a vacina foi capaz de induzir soroconversão para todos os sorotipos do DENV (RUPP et al., 2015; SIRIVICHAYAKUL et al., 2016). Em um recente estudo realizado com crianças saudáveis de 2 a 17 anos na Ásia e América Latina, a vacina TDV mostrou ser bem tolerada e imunogênica contra os quatro sorotipos de dengue (SÁEZ-LLORENS et al., 2017). A vacina encontra-se em ensaios clínicos de fase III, no intuito de avaliar a eficácia de duas doses da vacina em aproximadamente 20.000 crianças e adolescentes entre 4 a 16 anos em países endêmicos na América Latina e Ásia. (TAKEDA, 2018).

A vacina TDEN foi gerada e vem sendo testada a partir de uma colaboração entre GlaxoSmithKline (GSK) e the Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR). A vacina foi derivada de uma vacina que foi gerada por passagens do DENV em Células Primárias de Rim de Cachorro (PDK). A nova geração da formulação vacinal conta com três passagens adicionais em Células de Pulmão de Feto de Macaco Rhesus (FRhL). Em estudos de fase II, a vacina foi testada em adultos saudáveis pela administração de duas doses com um intervalo de seis meses entre cada dose. A vacina se mostrou segura, ou seja, não apresentou efeitos adversos sérios e

os resultados demonstraram que após a segunda dose da vacina, a taxa de resposta tetravalente foi de aproximadamente 70% (THOMAS et al., 2013).

A partir de uma abordagem que utiliza subunidade recombinante, foi desenvolvida a vacina V180 a qual foi gerada a partir da glicoproteína do envelope (E) do DENV. Foram produzidas versões da proteína E truncadas na porção C-terminal e expressas em células de *Drosophila melanogaster* (S2). A vacina foi combinada com adjuvante ISCOMATRIX, sendo capaz de induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes e IFN- $\gamma$  após testadas em primatas não humanos. A vacina foi testada como formulações monovalentes em combinação com adjuvante Alhydrogel e estas induziram baixos títulos de anticorpos neutralizantes contra DENV-1 (MANOFF et al., 2015). Em uma colaboração entre Merck e NIAID, a vacina completou os ensaios clínicos de fase I no intuito de avaliar sua segurança e imunogenicidade. Contudo, os resultados não foram publicados na plataforma *clinicaltrials.gov* até o presente momento.

Uma vacina de DNA baseada nos genes prM e E do DENV, foi produzida pelo Centro de Pesquisa Médica Naval de U.S. (NMRC) e denominada TVDV. O protótipo vacinal D1ME100, o qual contém sequências de DENV-1, foi registrado em fase I na plataforma *clinicaltrials.gov* no intuito de avaliar a segurança da vacina experimental e se esta é capaz de estimular o sistema imune, porém a vacina induziu baixos títulos de anticorpos neutralizantes (BECKETT et al., 2011). A fim de aumentar a imunogenicidade, foram desenvolvidas formulações contendo o adjuvante Vaxfectin e estas formulações foram testadas em fase I. Os resultados demonstraram uma baixa resposta de anticorpos neutralizantes anti-dengue. Por outro lado, a vacina foi capaz de induzir imunidade celular anti-dengue com a participação de células T produtoras de IFN- $\gamma$  (DANKO et al., 2018).

A tabela 6 resume todos os estudos para dengue que se encontram completos ou em fase clínica de testes registrados na plataforma *clinicaltrials.gov*. Os desafios enfrentados para a obtenção de uma vacina para dengue ainda mobilizam toda a comunidade científica na busca de um melhor entendimento sobre comportamento do DENV no hospedeiro e com diferentes abordagens vacinais. Tal fato reforça a necessidade de novos estudos para a obtenção de uma vacina segura, eficaz, que confira imunidade duradoura e balanceada contra os quatro sorotipos do DENV.

Tabela 6 – Vacinas licenciadas ou em estudos de fase clínica para dengue.

<b>Vacina</b>	<b>Tipo</b>	<b>Estágio</b>	<b>Nº <a href="https://clinicaltrials.gov">clinicaltrials.gov</a></b>
CYD-TDV Sanofi Pasteur	Vacina Quimérica Viva Atenuada	Completo/ licenciada	NCT00842530 NCT01374516 NCT01373281 NCT02948933
TV003/TV005 (NIH/NIAID/Butantan Institute)	Vacina Quimérica Viva Atenuada	Fase III	NCT01436422 NCT01506570 NCT02450838
TDV (Inviragen/Takeda)	Vacina Quimérica Viva Atenuada	Fase III	NCT02193087 NCT02302066 NCT02747927 NCT02948829
TDEN PIV(GSK/WRAIR)	Vírus Purificado Inativado	Fase II	NCT00350337
V180 (Merck/NIAID)	Subunidade	Fase I	NCT00936429 NCT02450838 NCT01477580
D1ME100/TVDV (U.S. Naval Medical Institute)	DNA	Fase I	NCT00290147 NCT01502358

Fonte: Do autor.

## 2 JUSTIFICATIVA

A dengue é uma infecção viral sistêmica que se destaca como um grave problema de saúde pública mundial. Estimativas apontam que aproximadamente 390 milhões de pessoas são infectadas pelo DENV, sendo que 96 milhões manifestam a doença no mundo todo.

Muitas são as medidas aplicadas para controlar os números de infectados anualmente, principalmente baseando-se nas tentativas de redução, eliminação ou erradicação do vetor, *Aedes aegypti*. Porém, as campanhas de combate ao vetor vêm obtendo pouco sucesso na redução da circulação do Dengue vírus, uma vez que o *Aedes aegypti* apresenta uma grande capacidade para sobreviver, mesmo em meio à tentativa de erradicação de criadouros urbanos. Assim, na ausência de um controle eficaz do vetor que transmite o DENV, e na ausência de antivirais disponíveis para dengue, existe a necessidade da obtenção de uma vacina que proteja a população da infecção pelo DENV.

No final do ano de 2015, foi concedido o licenciamento de uma vacina para dengue em alguns países da Ásia e América, incluindo o Brasil. Segundo o fabricante, a vacina confere proteção contra os quatro sorotipos do DENV, contudo, os resultados dos estudos de fase clínica III e IV têm suscitado importantes discussões sobre a eficácia e segurança desta vacina. Recentemente, a fabricante da vacina atualizou as informações do produto. Diante dos dados reportados, a ANVISA recomendou que a vacina não seja administrada em pacientes soronegativos, maiores de 65 anos ou menores de 9 anos de idade. Portanto, a vacina comercial vem sendo alvo de intensas discussões, colocando em dúvida sua aplicabilidade em programas de vacinação contra a dengue.

Um dos fatores que dificultam o desenvolvimento de uma vacina para a dengue é a existência de quatro sorotipos de DENV os quais são geneticamente e antigenicamente distintos. Dessa forma, a proteção homóloga em uma segunda infecção com o DENV é existente e duradoura, porém a proteção cruzada é inexistente ou de curta duração e em uma reinfeção com um sorotipo heterólogo pode haver o desencadeamento de mecanismos patogênicos que levem às formas de manifestação mais graves da doença.

Vacinas baseadas em vetores virais são amplamente estudadas tendo em vista a habilidade dos vírus recombinantes em carregarem genes que codificam proteínas exógenas para dentro das células de organismos hospedeiros de forma segura e eficaz. Além disso, estes vetores são altamente imunogênicos e podem favorecer uma resposta baseada em células T, o que é benéfico em um contexto de infecção viral.

Tendo em vista a experiência de nosso grupo em trabalhar com vacinas para dengue construídas a partir da plataforma MVA, a qual foi eficiente em desencadear a geração de uma resposta polifuncional específica para dengue e capaz de proteger camundongos C57BL/6 após um desafio intracranial com DENV-3, associado à expertise do grupo do Prof. Arturo Reyes Sandoval, Jenner Institute, Universidade de Oxford, no desenvolvimento de diversas vacinas baseadas em vetores virais, este trabalho se justifica pela possibilidade da associação das habilidades dos dois grupos de pesquisa na busca de um novo candidato vacinal para dengue.

Além disso, o trabalho contou com a aplicação de um protocolo de imunização heterólogo utilizando as plataformas Adenoviral e MVA, em que estudos anteriores demonstraram que a combinação desses vetores levou à geração de uma resposta imune celular robusta, polifuncional e protetora, destacando-se como uma excelente estratégia de imunização para melhorar a performance de candidatos vacinais.

Desta forma, o presente trabalho teve como proposta a avaliação da eficácia protetora de sete combinações vacinais tetravalentes para dengue e a caracterização da resposta imune, em modelo murino, no intuito de contribuir no desenvolvimento de vacinas tetravalentes para dengue através da exploração da plataforma vacinal utilizando vetores virais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar sete combinações vacinais tetravalentes para dengue construídas a partir de dois vetores virais (Adenovírus e MVA) a fim de se obter o melhor candidato vacinal que confira eficácia protetora em camundongos desafiados com DENV.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Obter estoques de vírus DENV-1, DENV-2 e DENV-3 neuroadaptados ou neuropatogênicos em modelo murino;
- b. Obter o DENV-4 adaptado ao modelo intracranial murino;
- c. Imunizar camundongos C57BL/6 utilizando a estratégia Dose-Reforço (DR) heterólogo com as diferentes combinações vacinais;
- d. Desafiar os animais imunizados com diferentes sorotipos DENV adaptados ao modelo intracranial murino;
- e. Avaliar parâmetros imunológicos gerados após imunização, incluindo-se respostas humorais e celulares específicas aos antígenos vacinais.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ESTRATÉGIA DE TRABALHO RESUMIDA

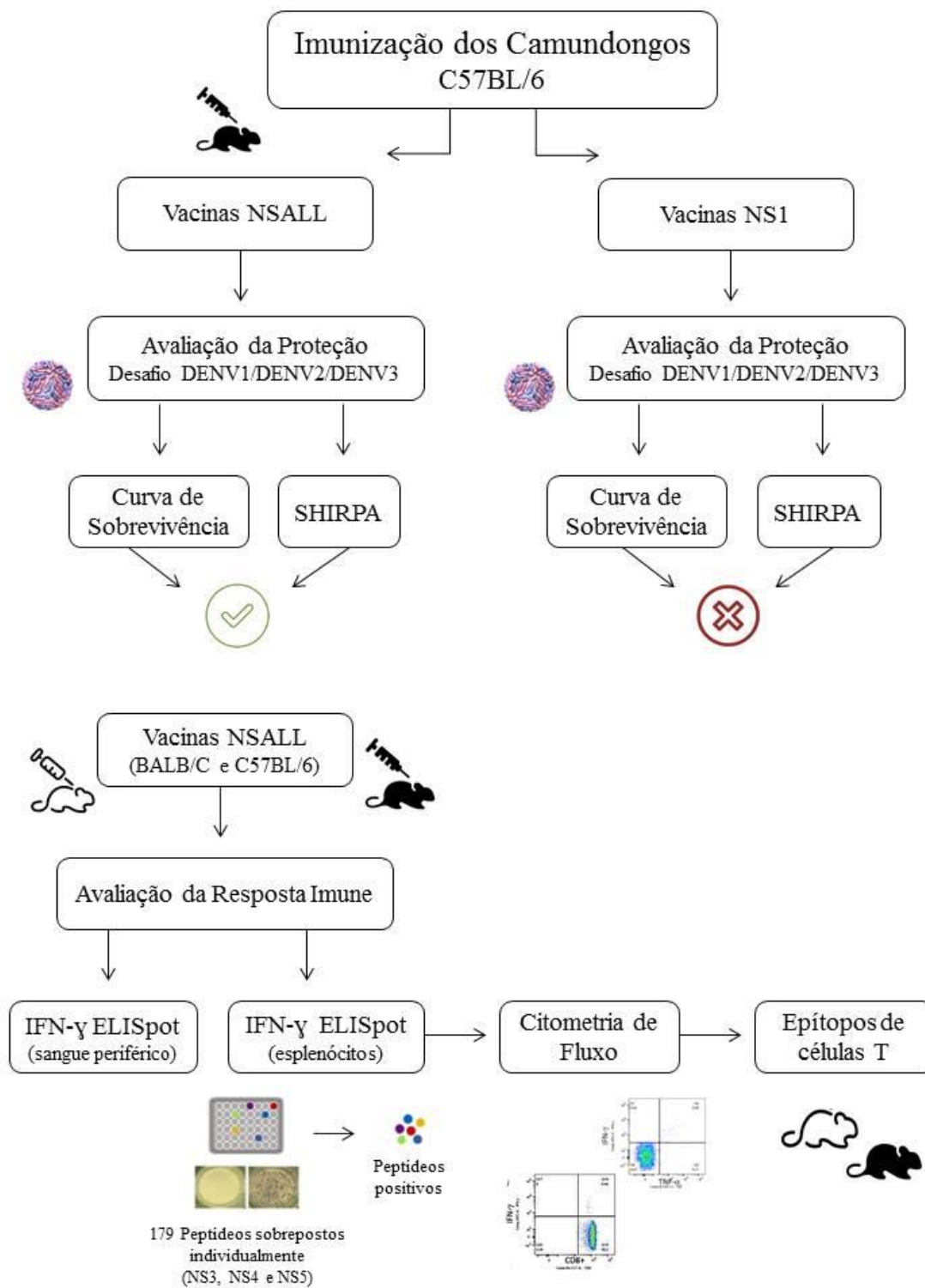


Figura 10 - Esquema representativo da metodologia utilizada.



## 4.2 CÉLULAS

### 4.2.1 Células C6/36 (*Aedes albopictus*)

Para a multiplicação de DENV e obtenção de estoques virais foram utilizadas as células C6/36. Estas células são provenientes do mosquito *Aedes albopictus* e foram cultivadas em meio de meio Leibowitz, L-15, (CULTILAB, BRASIL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, EUA), 100 U/mL de penicilina (SIGMA-ALDRICH, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (SIGMA-ALDRICH, EUA) e 250 ng/mL de anfotericina B (SIGMA-ALDRICH, EUA). A cultura foi mantida à 28°C em BOD.

### 4.2.2 BHK-21

As células de linhagem contínua BHK21 são derivadas de rim de hamsters neonatos. Essas células foram cultivadas em meio DMEM (SIGMA-ALDRICH, EUA) suplementado com 0,37% de NaHCO<sub>3</sub>, 5% de soro fetal bovino (GIBCO, EUA), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 250 ng/mL de anfotericina B. A cultura foi mantida a 37°C, em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

## 4.3 VACINA TETRAVALENTE EXPERIMENTAL CONTRA DENGUE

O estudo teve como intuito o desenvolvimento e obtenção de uma vacina baseada na indução de uma resposta imune celular que previna a infecção por todos os sorotipos do DENV. As sequências presentes nos imunógenos foram identificadas através de um software de bioinformática, desenvolvido por nossos colaboradores da Universidade de Oxford, Inglaterra, que foi capaz de identificar regiões altamente conservadas encontradas nas proteínas não

estruturais do DENV, a partir da análise de aproximadamente 8000 genomas completos de DENV abrangendo todos os quatro sorotipos.

Foram produzidas 7 vacinas denominadas NS1, NS1HepB, HepBNS1, 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL.

- A vacina NS1 inclui sequências da proteína não estrutural 1 identificadas pelo software, que foram conservadas em todos os quatro sorotipos do DENV. (Figura 11A);
- A vacina NS1HepB inclui sequências da proteína não estrutural 1 identificadas pelo software, que foram conservadas em todos os quatro sorotipos do DENV. A sequência de NS1 predita foi fusionada à região N-terminal do antígeno de superfície do vírus de hepatite B (HepBsAg) (Figura 11B). A construção em MVA contém apenas as sequências de NS1;
- A vacina HepBNS1 inclui sequências da proteína NS1, identificadas pelo software, que foram conservadas em todos os quatro sorotipos do DENV. Ao início da sequência de NS1 presente na construção em Adenovírus, foi adicionada a região N-terminal do antígeno de superfície do vírus de hepatite B (HepBsAg) (Figura 11C). A construção em MVA contém apenas as sequências de NS1;
- A vacina 1NSALL inclui sequências das proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5, identificadas pelo software, que foram conservadas em todos os quatro sorotipos, com tamanho de 1,2 kb de comprimento (Figura 11);
- A vacina 2NSALL compreende sequências das proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5 que foram conservadas em todos os quatro sorotipos, além de uma cadeia de sequências conservadas em 3 sorotipos (excetuando-se um dos quatro sorotipos). A porção inicial contém 1,2kb e a segunda cadeia possui 4,4 kb de comprimento (Figura 11);
- A vacina 3NSALL inclui sequências das proteínas não estruturais NS3, NS4 e NS5 que foram conservadas em todos os quatro sorotipos, adicionadas a uma cadeia de sequências conservadas em 3 sorotipos (excetuando-se um dos quatro sorotipos), somadas as sequências conservadas contidas em 2 sorotipos. Além disso, este imunógeno também compreende sequências codificadoras de peptídeos imunogênicos para seres humanos. Tais peptídeos imunogênicos são alvo de solicitação patentária pela Universidade de Oxford e não podem ser

apresentados neste trabalho. O tamanho é de aproximadamente 5 kb de comprimento (Figura 11);

- A vacina 4NSALL compreende sequências que foram conservadas em todos os quatro sorotipos, adicionadas a uma cadeia de sequências conservadas em 3 sorotipos (excetuando-se um dos quatro sorotipos), adicionadas as sequências conservadas contidas em dois sorotipos, além de sequências conservadas em apenas entre diferentes genótipos de um único sorotipo. Além disso, este imunógeno também compreende sequências codificadoras de peptídeos imunogênicos para seres humanos. Tais peptídeos imunogênicos são alvo de solicitação patentária pela Universidade de Oxford e não podem ser apresentados neste trabalho. O tamanho é de aproximadamente 5,5 kb de comprimento (Figura 11).

Segundo análises realizadas por nossos colaboradores, quanto maior a sequência compreendida pela vacina, mais esta se assemelha à estrutura funcional de proteínas não estruturais (especialmente 4NSALL), onde a predição em 3D mostrou o dobramento correto, semelhante às proteínas selvagens.

Cabe ressaltar que as sequências gênicas contidas nestas vacinas é objeto de patente por parte de nosso colaborador estrangeiro. Como parte do acordo firmado entre a Universidade de Oxford e a UFMG, estas sequências, ou sua composição exata, não podem ser apresentadas em minúcia. Por isso estas não serão detalhadas nesse volume.

Estas sequências foram sintetizadas e clonadas em vetores virais, Adenovírus de chimpanzé (ChAdOX1) e poxvírus (MVA). As vacinas foram produzidas, amplificadas e tituladas pelo Dr. Arturo Reyes Sandoval (Jenner Institute, University of Oxford, Reino Unido), colaborador e co-orientador deste projeto.

As figuras 11 e 12 exemplificam as sequências das vacinas NS1 e NSALL, respectivamente.

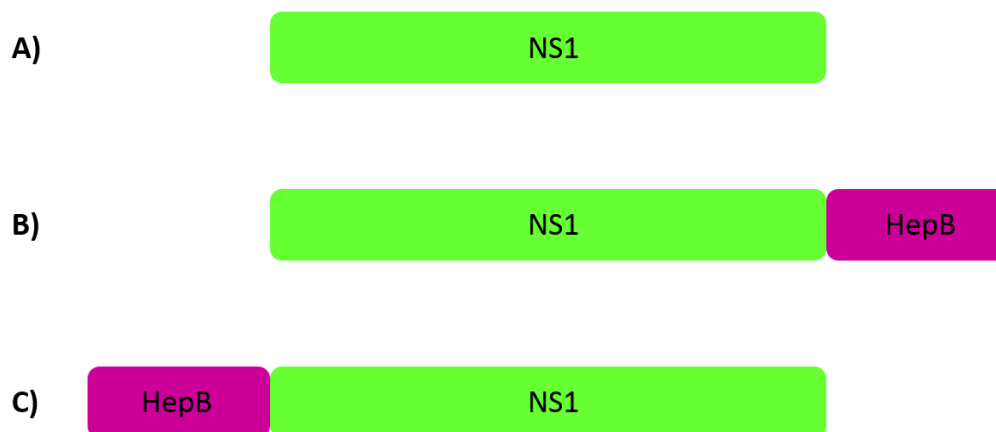


Figura 11 - **Representação esquemática das vacinas NS1 nas construções em Vetor Adenoviral.** **A)** A vacina NS1 inclui seqüências da proteína não estrutural 1 (NS1), identificadas pelo software, que foram conservadas em todos os quatro sorotipos do DENV. **B)** A vacina NS1HepB contém seqüências conservadas da proteína NS1 identificadas em todos os sorotipos. A seqüência de NS1 presente na construção Adenoviral foi fusionada à região N-terminal do antígeno de superfície do vírus de hepatite B (HepBsAg). **C)** A vacina HepBNS1 inclui seqüências da proteína NS1, identificadas pelo software, que foram conservadas em todos os quatro sorotipos do DENV. Ao início dessas seqüências, foi adicionada a região N-terminal do antígeno de superfície do vírus de hepatite B (HepBsAg).



Figura 12 – **Representação esquemática das vacinas NSALL.** As seqüências identificadas em azul contêm seqüências conservadas entre os quatro sorotipos do DENV que foram identificadas pelo software. Em amarelo são identificadas as seqüências conservadas em três sorotipos do DENV. Em vermelho, contêm as seqüências conservadas do DENV que foram identificadas como conservadas em dois sorotipos do DENV. Em verde estão as seqüências conservadas do DENV que foram identificadas com conservada em apenas 1 sorotipo do DENV, considerando os vários isolados daquele mesmo sorotipo que foram depositados em banco de dados. A região marcada em roxo contêm seqüências peptídicas imunogênicas para seres humanos.

#### 4.4 *Dengue virus*

#### 4.4.1 DENV-1, DENV-2 E DENV-3

A amostra de DENV-1 Mochizuki é uma amostra que foi isolada durante uma epidemia de dengue no Japão, em 1943, por passagens em cérebro de camundongos (HOTTA, 1952). Já a amostra de DENV-2 New Guinea C foi isolada por Sabin, em 1944, durante uma epidemia que ocorreu no Hawai e Nova Guiné (SABIN, 1945). Ambas as amostras são neuroadaptadas ao modelo murino e bem caracterizadas para uso em pesquisas laboratoriais. Essas amostras foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Erna G Kroon (Depto. de Microbiologia, ICB/UFMG) e Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP/SP), respectivamente.

A amostra DENV-3 MG20 é uma amostra isolada, no ano de 2004 no Estado de Minas Gerais, do soro de um paciente com febre hemorrágica da dengue (FHD). Esta amostra é capaz de induzir uma infecção virulenta com envolvimento do sistema nervoso central em modelo murino (SNC), resultando em morte de camundongos imunocompetentes sem a necessidade de adaptação ao hospedeiro. Essa amostra foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Erna Kroon (DE SOUZA et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2008).

#### 4.5 CAMUNDONGOS

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 6 a 8 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central (UFMG). Todo procedimento experimental foi aprovado pelo CEUA-UFMG (protocolo nº 27/2016 – ANEXO 1) e realizado de acordo com as regulamentações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG.

#### 4.6 PRODUÇÃO DE ESTOQUES DE *Dengue virus* 1, 2, e 3

Para a produção dos estoques de DENV, os vírus foram diluídos a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 em meio Leibowitz L-15 (CULTILAB, BRASIL) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB) (GIBCO, EUA), 100 U/mL de penicilina (SIGMA-

ALDRICH, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (SIGMA-ALDRICH, EUA) 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 135 cm<sup>2</sup> (TPP, SUÍÇA). Após a adição do inóculo, as células foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora (h) para favorecer a adsorção viral. O conteúdo da garrafa foi descartado e adicionou-se 20 mL de meio L-15 suplementado com 2% de SFB inativado 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 250 ng/mL de anfotericina B. 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 a 3000 rpm por 15 minutos (EPPENDORF 5810R, ALEMANHA), aliquoteado e armazenado a -80°C até o uso.

#### 4.7 TITULAÇÃO VIRAL

Células BHK-21 cultivadas em meio DMEM (CULTILAB, BRASIL) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino inativado, SFB, (GIBCO, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (SIGMA-ALDRICH, EUA) foram semeadas em placas de 6 poços (TPP, SUÍÇA) na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 16 h. No dia seguinte, o meio foi descartado e diluições seriadas dos vírus ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram adicionadas em poços pré-determinados e incubados por 1 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para adsorção viral.

Após a incubação, as diluições foram descartadas e adicionou-se 2 mL de meio DMEM contendo 1,6% de CarboximetilCelulose (SYNTH, BRASIL) suplementado com 2% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. 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 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, sendo expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DAS DOSES LETAIS DOS DENVs POR INOCULAÇÃO INTRACRANIANA DE CAMUNDONGOS

Em uma avaliação da proteção conferida por um imunógeno, é importante que a dose utilizada no desafio dos animais não imunizados seja capaz de induzir 100% de morte. Porém, doses muito elevadas podem mascarar a eficiência do imunógeno, levando a obtenção de resultados inferiores aos esperados. Dessa forma, torna-se necessário o estabelecimento de uma dose letal para garantir a confiabilidade dos testes.

Para a amostra de DENV-1 foram testadas as doses  $2,5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$  e  $10^3$  UFP de vírus. A avaliação da dose letal de DENV-2 foi feita a partir das doses  $2 \times 10^4$  e  $5 \times 10^5$  UFP de DENV-2. A amostra de DENV-3 foi avaliada nas doses  $5 \times 10^2$ ,  $10^3$  e  $2 \times 10^3$ . Todas as doses testadas foram baseadas em dados já descritos na literatura ou em resultados obtidos previamente em nosso grupo de pesquisa.

Neste intuito, 6 camundongos C57BL/6 fêmeas com 6-7 semanas foram anestesiados pela via intraperitoneal com uma solução de cetamina (100 mg/Kg) e Xilasina (10 mg/Kg). 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 pela via intracraniana (i.c.) com 20  $\mu$ L PBS 1X. Os animais foram monitorados diariamente em até 15 dias após a infecção para a obtenção das curvas de sobrevivência.

#### 4.9 ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

Sete conjuntos de vacinas foram testados em regime dose-reforço (DR) heterólogo. Camundongos C57BL/6 fêmeas de 6-7 semanas de idade foram mantidos com livre acesso a alimento e água estéril. Os camundongos foram imunizados pela via intramuscular, na parte superior da coxa, com duas doses separadas por 7 dias. O esquema de imunização está apresentado abaixo:

- a) ChadNS1 como dose + MVANS1 como reforço
- b) ChadNS1HepB como dose + MVANS1 como reforço

- c) ChadHepBNS1 como dose + MVANS1 como reforço
- d) Chad-1NSALL como dose + MVA-1NSALL como reforço
- e) Chad-2NSALL como dose + MVA-2NSALL como reforço
- f) Chad-3NSALL como dose + MVA-3NSALL como reforço
- g) Chad-4NSALL como dose + MVA-4NSALL como reforço

As doses foram compostas por  $5 \times 10^9$  partículas virais de Adenovírus e  $1 \times 10^6$  UFP de MVA, ambos em 50  $\mu$ L de solução salina tamponada. Também foram incluídos um grupo vacinado com uma vacina não relacionada ao estudo (sem a sequência do DENV), o qual será denominado como grupo vetor em todo este manuscrito, e controles negativos de infecção (inoculados apenas com PBS). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 27/2016 – ANEXO 1).

#### 4.10 DESAFIO

Os camundongos imunizados pelo protocolo dose-reforço foram desafiados com DENV. Desta forma, após 14 dias da segunda dose do imunógeno, os camundongos foram infectados, pela via intracraniana, com doses letais determinadas no item 4.7. Após o procedimento, os camundongos foram observados diariamente com relação ao surgimento de sinais de doença e em relação à mortalidade. Os animais que perderam 20% de seu peso inicial ou apresentaram paralisia foram eutanasiados, segundo indicações do Comitê de Ética em Experimentação Animal. Os animais foram acompanhados diariamente por 20 dias e partir destes dados foram geradas curvas de sobrevivência.

#### 4.11 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 7). Os animais foram avaliados em um intervalo máximo de dois dias para cada análise e os *scores* para cada categoria foram calculados. Análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 6.01 pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (LACKNER et al., 2006; ROGERS et al., 2001). No anexo II encontram-se as planilhas contendo os parâmetros avaliados e seus respectivos *scores*.

Tabela 7 – 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, lacrimejamento, salivação
Função e reflexo sensorial	Escape ao toque, posicionamento visual, pina reflexo, reflexo corneal, beliscada nos dedos, reflexo de postural.

Fonte: Adaptado de LACKNER et al., 2006

## 4.12 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE

### 4.12.1 Ensaios de imunização

Camundongos C57BL/6 e BALB/c fêmeas de 6-7 semanas de idade foram mantidos com livre acesso a alimento e água estéril. Os camundongos foram imunizados pela via intramuscular, na parte superior da coxa, com duas doses separadas por 7 dias. O esquema de imunização está apresentado abaixo:

- h) Chad-1NSALL como dose + MVA-1NSALL como reforço
- i) Chad-2NSALL como dose + MVA-2NSALL como reforço
- j) Chad-3NSALL como dose + MVA-3NSALL como reforço

k) Chad-4NSALL como dose + MVA-4NSALL como reforço

As doses foram compostas por  $5 \times 10^9$  partículas virais de Adenovírus e  $1 \times 10^6$  UFP de MVA, ambos em 50  $\mu$ L de solução salina tamponada. Também foi incluído um grupo vacinado com uma vacina não relacionada ao estudo (vacina construída sem a sequência do DENV) o qual será denominado como grupo vetor em todo este manuscrito. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Oxford, Reino Unido, uma vez que estes experimentos foram conduzidos naquela universidade, por ocasião de estágio doutoral Sanduíche.

#### 4.12.2 Peptídeos sintéticos

A imunogenicidade das vacinas foi avaliada pela utilização de peptídeos sobrepostos (*overlapping peptides*) que cobrem as sequências de aminoácidos das proteínas NS3 (70 peptídeos), NS4 (40 peptídeos) e NS5 (69 peptídeos) do DENV. Para tanto, os peptídeos sintéticos liofilizados foram adquiridos da empresa Pepscan (Holanda). Os peptídeos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 100 mg/mL e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$ . O anexo III contém a descrição dos 179 peptídeos utilizados neste trabalho.

#### 4.12.3 Enzyme-linked immune absorbent spot (ELISpot) para identificação de epítomos de células T

Para a identificação dos epítomos de células T, as células provenientes do baço dos animais imunizados (14 dias após o reforço) foram isoladas, estimuladas com os peptídeos sintéticos e a produção de IFN- $\gamma$  foi avaliada pela técnica de ELISpot.

No dia anterior ao ensaio, placas Multiscreen de filtração e ensaio de 96 poços MAIP 4510 (MILIPORE, ALEMANHA) foram incubadas por 1 minuto com solução de etanol 30% para a ativação da membrana e lavadas por 4 vezes com água ultrapura estéril até a total remoção da solução de etanol. Após a última lavagem, a placa foi vertida em papel absorvente para a remoção de toda água contida nos poços da placa. Posteriormente, as placas sensibilizadas com  $5 \mu\text{g/mL}$  anticorpo monoclonal anti-mouse IFN- $\gamma$  AN18 diluído em tampão

carbonato/bicarbonato pH 9,6 (15mM de carbonato de sódio e 85mM de bicarbonato de sódio) (MABTECH, SUÉCIA) e incubadas a 4°C por 16 horas.

No dia seguinte, os camundongos foram anestesiados com Isofurano por inalação e sacrificados por deslocamento cervical. Os baços foram coletados, transferidos para tubos de centrifugação com fundo cônico contendo meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH, EUA) suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais (SIGMA-ALDRICH, EUA), 4 mM de L-glutamina (SIGMA-ALDRICH, EUA), 100 U/mL de penicilina (SIGMA-ALDRICH, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (SIGMA-ALDRICH, EUA) e mantidos em gelo até o processamento. Com o auxílio de um êmbolo de seringa, os baços foram macerados em 2 mL de PBS 1X para a obtenção de uma suspensão celular, a qual foi filtrada em coador de células *Cell Strainer* (MERK, ALEMANHA) com poro de 70 µm e as células sedimentadas por centrifugação à 424g e temperatura de 20°C (EPPENDORF 5810R, ALEMANHA). O sedimento foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente com 5 mL de tampão de lise de eritrócitos Amônio-Cloro-Potássio, ACK, (LONZA, EUA) e a reação parada com 20 mL de PBS. A suspensão foi novamente submetida à centrifugação a 424g e temperatura de 20°C, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas para a concentração de 10<sup>6</sup> células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 4 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células transferidas para as placas sensibilizadas no dia anterior. Para tanto, a solução contendo anticorpo monoclonal anti-mouse IFN-γ AN18 foi removida da placa e aos poços foram adicionados 200 µL de RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e as placas incubadas a 37°C por 1 hora. Decorrido este tempo, o meio foi removido e 100 µL das células (10<sup>5</sup> células por poços) foram adicionadas e estimuladas com 10 µg dos peptídeos sintéticos ou com o controle positivo (PMA 20ng/mL e Ionomicina 0,5 µg/mL) por 16 horas à 37 °C. Em todas as placas também foram incluídos controles negativos de estimulação (meio de cultura RPMI 1640).

O conteúdo dos poços foi removido e as placas lavadas por 6 vezes com 200 µL de PBS. Após a última lavagem, a placa foi vertida em papel absorvente para a remoção de resíduos de solução de lavagem e foram adicionados aos poços 1 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-mouse IFN-γ R4-6A2 biotilado diluído (MABTECH, SUÉCIA) em PBS. As placas foram incubadas por 2 horas e lavadas com PBS por 6 vezes. Após a última lavagem a placa foi vertida em papel toalha para completa secagem dos poços e a estes foram adicionados 1 µg/mL de estreptavidina fosfatase alcalina (MABTECH, SUÉCIA) diluída em PBS e a placa incubada por 1 h à temperatura ambiente.

Para revelação dos spots foi utilizado o Kit Colorimetric AP substrate reagent kit (BIORAD, EUA) conforme as especificações do fabricante. O número total de spots foi dado pelo número de spots contados (referentes à produção de spots por  $10^5$  células/poço) multiplicado por 10 para a obtenção do número de spots por 1 milhão de células (número de spots/ $10^6$  células).

#### 4.12.4 Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas (ICS)

Quatorze dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e o baço de cada animal foi extraído. Com o auxílio de um êmbolo, os baços foram macerados em 2 mL de PBS para a obtenção de uma suspensão celular, a qual foi filtrada em filtro de cultura de células *Cell Strainer* (MERK, ALEMANHA) com poro de 70  $\mu\text{M}$  e as células sedimentadas por centrifugação a 424g e temperatura de 20°C (EPPENDORF 5810R, ALEMANHA). O sedimento foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente com 5 mL de tampão de lise de eritrócitos Amônio-Cloro-Potássio, ACK, (LONZA, EUA) e a reação parada com 20 mL de PBS. A suspensão foi novamente submetida à centrifugação (424g) e temperatura de 20°C, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas para a concentração de  $10^7$  células/mL em meio RPMI 1640 completo (suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 4 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina) (SIGMA-ALDRICH, EUA). As células foram transferidas (100 $\mu\text{L}$ /poço) para placas de cultura de 96 poços com fundo em “U” e estimuladas com os 10 $\mu\text{g/mL}$  dos peptídeos por 1.30 h em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Também foram incluídos no ensaio os controles negativos (células estimuladas com DMEM) e positivo (PMA 20ng/mL e Ionomicina 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Após a estimulação, foram adicionados às células uma solução contendo 1  $\mu\text{L/mL}$  de Golgi-Plug (BD, EUA), 0,66  $\mu\text{L/mL}$  de Golgi-Stop (BD, EUA) e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de CD107a BV 786 (BD, EUA). A placa foi incubada por mais 5h a 37°C em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, esta foi incubada em geladeira por 12 horas.

No dia seguinte, as células foram transferidas placa de fundo “V” e a placa centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em 1 $\mu\text{L/mL}$  de live/dead (THERMO FISHER SCIENTIFIC, EUA) em PBS e a placa incubada por 15 min.

Após, a placa foi lavada com solução de PBS e foi adicionado aos poços uma solução de Fc block (BD, EUA) na diluição de 1/100 em PBS contendo 1% de BSA (FACS *buffer*) e a placa incubada a 4°C por 5 minutos.

As células foram marcadas com os anticorpos PE-Cy<sup>TM</sup>7 Anti-Mouse CD8a (Clone 53 6.7) diluído a 1/200 em FACS *buffer*, Alexa Fluor® 488 Anti-Mouse CD3e (Clone 145-2C11) diluído a 1/100, APC-H7 anti-Mouse CD4 (Clone GK1.5) diluído a 1/200 e a placa incubada por 30 min a 4°C.

As placas foram lavadas com 150 µL de FACS *buffer* e centrifugadas por 2 min a 2.100 rpm. e foi adicionado 100 µL da solução Cytotfix/Cytoper (BD, EUA) e a placa incubada por 5 min a 4°C, seguida de duas lavagem com solução Perm/Wash<sup>TM</sup> Buffer (BD,EUA).

Os anticorpos intracelulares APC Rat Anti-Mouse IFN- $\gamma$  (Clone XMG1.2)(diluição1/100) e BV421<sup>TM</sup> anti-mouse TNF- $\alpha$  (clone MP6-XT22) foram diluídos em solução Perm/Wash<sup>TM</sup> Buffer (BD, EUA) e 50 µL da solução contendo os anticorpos foram adicionadas nos poços e as placas incubadas por 30 min a 4°C.

A placa foi novamente lavada por duas vezes em solução PERM/WASH (BD,EUA) e as células fixadas com solução de PBS formalina 2% e ressuspendidas em FACS *buffer* para a aquisição em citômetro de fluxo FACS Celesta (BD, EUA), sendo adquiridos pelo menos 100.000 eventos dentro do *gate* para linfócitos CD3. As análises foram realizadas utilizando o programa FlowJo (TREE STAR INC., EUA). Os resultados inespecíficos foram determinados utilizando amostras não estimuladas por peptídeos e os valores inespecíficos foram subtraídos dos valores apresentados para as amostras teste.

#### 4.12.5 Predição de epítomos de células T

A predição de epítomos de células T foi realizada utilizando-se os programas de predição NetMHC 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) (ANDREATTA; NIELSEN, 2016; NIELSEN et al., 2003).

Foi verificada a existência de epítomos específicos para os alelos das moléculas de MHC-I murinos H2-Kb e H2-Dd.

..

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DETERMINAÇÃO DAS DOSES LETAIS

As doses letais para os sorotipos 1, 2 e 3 do DENV foram testadas pela infecção através da via intracraniana a partir da observação da mortalidade dos animais frente a diferentes doses dos vírus testados. A dose letal escolhida foi aquela que apresentou taxa de mortalidade entre 80 a 100%, sendo esta, selecionada a partir da análise dos resultados obtidos individualmente para cada sorotipo testado. Como critério de escolha da dose letal e com o propósito de se evitar a inoculação de títulos muito elevados de vírus, o que pode mascarar o efeito protetor dos imunógenos testados, optamos por escolher doses que causam mortalidade menor que 100% para os animais testados.

Para o sorotipo 1 do DENV, foram testadas as doses  $2,5 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$  e  $10^3$  UFP de vírus. As doses  $5 \times 10^2$  e  $10^3$  geraram 100% de mortalidade para todos os animais, porém a dose de  $2,5 \times 10^2$  gerou 87,5% de mortalidade e esta foi escolhida para dar prosseguimento aos testes.

A dose letal de DENV-2 foi avaliada a partir das doses  $2 \times 10^4$  e  $5 \times 10^5$  UFP de DENV-2. Ambas as doses testadas geraram 100% de mortalidade dos animais, sendo a dose de  $2 \times 10^4$  escolhida para os testes futuros.

Para a amostra de DENV-3 foram avaliadas as doses  $5 \times 10^2$ ,  $10^3$  e  $2 \times 10^3$  PFU. Quando inoculada a dose  $5 \times 10^2$  PFU, apenas 16,7% dos animais morreram. A dose de  $10^3$  foi suficiente para matar 50% dos animais infectados. Em contrapartida, a dose de  $2 \times 10^3$  PFU de DENV-3 levou 100% dos animais infectados a óbito. Apesar de ser uma dose com a qual se observou morte de 100% dos animais, esta foi selecionada para os futuros testes de desafio.

Em todas as análises de dose letal, foram incluídos controles negativos de infecção e estes animais permaneceram vivos após a inoculação intracranial de PBS.

A tabela 8 evidencia todas as doses testadas para os sorotipos e as doses letais selecionadas.

Tabela 8- Determinação das doses letais de DENV por infecção pela via intracraniana

Sorotipo	Mortalidade/%						Dose selecionada/ PFU
	2,5x10 <sup>2</sup> PFU	5x10 <sup>2</sup> PFU	10 <sup>3</sup> PFU	2x10 <sup>3</sup> PFU	2x10 <sup>4</sup> PFU	5x 10 <sup>5</sup> PFU	
	<b>DENV-1</b>	87,5 (5/6)	100 (6/6)	100 (6/6)	-	-	-
<b>DENV-2</b>	-	-	-	-	100 (6/6)	100 (6/6)	2x10 <sup>4</sup>
<b>DENV-3</b>	-	16,7 (1/6)	50 (3/6)	100 (6/6)	-	-	2x10 <sup>3</sup>

Fonte: Do autor. Nota: DL- Dose letal

Como parte deste estudo pré-clínico, objetivamos o uso de todos os sorotipos do DENV na realização dos desafios, em modelo intracranial murino. Contudo, apesar de nossos esforços, não foi possível a obtenção de uma amostra de DENV-4 neuroadaptada ou neuropatogênica para o nosso modelo de estudo. Dessa forma, os desafios apresentados neste estudo foram realizados apenas com os sorotipos 1, 2 e 3 do DENV.

## 5.2 DESAFIOS E ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

### 5.2.1 Vacinas NS1

A fim de se testar a proteção vacinal gerada contra os sorotipos de DENV, os animais foram imunizados com as vacinas construídas contendo a sequência da proteína NS1 e desafiados com os sorotipos do 1, 2 e 3 de DENV.

Todos os animais imunizados com as vacinas NS1 e desafiados com DENV-1 apresentaram sinais de encefalite a partir do 6º dia pós infecção e foram a óbito até o 8º dia. O grupo imunizado apenas com os vetores virais sem o antígeno do DENV (VETORES), bem como os animais inoculados com PBS apresentaram taxa de mortalidade de 100% quando infectados com DENV1. Para o grupo controle negativo, todos os animais inoculados apenas com PBS sobreviveram (Figura 13).

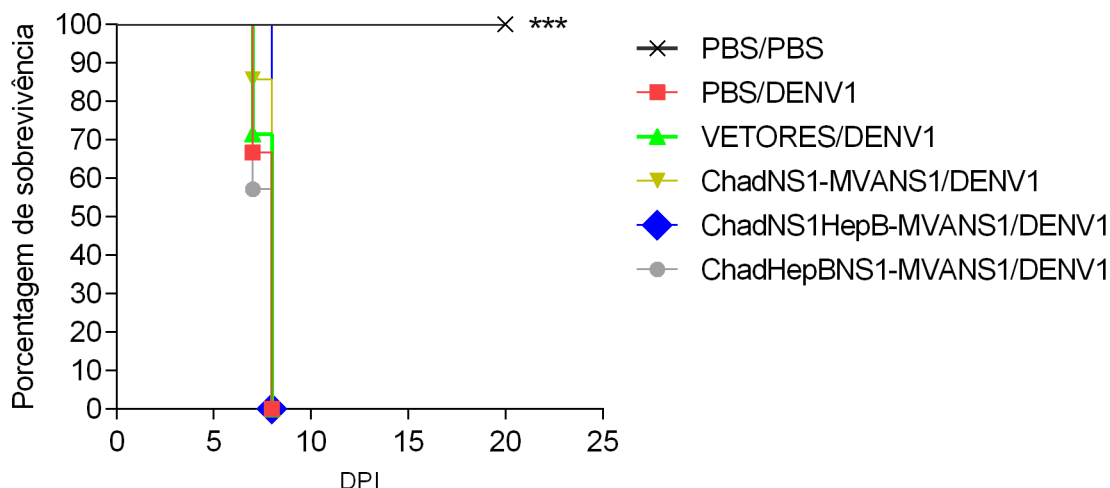


Figura 13 – **Avaliação da proteção das vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-1.** Camundongos C57BL6 vacinados em regime dose reforço heterólogo com ChadNS1-MVANS1, ChadNS1HepB-MVANS1, ChadHepBNS1-MVANS1 e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2,5 \times 10^2$  da amostra de DENV-1 Mochizuki e monitorados diariamente até 20 dias pós infecção. 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. Foram analisados um total de 7 animais por grupo e não houve sobrevivência em nenhum grupo vacinado e desafiado com DENV-1. Todos os animais inoculados pela via intracranial com PBS sobreviveram. \*\*\*  $p \leq 0,0005$  comparado ao grupo controle (PBS/DENV-1).

Os sinais relacionados à infecção também foram avaliados após o desafio pela realização do protocolo SHIRPA, onde se avaliou a força e tônus muscular, o comportamento motor, o estado neuropsiquiátrico, a função autônoma e a função e reflexo sensorial. A análise de todos os parâmetros avaliados revelou que os animais vacinados se comportam como o controle infectado com o DENV-1, exceto para o grupo ChadNS1HepB-MVANS1, que apresentou uma diferença significativa em relação ao controle infectado para os parâmetros: comportamento motor, estado neuropsiquiátrico, função autônoma e função e reflexo sensorial (Figura 14). Porém, como o grupo apresentou uma taxa de mortalidade de 100% para os animais infectados com DENV-1, assim como os demais candidatos, considera-se que as vacinas não apresentaram eficácia protetora contra DENV-1.



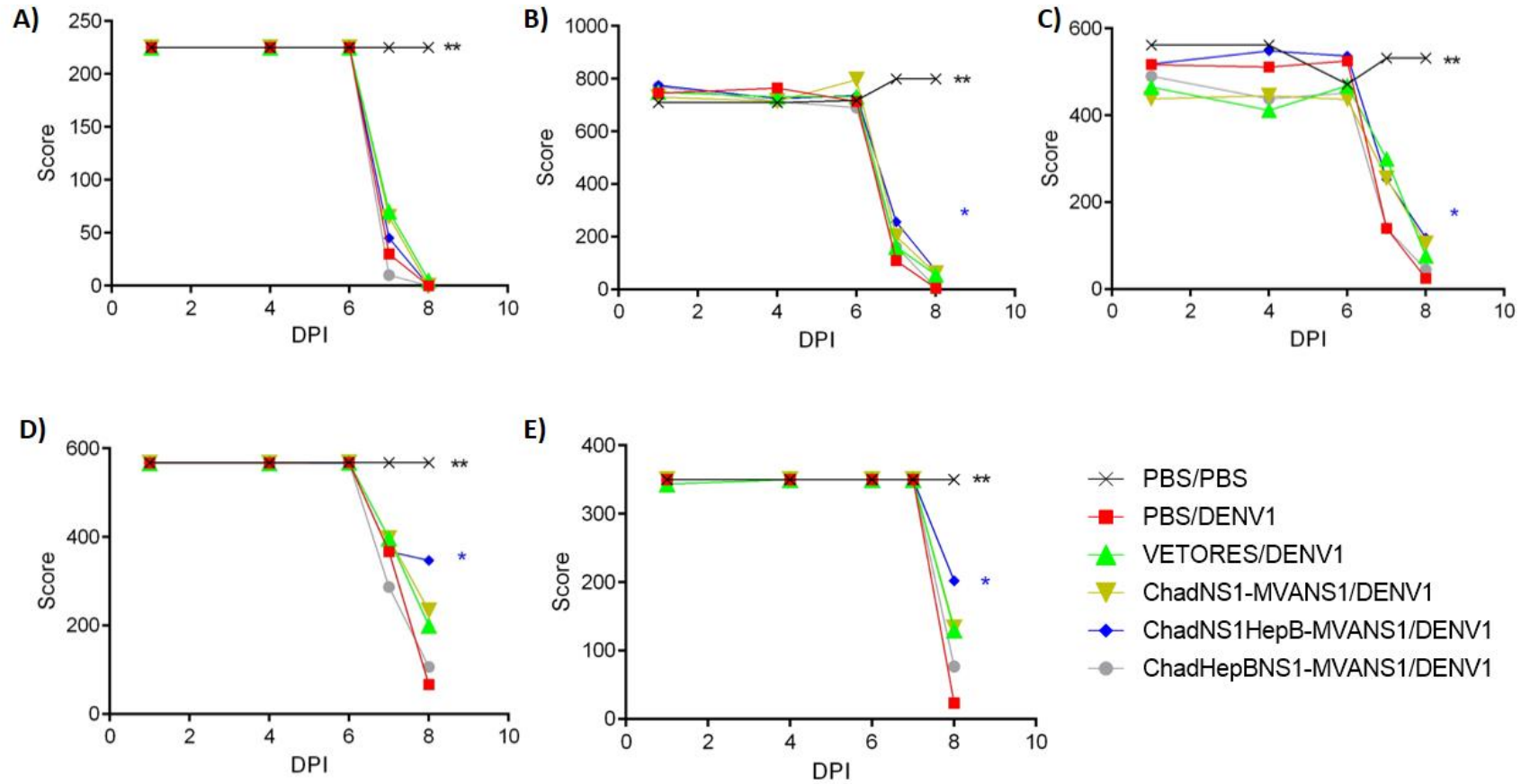


Figura 14 - **Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-1.** Os animais vacinados e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A)** força e tônus muscular, **B)** comportamento motor, **C)** estado neuropsiquiátrico, **D)** função autônoma e **E)** função e reflexo sensorial. Os pontos apresentados são uma média de cinco animais por grupo. Os scores dos animais vacinados e infectados foram comparados aos scores dos animais controle (PBS/DENV-1) e as análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 6.01 pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,005$  comparado aos scores dos animais controles (PBS/DENV-1).

De forma semelhante, foi avaliada a proteção dos imunógenos frente a infecção com DENV-2. Os animais vacinados apresentaram sinais de encefalite ao 6º dia pós infecção e foram a óbito até o 9º dia. Os animais controle de vetores e controle positivo de infecção foram a óbito e todos os animais inoculados apenas com PBS, no desafio, sobreviveram (Figura 15).

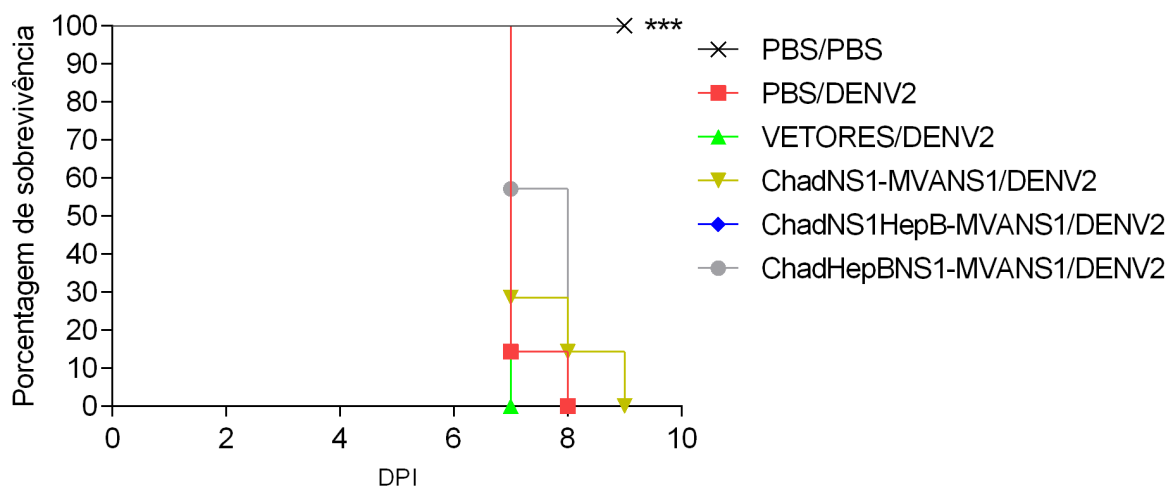


Figura 15 – **Avaliação da proteção das vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-2.** Camundongos C57BL6 vacinados em regime dose reforço heterólogo com ChadNS1-MVANS1, ChadNS1HepB-MVANS1, ChadHepBNS1-MVANS1 e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2 \times 10^4$  da amostra de DENV-2 New Guinea C (NGC) e monitorados diariamente até 20 dias pós infecção. 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. Foram analisados um total de 7 animais por grupo e não houve sobrevivência em nenhum grupo vacinado e desafiado com DENV-2. Todos os animais inoculados pela via intracranial com PBS sobreviveram. \*\*\*  $p \leq 0,0005$  comparado ao grupo controle (PBS/DENV-2).

A aplicação do protocolo SHIRPA mostrou que todos os animais apresentaram *scores* baixos para todos os parâmetros avaliados, apresentando sinais de encefalite, comprometimento motor e perda de peso extrema (Figura 16).

Esses sinais contribuem para a queda dos *scores* avaliados e reforçam que as vacinas NS1 não protegem no desafio com DENV-2.

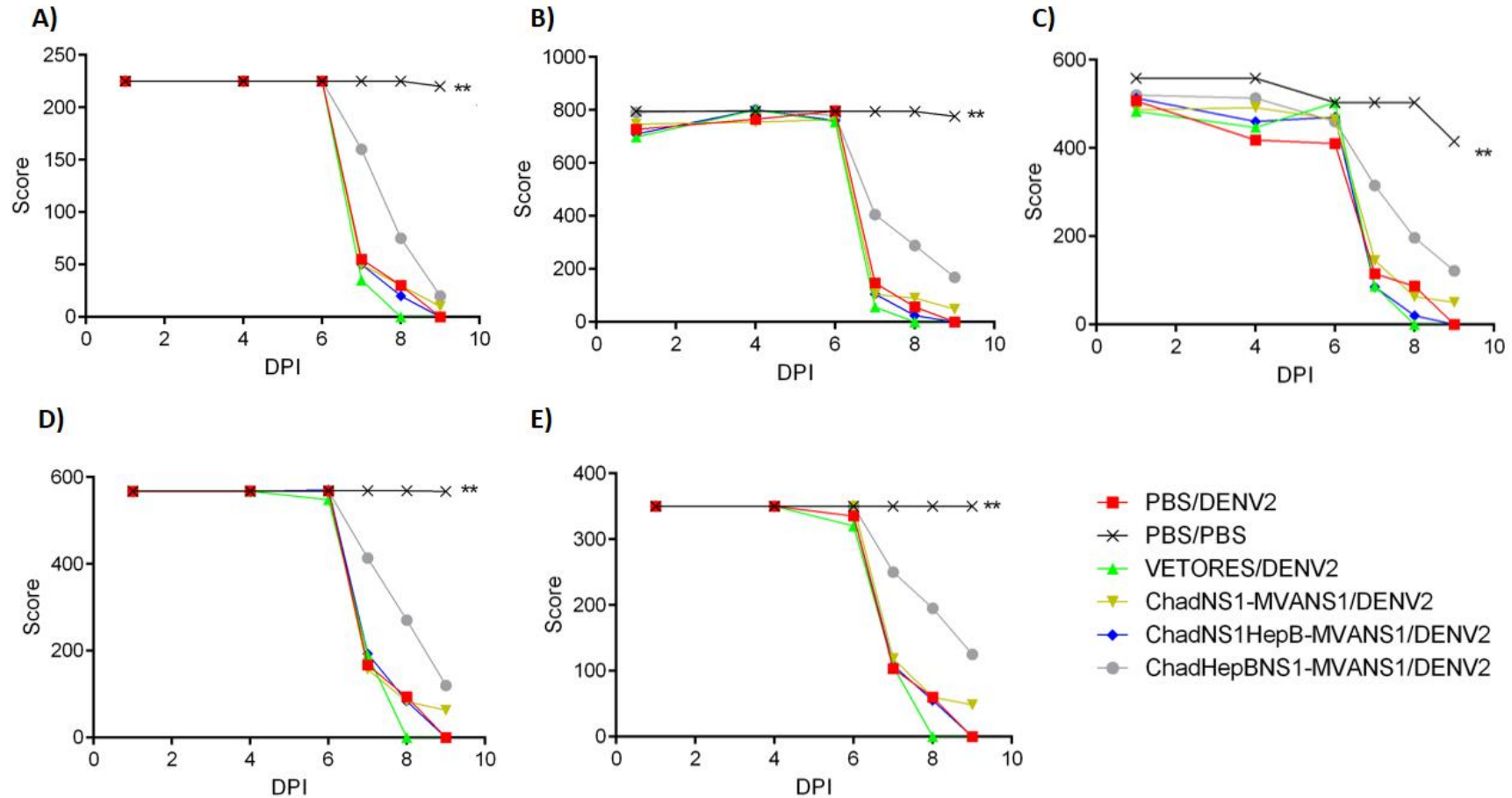


Figura 16 - **Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-2.** Os animais vacinados e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A)** força e tônus muscular, **B)** comportamento motor, **C)** estado neuropsiquiátrico, **D)** função autônoma e **E)** função e reflexo sensorial. Os pontos apresentados são uma média de cinco animais por grupo. Os scores dos animais vacinados e infectados foram comparados aos scores dos animais controle (PBS/DENV-2) e as análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 6.01 pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,005$  comparado aos scores dos animais controles (PBS/DENV-2).

Por fim, a eficácia das vacinas foi avaliada na proteção contra o desafio com DENV-3. Os resultados mostraram que a vacina ChadNS1-MVANS1 levou a 14,28% de sobrevivência dos animais desafiados com DENV-3. A vacina ChadNS1HepB-MVANS1 levou a 42,86% de sobrevivência, ao passo que a vacina ChadHepBNS1-MVANS1 levou a 57,14% de sobrevivência dos animais infectados. O grupo controle positivo de infecção apresentou 16,66% de sobrevivência e o grupo controle de vetores apresentou 42,86% de sobrevivência (Figura 17).

A taxa de proteção observada no grupo vacinado com os vetores virais vazios pode ser gerada por uma resposta benéfica desencadeada pela própria imunização com os vetores virais. Resultados semelhantes a esse foram observados em um trabalho publicado em nosso grupo de pesquisa, onde o grupo imunizado apenas com o vetor MVA conferiu 57,14% de proteção após um desafio com DENV-3 (QUINAN; VERSIANI; DA FONSECA, 2016).

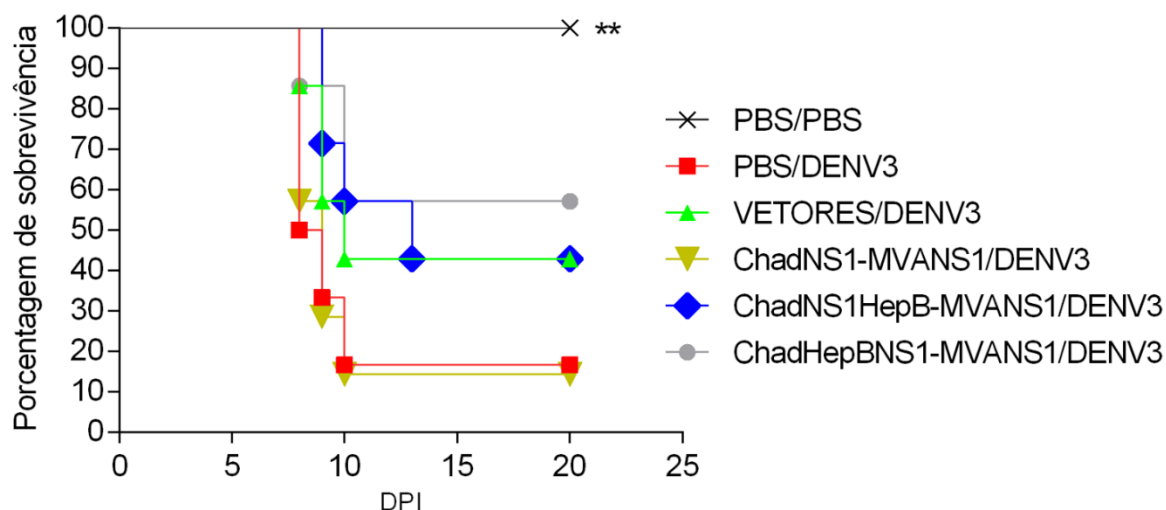


Figura 17 – **Avaliação da proteção das vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-3.** Camundongos C57BL6 vacinados em regime dose reforço heterólogo com ChadNS1-MVANS1, ChadNS1HepB-MVANS1, ChadHepBNS1-MVANS1 e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2 \times 10^3$  da amostra de DENV-3 MG20 e monitorados diariamente até 20 dias pós infecção. 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. Foram analisados um total de 7 animais por grupo e as taxas de sobrevivência foram 14,28% (ChadNS1-MVANS1), 42,86% (ChadNS1HepB-MVANS1), 57,14% (ChadHepBNS1-MVANS1), 42,86% (vetores) e 16,66% (PBS/DENV-3). Todos os animais inoculados pela via intracranial com PBS sobreviveram. \*\*  $p \leq 0,005$  comparado ao grupo controle (PBS/DENV-3).

A análise pelo protocolo SHIRPA mostra que os animais vacinados com ChadNS1HepB-MVANS1 apresentaram diferença significativa no comportamento motor quando comparado ao controle infectado. Entretanto, para os demais parâmetros é possível

verificar de um modo geral, que os animais vacinados e desafiados apresentaram comprometimento neurológico e motor após a infecção pelo DENV (Figura 18).

Os testes realizados com as vacinas NS1 revelaram que estas não são bons imunógenos para conferir proteção contra DENV em modelo murino.

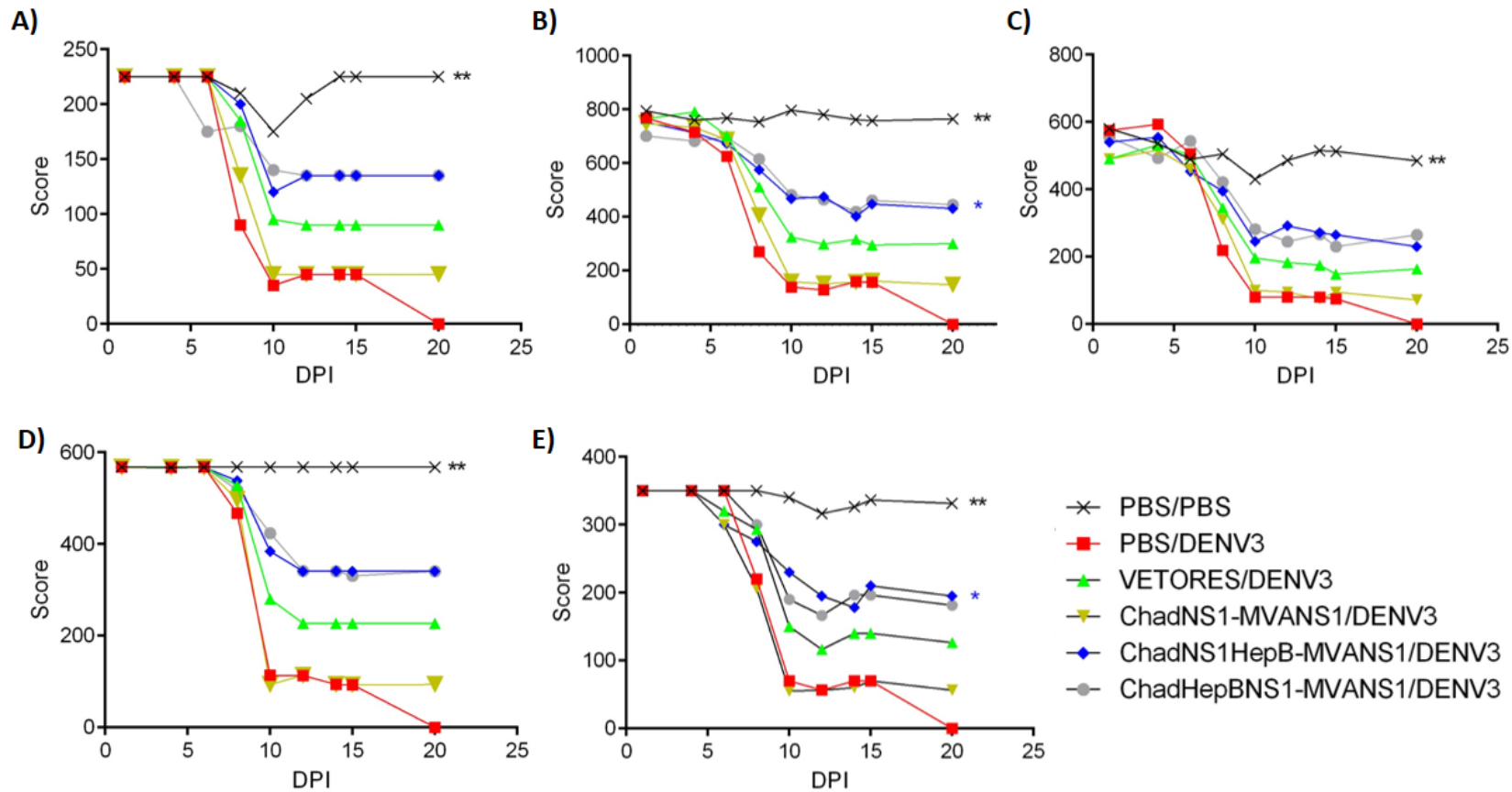


Figura 18 - **Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NS1 após desafio intracranial com DENV-3.** Os animais vacinados e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A)** força e tônus muscular, **B)** comportamento motor, **C)** estado neuropsiquiátrico, **D)** função autônoma e **E)** função e reflexo sensorial. Os pontos apresentados são uma média de cinco 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 Mann-Whitney. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,005$  comparado aos scores dos animais controles (PBS/DENV-3).

### 5.2.2 Vacinas NSALL

No intuito de avaliar a geração de resposta imune protetora após a vacinação com os candidatos vacinais 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL em regime heterólogo, os animais foram desafiados com os sorotipos do DENV e monitorados até 20 dias pós infecção para a obtenção de curvas de sobrevivência e realização do protocolo SHIRPA.

Os animais vacinados foram avaliados após um desafio intracranial com  $2,5 \times 10^2$  da amostra de DENV-1 Mochizuki. As taxas de sobrevivência obtidas foram de 0% para o grupo 1NSALL/DENV-1, 42,86% para o grupo 2NSALL/DENV-1, 28,57% para o grupo 3NSALL/DENV-1, 42,86% para o grupo 4NSALL/DENV-1 e 14,28% para o grupo VETORES/DENV-1. Todos os animais infectados do grupo PBS/DENV-1 foram a óbito, ao passo que todos os animais inoculados pela via intracranial com PBS sobreviveram (Figura 19).

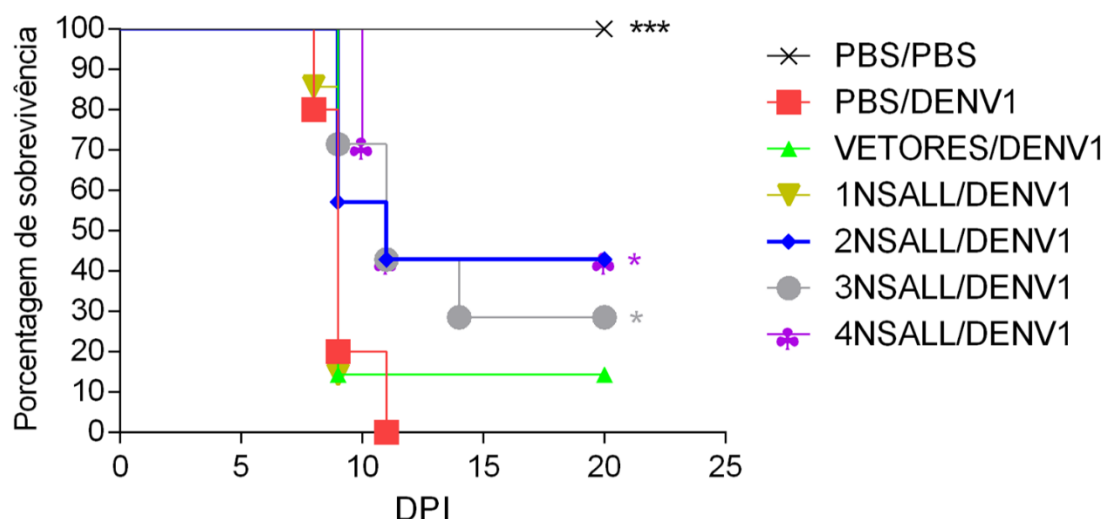


Figura 19 – **Avaliação da proteção das vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-1.** Camundongos C57BL6 vacinados em regime dose reforço heterólogo com 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL, 4NSALL e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2,5 \times 10^2$  da amostra de DENV-1 Mochizuki e monitorados diariamente até 20 dias pós infecção. 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. Foram analisados um total de 7 animais por grupo e as taxas de sobrevivência foram de 0% (1NSALL/DENV-1), 42,86% (2NSALL/DENV-1), 28,57% (3NSALL/DENV-1), 42,86% (4NSALL/DENV-1), 14,28% (VETORES/DENV-1) e 0% (PBS/DENV-1). Todos os animais inoculados pela via intracranial com PBS sobreviveram. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*\*  $p \leq 0,0005$  comparado ao grupo controle (PBS/DENV-1).

Os animais vacinados também foram monitorados após o desafio pelo protocolo SHIRPA a fim de se avaliar se as vacinas protegiam os animais de danos neurológicos que levam ao comprometimento comportamental e motor.

De acordo com os resultados avaliados, em relação aos grupos vacinais, apenas os animais imunizados com as vacinas 2NSALL apresentaram diferença significativa quando se comparado ao controle positivo de infecção (PBS/DENV-1) para os parâmetros que avaliam força e tônus muscular e comportamento motor.



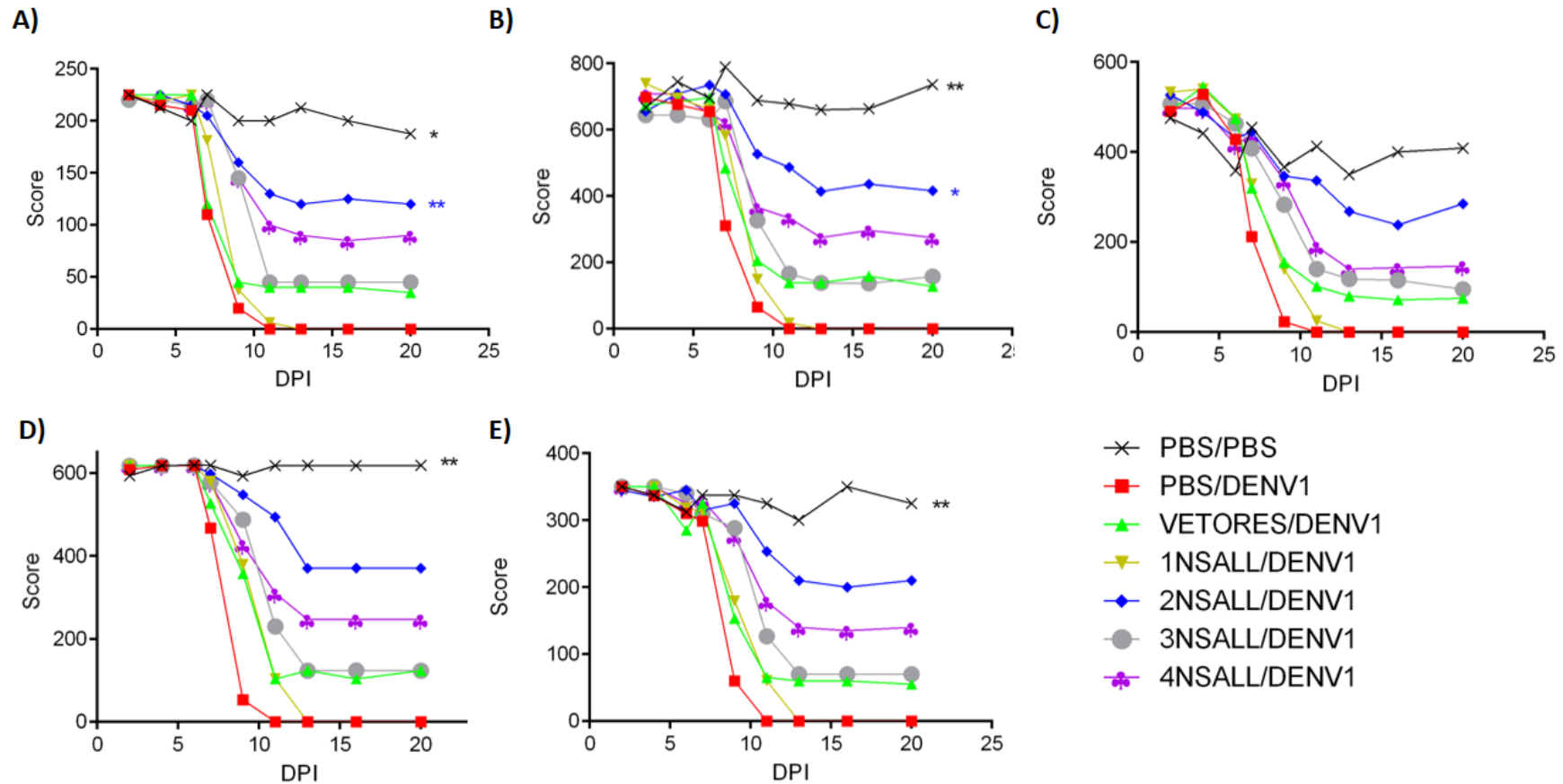


Figura 20- **Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-1.** Os animais vacinados e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A)** força e tônus muscular, **B)** comportamento motor, **C)** estado neuropsiquiátrico, **D)** função autônoma e **E)** função e reflexo sensorial. Os pontos apresentados são uma média de cinco animais por grupo. Os scores dos animais vacinados e infectados foram comparados aos scores dos animais controle (PBS/DENV-1) e as análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 6.01 pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,005$  comparado aos scores dos animais controles (PBS/DENV-1).

A performance das vacinas também foi avaliada frente ao desafio com  $2 \times 10^4$  da amostra de DENV-2 New Guinea C (NGC). Os animais foram monitorados até 20 dias pós infecção e ao 7º dia os animais do grupo controle de infecção (PBS/DENV-2) já apresentaram sinais de encefalite. As taxas de sobrevivência foram de 100% para o grupo 2NSALL/DENV-2, 71,43% para o grupo 3NSALL/DENV-2 e 71,43% para o grupo 4NSALL/DENV-2. Nenhum dos animais dos grupos 1NSALL/DENV-2, VETORES/DENV-2 e PBS/DENV-2 sobreviveu ao desafio (Figura 21).

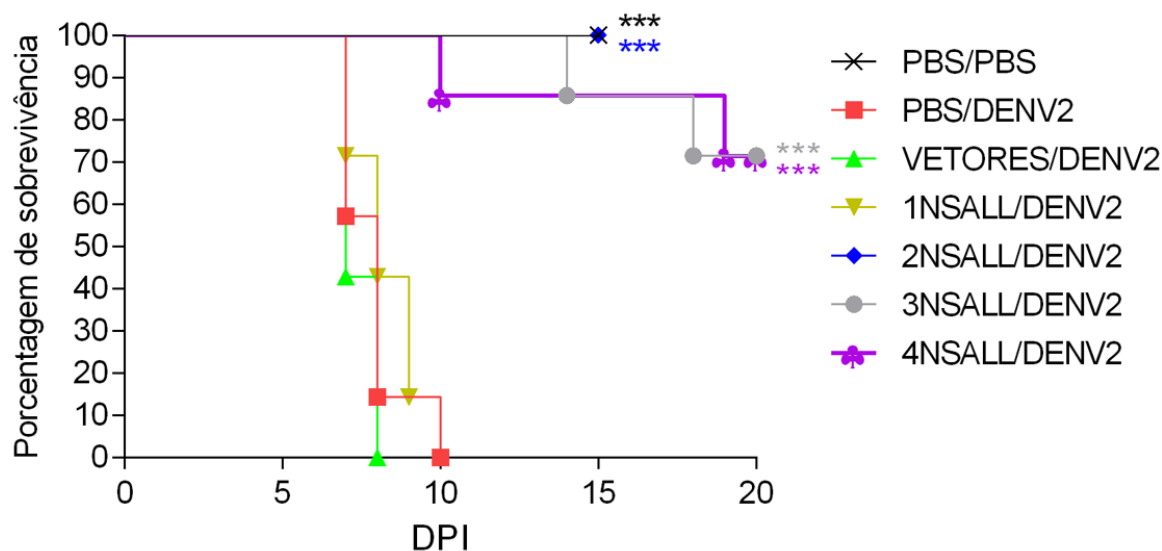


Figura 21 – **Avaliação da proteção das vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-2.** Camundongos C57BL6 vacinados em regime dose reforço heterólogo com 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL, 4NSALL e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2 \times 10^4$  da amostra de DENV-2 New Guinea C (NGC) e monitorados diariamente até 20 dias pós infecção. 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. Foram analisados um total de 7 animais por grupo e as taxas de sobrevivência foram de 100% (2NSALL/DENV-2), 71,43% (3NSALL/DENV-2) e 71,43% (4NSALL/DENV-2). Todos os animais dos grupos 1NSALL/DENV-2, VETORES/DENV-2 e PBS/DENV-2 não sobreviveram ao desafio. Os animais inoculados pela via intracranial com PBS sobreviveram. \*\*\*  $p \leq 0,0005$  comparado ao grupo controle (PBS/DENV-2).

A análise pelo protocolo SHIRPA revelou que os grupos vacinados com as vacinas 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL apresentaram diferenças significativas quando se comparados ao controle de infecção (PBS/DENV-2) para todos os parâmetros avaliados (FIGURA 22).

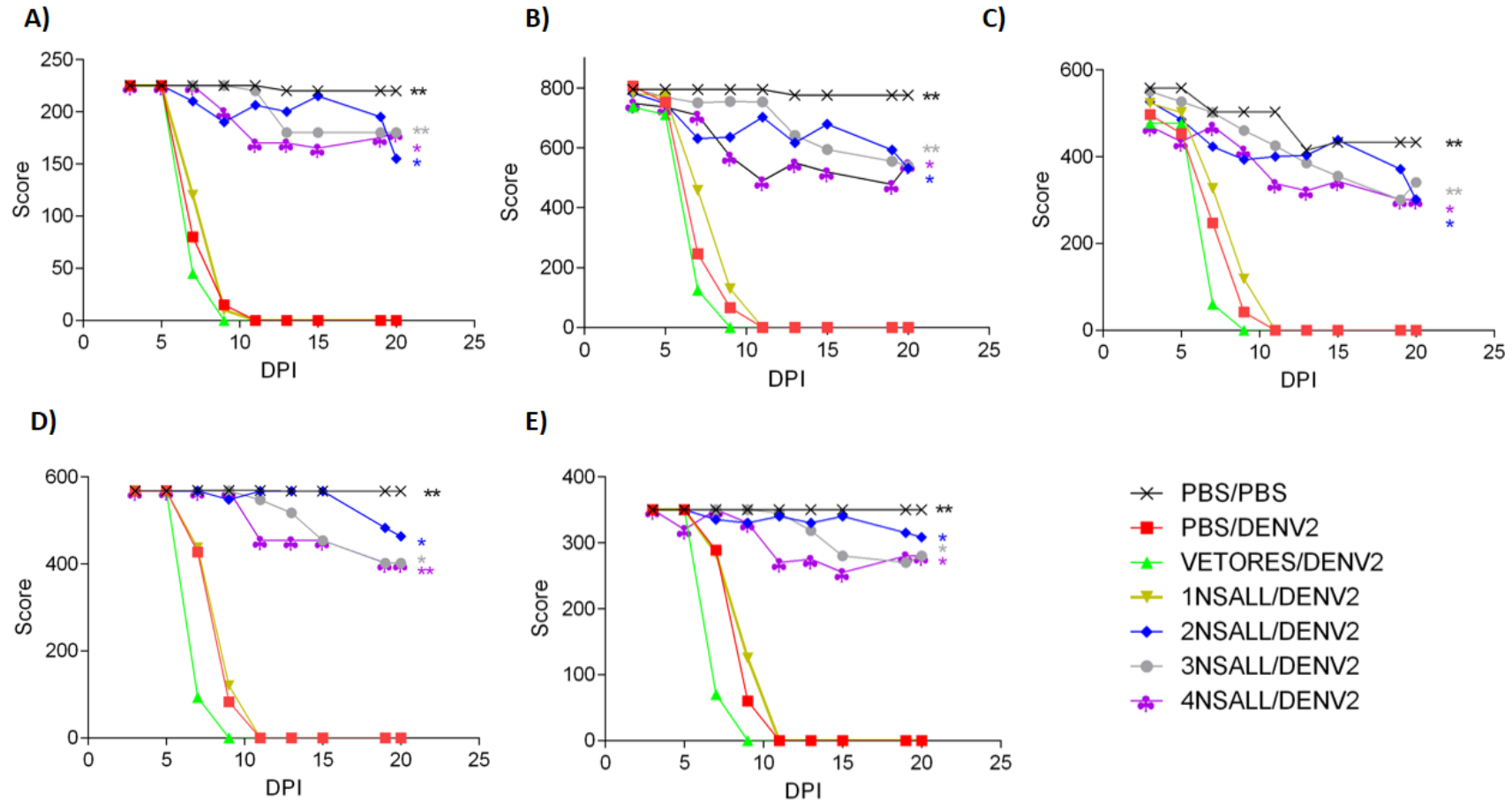


Figura 22 - **Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-2.** Os animais vacinados e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A)** força e tônus muscular, **B)** comportamento motor, **C)** estado neuropsiquiátrico, **D)** função autônoma e **E)** função e reflexo sensorial. Os pontos apresentados são uma média de cinco animais por grupo. Os scores dos animais vacinados e infectados foram comparados aos scores dos animais controle (PBS/DENV-2) e as análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 6.01 pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,005$  comparado aos scores dos animais controles (PBS/DENV-2).

Adicionalmente, as vacinas foram avaliadas quanto à proteção após um desafio com  $2 \times 10^3$  da amostra de DENV-3 MG20. Os animais foram monitorados diariamente até 20 dias pós infecção as taxas de sobrevivência foram de 28,57% para o grupo 1NSALL/DENV-3, 100% para o grupo 2NSALL/DENV-3, 100% para o grupo 3NSALL/DENV-3 e 85,71% para o grupo 4NSALL/DENV-3. A taxa de 28,57% de sobrevivência foi obtida nos grupos VETORES/DENV-3 e PBS/DENV-3 (figura 23).

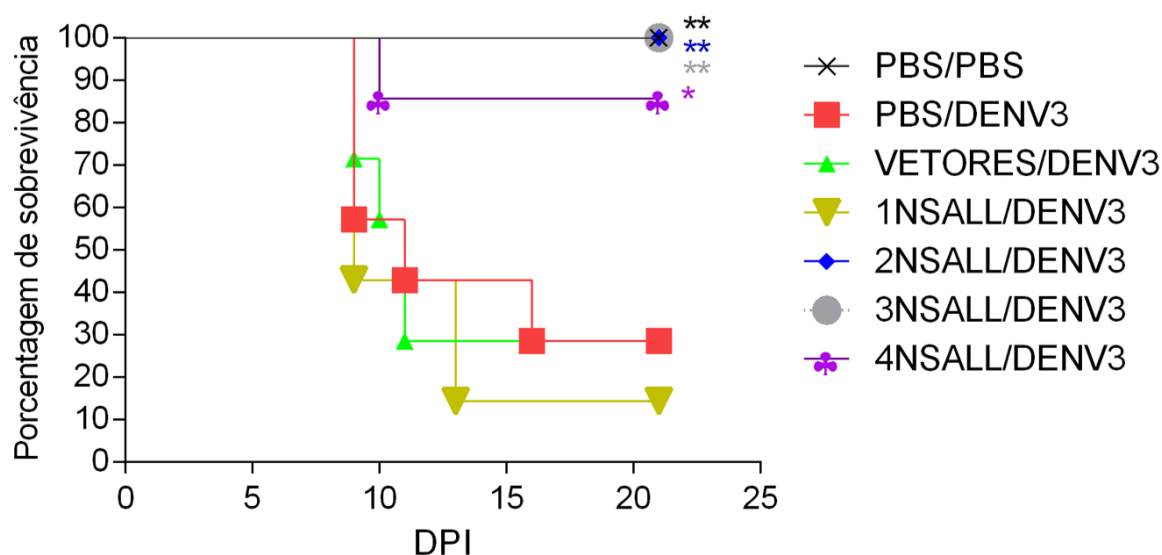


Figura 23 - **Avaliação da proteção das vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-3.** Camundongos C57BL6 vacinados em regime dose reforço heterólogo com 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL, 4NSALL e controles foram desafiados pela via intracranial com  $2 \times 10^3$  da amostra de DENV-3 MG20 e monitorados diariamente até 20 dias pós infecção. 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. Foram analisados um total de 7 animais por grupo e as taxas de sobrevivência foram de 28,57% (1NSALL/DENV-3), 100% (2NSALL/DENV-3), 100% (3NSALL/DENV-3) e 85,71% (4NSALL/DENV-3), 28,57 (VETORES/DENV-3) e 28,57 (PBS/DENV-3). Os animais inoculados pela via intracranial com PBS sobreviveram. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,005$  comparado ao grupo controle (PBS/DENV-3).

A avaliação dos animais pelo protocolo SHIRPA evidenciou que os animais vacinados com 2NSALL e 3NSALL apresentaram uma diferença significativa em comparação ao controle infectado para os parâmetros força e tônus muscular, comportamento motor, função autônoma e função e reflexo sensorial (figura 24).

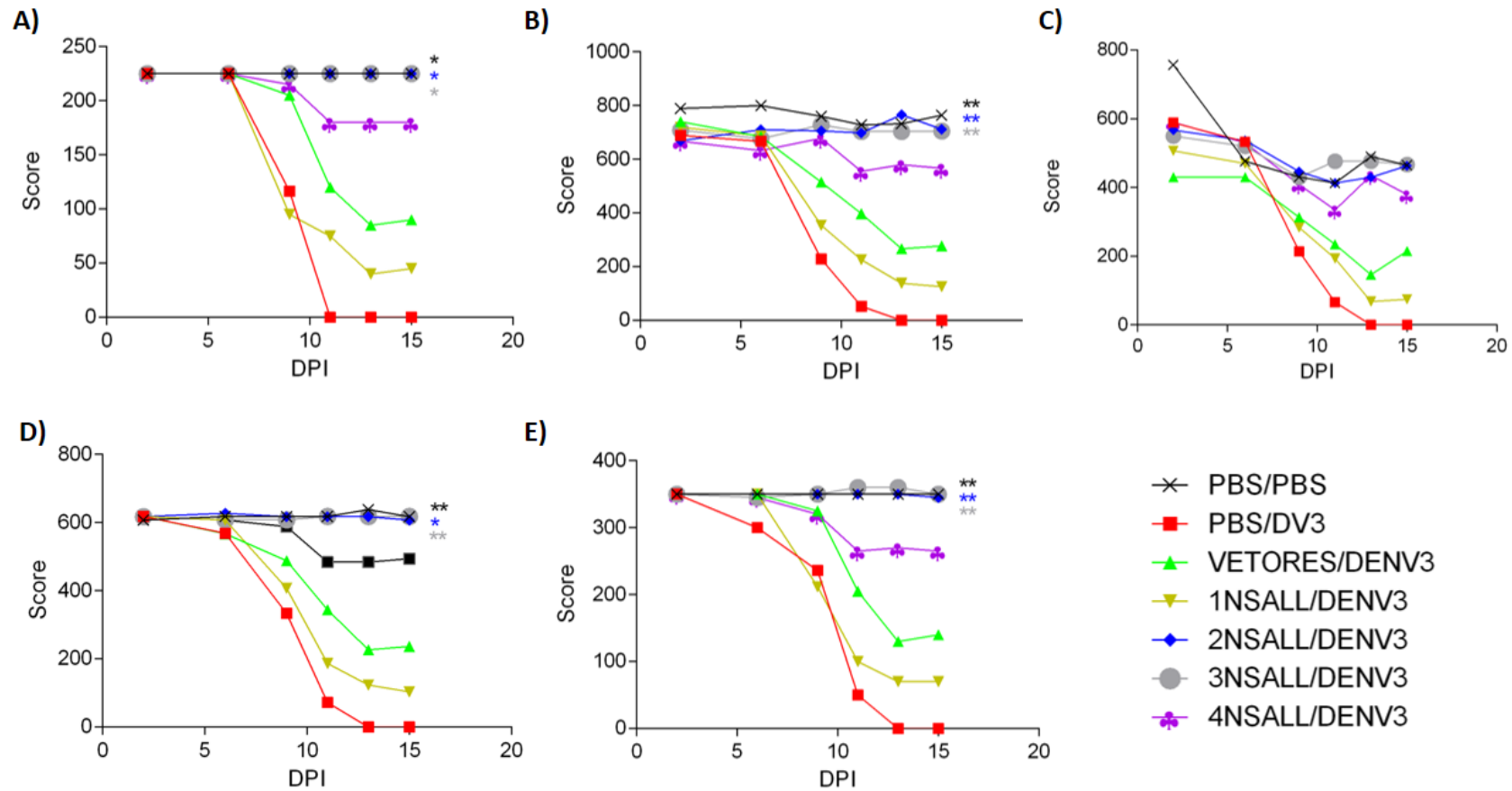


Figura 24 - **Análise comportamental pelo protocolo SHIRPA dos animais vacinados com as vacinas NSALL após desafio intracranial com DENV-3.** Os animais vacinados e desafiados foram monitorados para a avaliação de **A)** força e tônus muscular, **B)** comportamento motor, **C)** estado neuropsiquiátrico, **D)** função autônoma e **E)** função e reflexo sensorial. Os pontos apresentados são uma média de cinco 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 Mann-Whitney. \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,005$  comparado aos scores dos animais controles (PBS/DENV-3).

As vacinas 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL apresentam resultados significativos, e os ensaios demonstram a capacidade multivalente dos candidatos vacinais, uma vez que conseguem gerar resposta imune protetora – ainda que variável - para mais de um sorotipo do DENV, como apresentado na tabela 9.

Tabela 9 – Avaliação da proteção gerada após imunização com as vacinas NSALL após o desafio intracranial com os sorotipos do DENV.

Sorotipo	Taxa de proteção/%		
	DENV-1 Mochizuki	DENV-2 NGC	DENV-3 MG20
1NSALL	0	0	28,57
2NSALL	42,86	100	100
3NSALL	28,57	71,43	100
4NSALL	42,86	71,43	85,71

Fonte: Do autor.

### 5.3 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE FRENTE A IMUNIZAÇÃO COM AS VACINAS NSALL

A caracterização da resposta imune gerada pela administração das vacinas em camundongos BALB/c e C57BL/6 foi avaliada *in vitro* pela estimulação de células imunes destes animais com os peptídeos sintéticos que cobrem as sequências das proteínas não estruturais (NS3, NS4 e NS5) e a produção de IFN- $\gamma$  foi medida pelas técnicas de ELISpot e FACS.

Os resultados dos ensaios serão dispostos em diferentes tópicos de acordo com a linhagem de camundongo testada.

#### 5.3.1 Análise da resposta imune em camundongos BALB/c

##### 5.3.1.1 Análises da imunogenicidade das vacinas NSALL

Os animais BALB/c foram vacinados em regime dose e reforço e a imunogenicidade das vacinas avaliada por ELISPOT.

As células do sangue periférico dos animais tratadas com tampão amônio-cloropotássio estimuladas com o pool de peptídeos de NS3 foram capazes de produzir IFN- $\gamma$  ao 8º dia após a primeira dose das vacinas, havendo um aumento estatisticamente significativo ao 14º dia após o reforço. As células dos animais apresentaram uma produção de IFN- $\gamma$  baixa ou ausente quando estimuladas com os peptídeos de NS4 e NS5, mostrando que as respostas geradas a partir da imunização com as vacinas NSALL em camundongos BALB/c são geradas para as regiões da proteína NS3 viral (Figura 25).

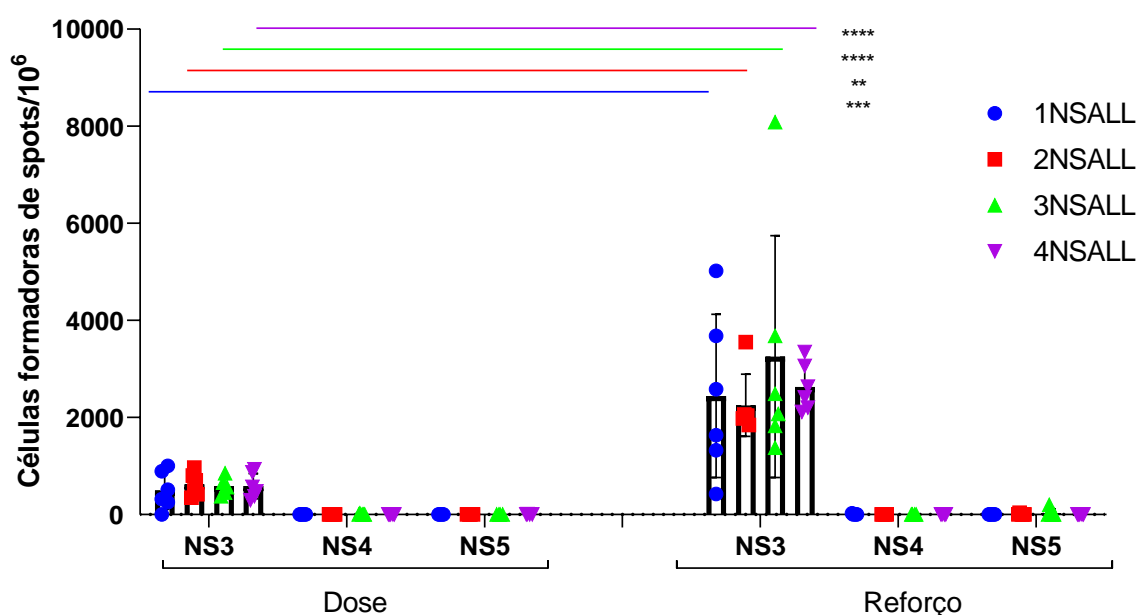


Figura 25 - Avaliação da resposta imune celular após imunização em regime heterólogo com as vacinas NSALL. Camundongos BALB/c ( $n = 6$  por grupo) foram imunizados no dia 0 (dose) com  $10^8$  I.U das vacinas Adenovírus-NSALL e no dia 7 (reforço) com  $10^6$  PFU de vacinas MVA-NSALL. 8 dias após a primeira dose da vacina, o sangue dos animais imunizados foi extraído pela veia caudal e as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram cultivadas com  $10\mu\text{g/mL}$  de pools de peptídeos NS3, NS4 e NS5 para avaliação de células formadoras de spots pelo ensaio de ELISpot. 14 dias após o reforço, os camundongos foram sangrados novamente e as células formadoras de spots foram medidas usando a mesma técnica. As análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 8 pelo teste T seguido de um pós teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 5.3.1.2 Identificação de epítomos de células T por ELISpot

Os esplenócitos de cada animal (2 animais por grupo) foram distribuídos em 3 placas de 96 poços, sendo a placas 1, 2 e 3 estimuladas com os peptídeos sobrepostos de NS3, NS4 e NS5, respectivamente. A Figura 26 demonstra o esquema experimental utilizado no ensaio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A)</b> A	NS3-1	NS3-2	NS3-3	NS3-4	NS3-5	NS3-6	NS3-7	NS3-8	NS3-9	NS3-10	NS3-11	NS3-12
B	NS3-13	NS3-14	NS3-15	NS3-16	NS3-17	NS3-18	NS3-19	NS3-20	NS3-21	NS3-22	NS3-23	NS3-24
C	NS3-25	NS3-26	NS3-27	NS3-28	NS3-29	NS3-30	NS3-31	NS3-32	NS3-33	NS3-34	NS3-35	NS3-36
D	NS3-37	NS3-38	NS3-39	NS3-40	NS3-41	NS3-42	NS3-43	NS3-44	NS3-45	NS3-46	NS3-47	NS3-48
E	NS3-49	NS3-50	NS3-51	NS3-52	NS3-53	NS3-54	NS3-55	NS3-56	NS3-57	NS3-58	NS3-59	NS3-60
F	NS3-61	NS3-62	NS3-63	NS3-64	NS3-65	NS3-66	NS3-67	NS3-68	NS3-69	NS3-70		
G	NS3pool	NS3pool	NS3pool	NS3pool	NS4pool	NS4pool	NS4pool	NS4pool	NS5pool	NS5pool	NS5pool	NS5pool
H	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>B)</b> A	NS4-1	NS4-2	NS4-3	NS4-4	NS4-5	NS4-6	NS4-7	NS4-8	NS4-9	NS4-10	NS4-11	NS4-12
B	NS4-13	NS4-14	NS4-15	NS4-16	NS4-17	NS4-18	NS4-19	NS4-20	NS4-21	NS4-22	NS4-23	NS4-24
C	NS4-25	NS4-26	NS4-27	NS4-28	NS4-29	NS4-30	NS4-31	NS4-32	NS4-33	NS4-34	NS4-35	NS4-36
D	NS4-37	NS4-38	NS4-39	NS4-40								
E	NS3pool	NS3pool	NS3pool	NS3pool	NS3pool	NS3pool						
F	NS4pool	NS4pool	NS4pool	NS4pool	NS4pool	NS4pool						
G	NS5pool	NS5pool	NS5pool	NS5pool	NS5pool	NS5pool						
H	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>C)</b> A	NS5-1	NS5-2	NS5-3	NS5-4	NS5-5	NS5-6	NS5-7	NS5-8	NS5-9	NS5-10	NS5-11	NS5-12
B	NS5-13	NS5-14	NS5-15	NS5-16	NS5-17	NS5-18	NS5-19	NS5-20	NS5-21	NS5-22	NS5-23	NS5-24
C	NS5-25	NS5-26	NS5-27	NS5-28	NS5-29	NS5-30	NS5-31	NS5-32	NS5-33	NS5-34	NS5-35	NS5-36
D	NS5-37	NS5-38	NS5-39	NS5-40	NS5-41	NS5-42	NS5-43	NS5-44	NS5-45	NS5-46	NS5-47	NS5-48
E	NS5-49	NS5-50	NS5-51	NS5-52	NS5-53	NS5-54	NS5-55	NS5-56	NS5-57	NS5-58	NS5-59	NS5-60
F	NS5-61	NS5-62	NS5-63	NS5-64	NS5-65	NS5-66	NS5-67	NS5-68	NS5-69			
G	NS3pool	NS3pool	NS3pool	NS3pool	NS4pool	NS4pool	NS4pool	NS4pool	NS5pool	NS5pool	NS5pool	NS5pool
H	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Figura 26 - **Desenho da placa de ELISpot para triagem dos peptídeos sobrepostos de NS3, NS4 e NS5.** Os peptídeos (em azul) foram dispostos em placas de ELISpot de 96 poços. **A)** 70 peptídeos sobrepostos de NS3; **B)** 40 peptídeos sobrepostos de NS4; **C)** 69 peptídeos sobrepostos de NS5. Em todas as placas foram incluídos pools de peptídeos NS3, NS4 e NS5, bem como, os controles negativos (células estimuladas com DMEM) e positivo (PMA 20 ng/mL e Ionomicina 0,5 µg/mL).



A positividade do teste se deu pela formação de spots nos poços positivos ao fim do ensaio. A Figura 27 apresenta os dados obtidos em uma das placas resultante da estimulação das células de um animal da linhagem BALB/c imunizado após a estimulação com os peptídeos de NS3.

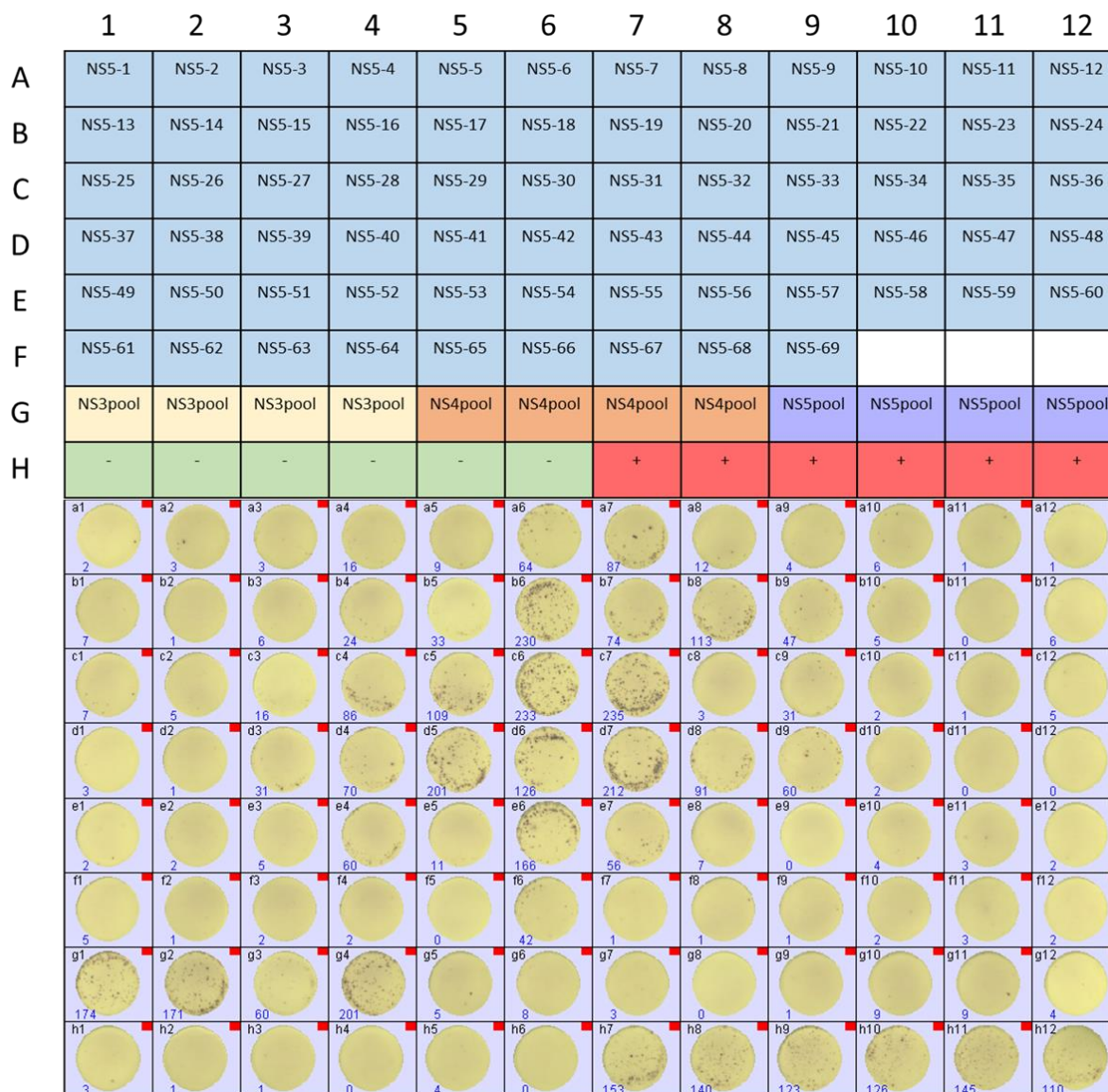


Figura 27 - Resultado da placa ELISpot após estimulação das células com os peptídeos sobrepostos de NS3 e marcação com anticorpos anti- IFN- $\gamma$ . As células de cada animal foram estimuladas com os peptídeos sobrepostos seguindo o mapa da placa. A positividade do teste se deu visualização e contagem de spots nos poços testados.

A estimulação dos esplenócitos dos camundongos BALB/c com os peptídeos sintéticos levou a produção de IFN- $\gamma$  em diferentes níveis para os grupos 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL (Figura 28). Um total de 27 peptídeos dos 179 testados

foram positivos para a produção de spots e estes estão descritos na tabela 10. Nos camundongos da linhagem BALB/c, os peptídeos de NS3 foram imunodominantes, levando a produção de altos níveis de citocina *in vitro* após estimulação dos esplenócitos.

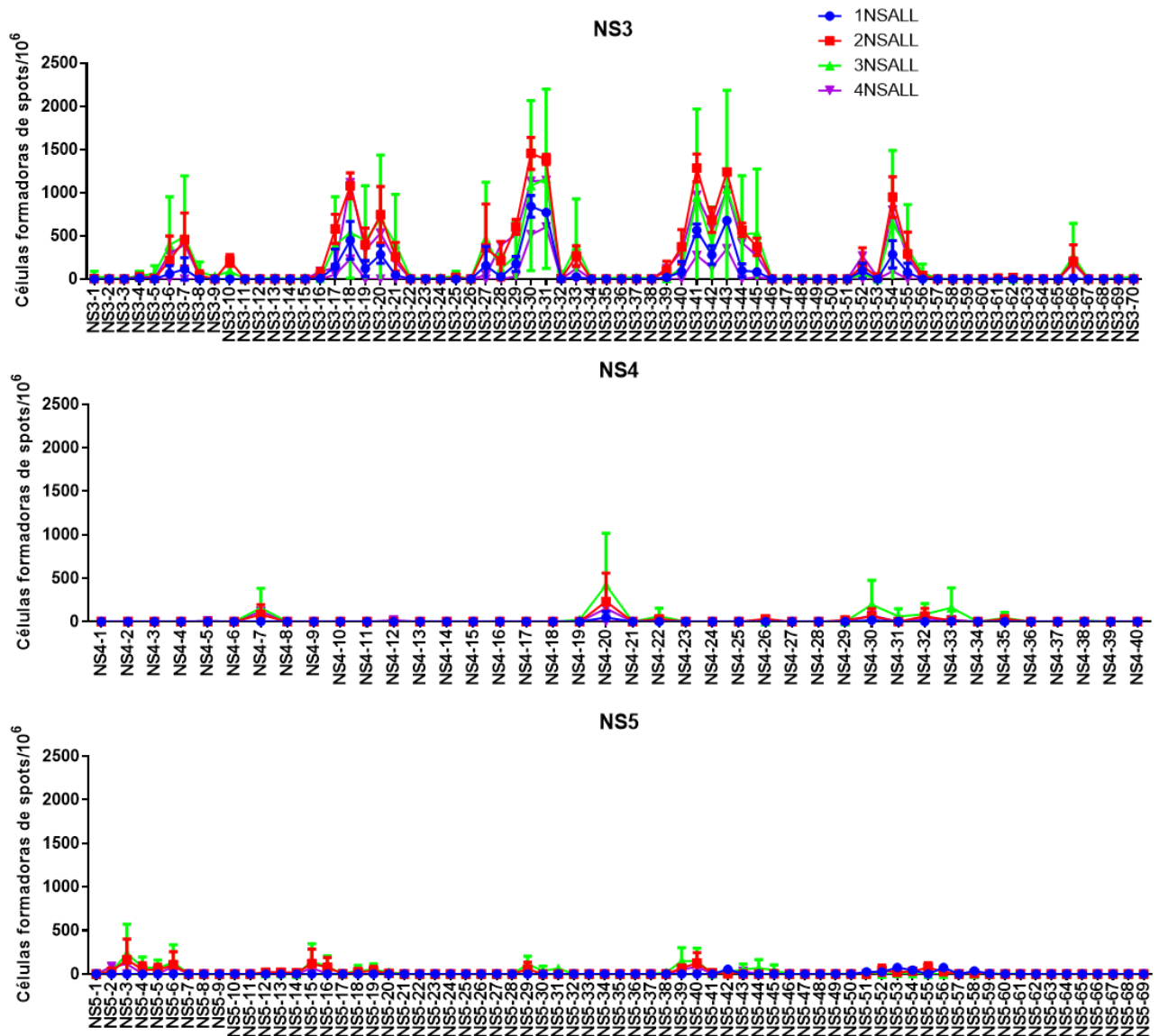


Figura 28 - **Triagem dos peptídeos cobrindo a proteína NS3, NS4 e NS5 do DENV em camundongos BALB/c.** Os peptídeos sobrepostos que cobrem as proteínas NS3, NS4 e NS5 de DENV (10 µg / mL) foram usados para estimulação de esplenócitos de camundongos BALB/c vacinados. Os valores representam as células formadoras de spots por milhão, medidas pelo ensaio de ELISpot. Em azul, vermelho, verde e roxo estão os resultados dos animais imunizados com as vacinas 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL, respectivamente.

Tabela 10 - Peptídeos positivos no ensaio de ELISpot para camundongos BALB/c.

Peptídeo	Número de spots/10 <sup>6</sup>							
	1NSALL		2NSALL		3NSALL		4NSALL	
1 NS3-6	128	0	416	13	790	0	288	0
2 NS3-7	208	24	676	243	990	0	403	0
3 NS3-17	288	0	701	463	790	0	133	53
4 NS3-18	603	294	1186	973	910	167	1118	233
5 NS3-19	188	54	536	263	895	0	338	0
6 NS3-20	358	214	976	513	1220	177	533	0
7 NS3-27	313	0	721	0	930	0	48	0
8 NS3-28	58	0	371	53	240	0	398	0
9 NS3-29	238	114	666	543	545	0	513	33
10 NS3-30	933	754	1586	1323	1780	387	1133	513
11 NS3-31	768	774	1426	1343	1895	427	1143	603
12 NS3-33	53	0	351	183	770	0	123	0
13 NS3-40	168	4	516	233	260	0	318	0
14 NS3-41	618	514	1401	1173	1670	227	973	273
15 NS3-42	358	204	786	583	710	97	598	133
16 NS3-43	683	674	1206	1273	1850	237	1028	353
17 NS3-44	153	44	626	513	1000	47	423	0
18 NS3-45	113	54	446	303	1055	0	268	23
19 NS3-52	158	34	301	0	110	0	268	0
20 NS3-54	398	174	1116	783	1240	37	798	93
21 NS3-66	18	0	341	73	535	0	178	0
22 NS4-7	6	0	163	0	319	0	117	0
23 NS4-20	96	0	463	0	844	0	152	0
24 NS4-22	0	0	63	0	129	0	2	0
25 NS4-35	0	0	63	0	89	3	0	0
26 NS5-6	-	0	213	0	278	0	91	0
27 NS5-15	-	0	238	0	288	0	71	0

Fonte: Do autor. \*Os valores foram obtidos em duplicata através de réplicas biológicas para cada grupo.

### 5.3.1.2 Identificações de epítomos de células T por FACS

As células do baço dos animais imunizados também foram testadas para a produção de IFN- $\gamma$  pela técnica de citometria de fluxo. Para tanto, os peptídeos positivos no ensaio de ELISpot foram utilizados para estimulação das células dos animais imunizados.

As células foram definidas segundo a estratégia de gate apresentada na figura 29.

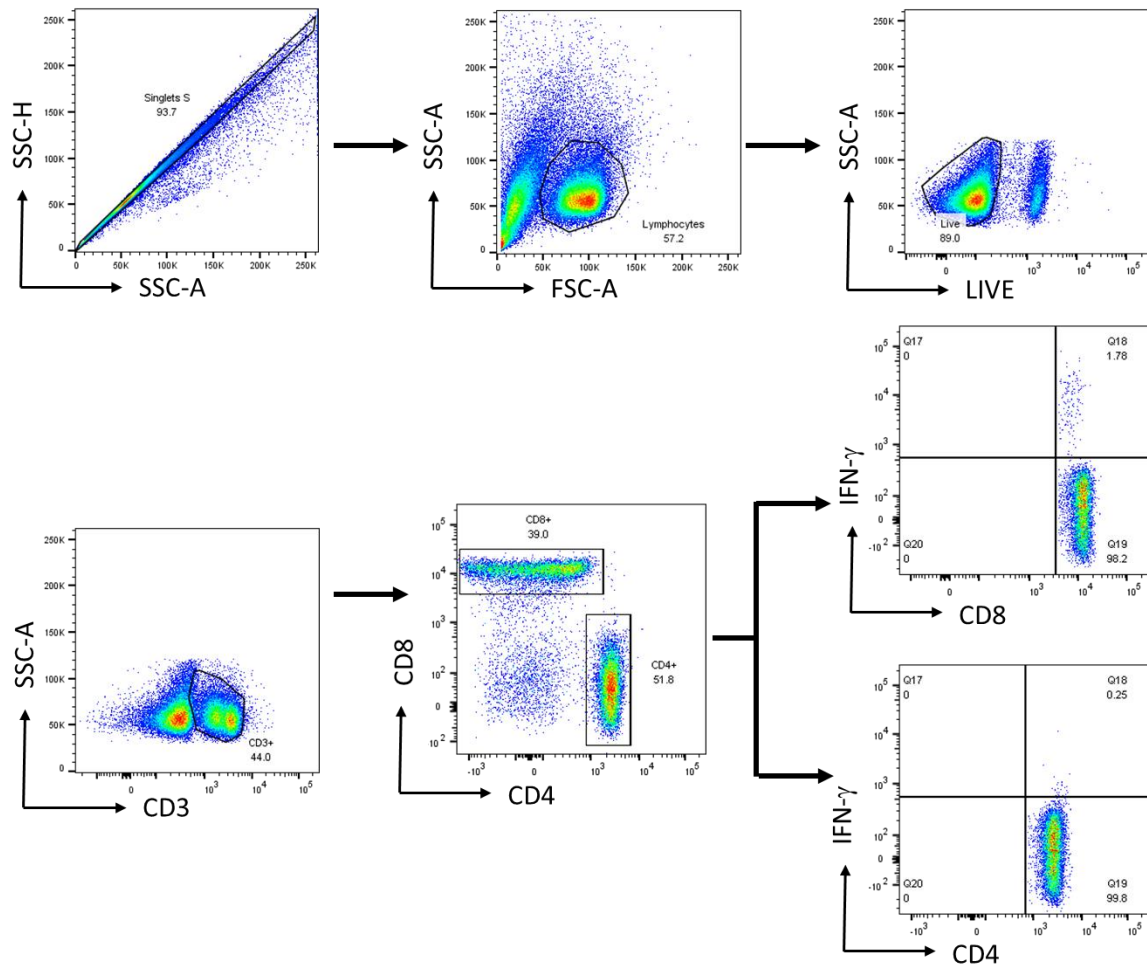


Figura 29 - **Estratégia de gate para a identificação de linfócitos TCD8+ e TCD4+ produtores de IFN- $\gamma$ .** As análises foram realizadas utilizando o programa FlowJo (Tree Star Inc.), sendo o gate SSC-H x SSC-A utilizado para a definição de *single cells*. O gate dos linfócitos foi definido em um gráfico FSC-A x SSC-A, seguido da definição das células vivas pela marcação Live x SSC-A. O gate dos linfócitos CD3+ foi definido em um gráfico CD3 x SSC-A, seguido pelo gráfico CD4 x CD8, dos quais foi possível extrair os resultados de produção de IFN- $\gamma$ , em gráficos IFN- $\gamma$  x CD4 e IFN- $\gamma$  x CD8, sendo a porcentagem de células CD4 IFN- $\gamma$ + e CD8+IFN- $\gamma$ + baseada no valor total de CD4 e CD8+, respectivamente.

Os esplenócitos dos animais imunizados e estimulados apresentaram produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* pelas células CD8+ para a maioria dos peptídeos testados nos grupos, sendo os peptídeos NS3-18, NS3-27, NS3-29, NS3-30, NS3-31, NS3-41, NS3-42, NS3-43 e NS3-54 os que apresentaram maior produção da citocina para todos os grupos testados. As células CD4+ estimuladas apresentaram expressão de IFN- $\gamma$  baixa ou ausente (Figura 30).

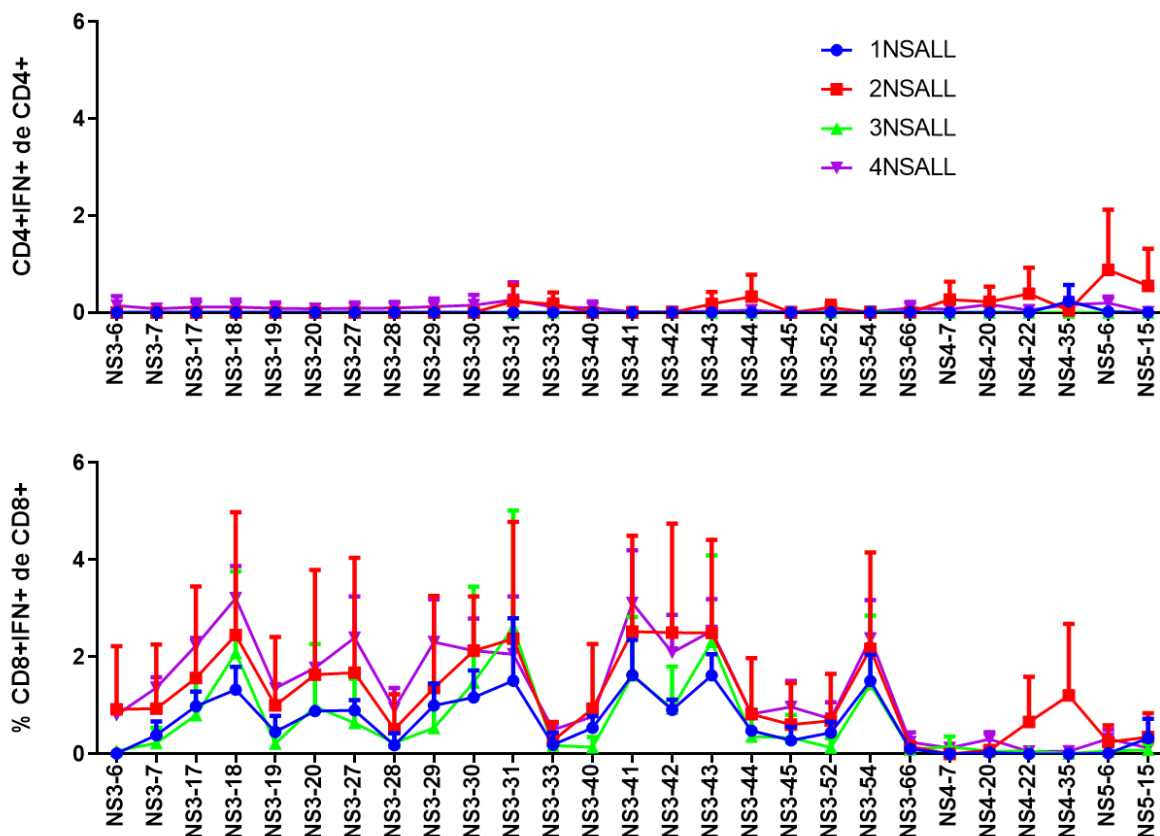


Figura 30 - **Identificação dos epítomos de células T por FACS.** Os esplenócitos dos animais imunizados foram estimulados in vitro com os peptídeos positivos e marcadas no ensaio de marcação de citocina intracelular (ICS) como células CD4+IFN+ e CD8+IFN+. Em azul, vermelho, verde e roxo estão os resultados dos animais imunizados com as vacinas 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL, respectivamente.

A tabela 11 apresenta as porcentagens de células CD4+IFN+ e CD8+IFN+ produtoras de IFN- $\gamma$  analisadas no ensaio, sendo os peptídeos com a maior média de células positivas para a expressão de IFN- $\gamma$ , entre todos os grupos testados, identificados em vermelho.

Tabela 11 - Produção da citocina IFN- $\gamma$  pelas células CD4+ ou CD8+ frente à estimulação com os peptídeos.

Peptídeo	1NSALL				2NSALL				3NSALL				4NSALL			
	CD4+IFN+ de CD4		CD8+IFN+ de CD8		CD4+IFN+ de CD4		CD8+IFN+ de CD8		CD4+IFN+ de CD4		CD8+IFN+ de CD8		CD4+IFN+ de CD4		CD8+IFN+ de CD8	
NS3-6	0	0	0,02	0	0	0	0	1,84	0	0	0	0,13	0,28	0	0,859	0,76
NS3-7	0	0	0,19	0,59	0	0	0	1,87	0	0	0	0,45	0,15	0	1,219	1,52
NS3-17	0	0	0,77	1,2	0	0	0,24	2,9	0	0	0,22	1,39	0,22	0	2,349	2,13
NS3-18	0	0	0,99	1,66	0	0	0,66	4,24	0	0	0,89	3,27	0,22	0	3,679	2,75
NS3-19	0	0	0,23	0,69	0	0	0	2	0	0	0	0,43	0,17	0	1,299	1,42
NS3-20	0	0	0,91	0,86	0	0	0,11	3,16	0	0	0,07	1,89	0,15	0	1,779	1,78
NS3-27	0	0	0,75	1,05	0	0	0	3,35	0	0	0	1,28	0,17	0	2,999	1,8
NS3-28	0	0	0	0,36	0	0	0	1,02	0	0	0	0,47	0,18	0	1,239	0,65
NS3-29	0	0	0,68	1,32	0	0	0,02	2,7	0	0	0	1,07	0,24	0	2,929	1,69
NS3-30	0	0	0,78	1,56	0	0	1,33	2,92	0	0	0,08	2,87	0,3	0	2,599	1,67
NS3-31	0	0	0,6	2,42	0	0,47	0,68	4,08	0	0	0,9	4,31	0,52	0	1,219	2,9
NS3-33	0	0	0,01	0,37	0	0,34	0	0,55	0	0	0	0,35	0,22	0	0,569	0,44
NS3-40	0	0	0,71	0,37	0	0	0	1,88	0	0	0	0,29	0,19	0	0,659	0,89
NS3-41	0	0	1,11	2,14	0	0	1,12	3,92	0	0	0,77	2,47	0,01	0	2,349	3,88
NS3-42	0	0	0,76	1,06	0	0	0,92	4,09	0	0	0,32	1,55	0,02	0	1,549	2,64
NS3-43	0	0	1,31	1,93	0	0,35	1,14	3,85	0	0	1,05	3,57	0,05	0	2,079	3
NS3-44	0	0	0,45	0,51	0	0,65	0	1,64	0	0	0	0,72	0,09	0	0,779	0,88
NS3-45	0	0	0,09	0,48	0	0	0	1,21	0	0	0	0,67	0,01	0	0,599	1,35
NS3-52	0	0	0,28	0,6	0	0,2	0	1,37	0	0	0	0,27	0	0	0,489	0,97
NS3-54	0	0	1,12	1,89	0	0	0,76	3,57	0,06	0	0,44	2,44	0,03	0	1,829	2,94
NS3-66	0,01	0	0,09	0,12	0,01	0	0,17	0,14	0	0	0	0,19	0,18	0	0,389	0,11
NS4-7	0	0	0	0	0	0,53	0	0	0	0	0	0,3	0,13	0	0,042	0,21
NS4-20	0	0	0,02	0,04	0	0,44	0,08	0,09	0	0	0	0,11	0,11	0,22	0,209	0,41
NS4-22	0	0	0	0	0	0,77	1,32	0	0	0	0	0,12	0,09	0	0,017	0,09
NS4-35	0	0,47	0	0	0	0,08	0,16	2,25	0	0	0	0,02	0,06	0,26	0,099	0,02
NS5-6	0	0,03	0	0,03	0	1,76	0	0,49	0	0	0	0,12	0,1	0,29	0,189	0,45
NS5-15	0	0	0,61	0,04	0	1,09	0	0,7	0	0	0	0,17	0,01	0	0,139	0,12

Fonte: Do autor. \*Os valores foram obtidos em duplicata através de réplicas biológicas para cada grupo. \*\* Peptídeos com maior a maior média células positivas para a expressão de IFN- $\gamma$ , entre todos os grupos testados, estão identificados em vermelho.

Os peptídeos que apresentaram resultados positivos após triagem nos ensaios de ELISpot e confirmação da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD8+ pela técnica de FACS foram indicados como epítomos imunodominantes de células TCD8+ presentes nas vacinas testadas. Os peptídeos identificados estão representados na tabela 12.

Tabela 12 - Peptídeos identificados como regiões imunodominantes para camundongos BALB/c (alelos H2-Kd, H2-Dd e H2-Ld) presentes nas vacinas NSALL.

	<b>Peptídeo</b>	<b>Sequência</b>	<b>Posição no proteoma do DENV (a.a.)</b>
1	Ns3-18	RNLTIMDLHPGAGKTKRYLP	1662
2	Ns3-27	VDLMCHATFTMRLLSPVRVP	1734
3	Ns3-29	NYNLIIMDEAHFTDPASIAA	1752
4	Ns3-30	HFTDPASIAARGYISTRVEM	1762
5	Ns3-31	RGYISTRVEMGEAAAIFMTA	1771
6	Ns3-41	TKLNDWDFVVTDDISEMGAN	1871
7	Ns3-42	TTDISEMGANFKADRVIDPR	1881
8	Ns3-43	FKADRVIDPRRCLKPVILTD	1891
9	Ns3-54	TLFTPEGIIPSLEPEREKSA	1977

Fonte: Do autor. a.a. = aminoácido

Os peptídeos positivos também foram testados para a ativação de células T com capacidade de produção da citocina TNF- $\alpha$  e pela presença do marcador de degranulação CD107a na superfície destas células. A figura 31 demonstra que todos os peptídeos testados induziram ao fenótipo de células CD8+ IFN+TNF+ e CD8+ IFN+CD107+ em níveis variáveis nos grupos vacinais testados. Os dados de percentagem estão indicados na tabela 13.



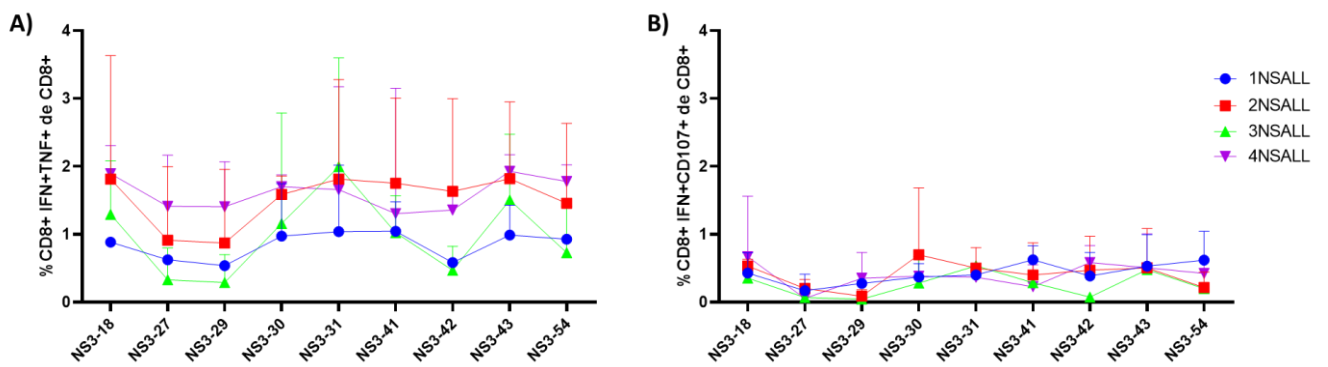


Figura 31 - Análise as produção da citocina TNF- $\alpha$  e do marcador de superfície CD107a por linfócitos TCD8+ de camundongos BALB/c estimulados com os peptídeos de NS3. As células dos camundongos imunizados foram estimuladas com 10  $\mu$ g / mL dos peptídeos e marcadas intracelularmente pela técnica ICS. A) Porcentagem de linfócitos TCD8+ com expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ; B) Porcentagem de linfócitos TCD8+ produtores de citocina IFN- $\gamma$  e que apresentam o marcador de superfície de CD107. Os resultados foram lidos em FACSCelesta™.

Tabela 13 - Porcentagem de linfócitos TCD8+ de camundongos BALB/c que apresentaram o fenótipo IFN+TNF+ e IFN+CD107+ após estimulação com os peptídeos

Peptídeo	1NSALL				2NSALL				3NSALL				4NSALL			
	IFN+TNF+	IFN+CD107+	IFN+TNF+	IFN+CD107+	IFN+TNF+	IFN+CD107+	IFN+TNF+	IFN+CD107+	IFN+TNF+	IFN+CD107+	IFN+TNF+	IFN+CD107+	IFN+TNF+	IFN+CD107+		
<b>NS3-18</b>	0,84	0,93	0,64	0,22	0,53	3,10	0,61	0,46	0,74	1,85	0,26	0,45	2,18	1,6	1,3	0,04
<b>NS3-27</b>	0,64	0,61	0	0,34	0,15	1,68	0,30	0,11	0	0,66	0	0,14	1,94	0,88	0	0,11
<b>NS3-29</b>	0,51	0,57	0,32	0,23	0,11	1,64	0,16	0,02	0	0,58	0	0,09	1,87	0,94	0,62	0,09
<b>NS3-30</b>	0,43	1,52	0,23	0,51	1,40	1,78	1,40	0	0,01	2,31	0	0,56	1,82	1,58	0,57	0,20
<b>NS3-31</b>	0,35	1,73	0,38	0,42	0,78	2,85	0,72	0,29	0,86	3,13	0,52	0,55	0,58	2,73	0,42	0,32
<b>NS3-41</b>	0,74	1,35	0,77	0,48	0,87	2,64	0,74	0,06	0,64	1,41	0,31	0,26	0	2,61	0	0,46
<b>NS3-42</b>	0,60	0,57	0,63	0,14	0,67	2,60	0,83	0,12	0,22	0,72	0,11	0,04	1,16	1,55	0,76	0,41
<b>NS3-43</b>	0,68	1,3	0,86	0,2	1,02	2,62	0,92	0,10	0,82	2,19	0,51	0,45	1,75	2,1	0,86	0,16
<b>NS3-54</b>	0,93	0,93	0,92	0,32	0,63	2,29	0,38	0,06	0,25	1,21	0,2	0,2	1,60	1,95	0,56	0,29

Os peptídeos identificados foram alinhados com a sequência da poliproteína do DENV proveniente da amostra Mochizuki, depositada no Genbank com o código de acesso de BAB72261.1. A figura 32 ilustra o resultado do alinhamento realizado.

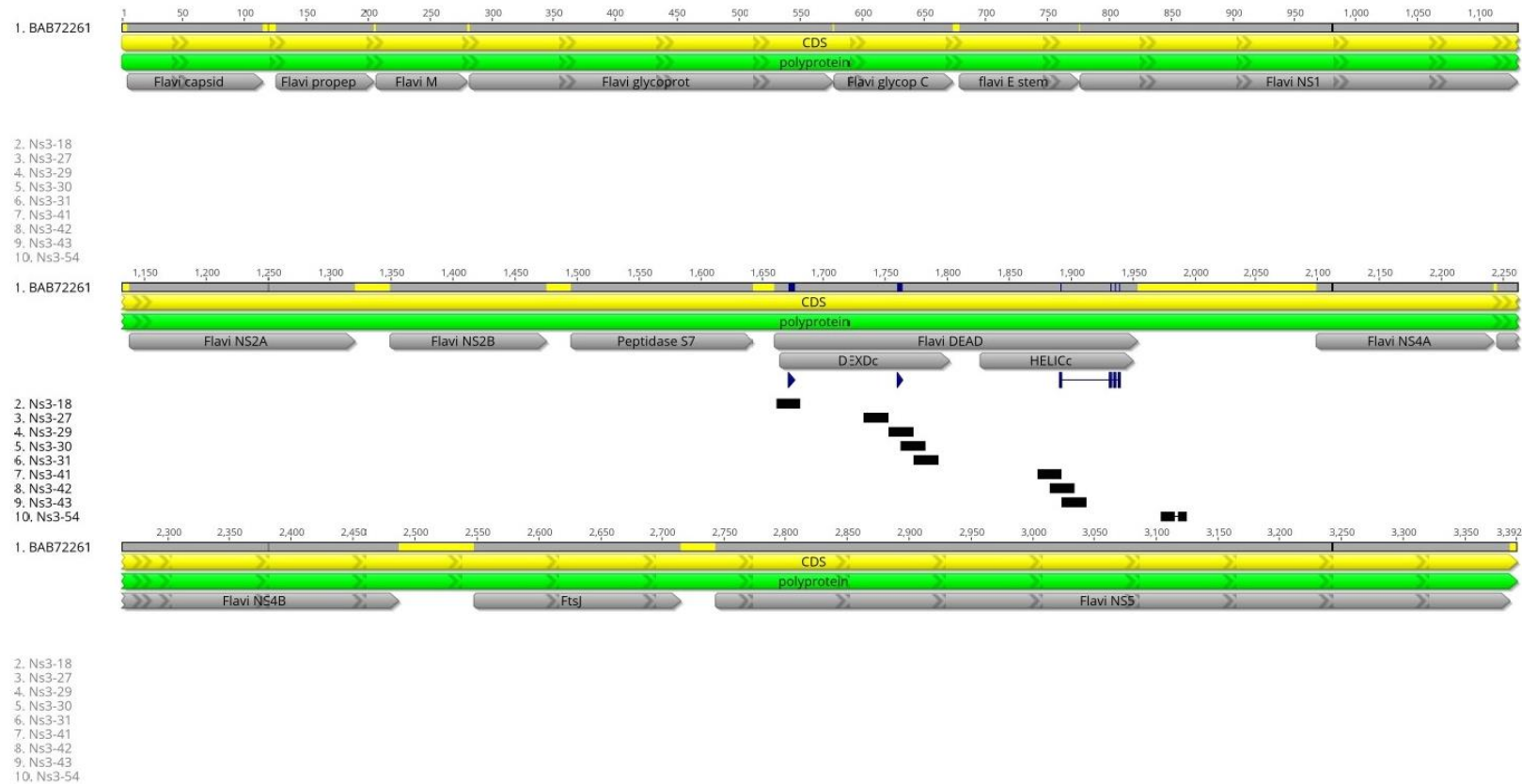


Figura 32 - Alinhamento dos peptídeos identificados como epítomos de células T CD8<sup>+</sup> para camundongos BALB/c com a poliproteína do Dengue virus. Os peptídeos positivos foram alinhados com a poliproteína viral proveniente da amostra Mochizuki (código de acesso no GenBank BAB72261.1.) pelo software Geneious. O alinhamento demonstra que os peptídeos alinham com regiões com atividade enzimática da proteína NS3 viral

### 5.3.2 Análise da resposta imune em camundongos C57BL/6

As células do sangue periférico dos animais tratadas com tampão amônio-cloropotássio estimuladas com o pool de peptídeos de NS4 foram capazes de produzir IFN- $\gamma$  ao 8º dia após a primeira dose das vacinas, havendo um aumento estatisticamente significativo para o grupo 2NSALL ao 14º dia após o reforço. As células dos animais apresentaram uma produção de IFN- $\gamma$  baixa ou ausente quando estimuladas com os peptídeos de NS3 e NS5, mostrando que as respostas geradas a partir da imunização com as vacinas NSALL em camundongos C57BL/6 são geradas para as regiões da proteína NS4 viral (Figura 33).

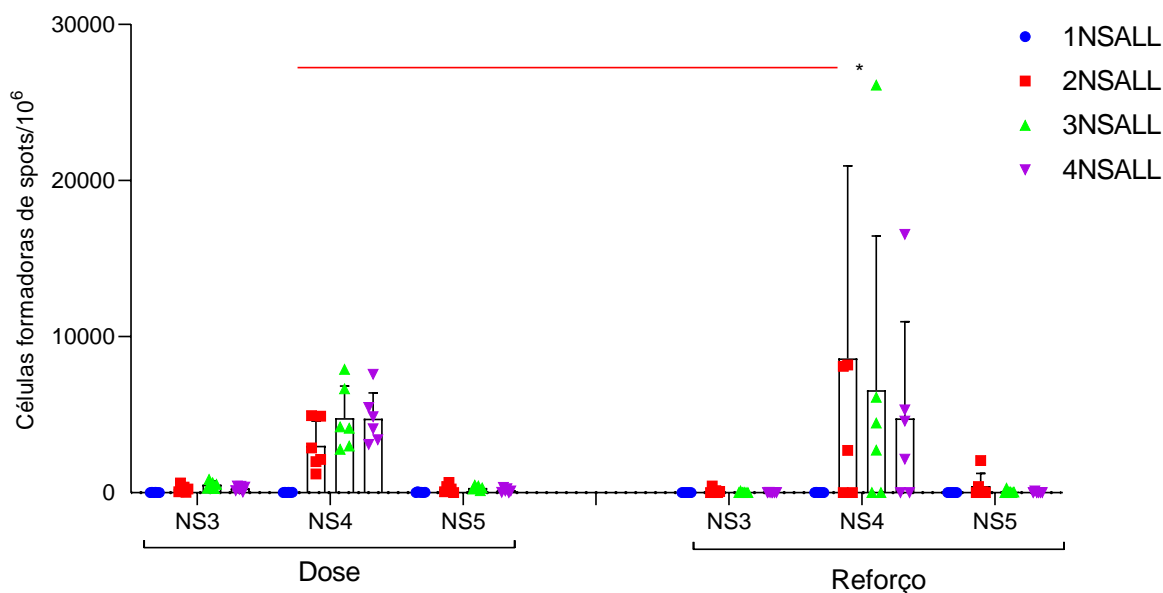


Figura 33 - Avaliação da resposta imune celular após imunização em regime heterólogo com as vacinas NSALL. Camundongos C57BL/6 (n = 6 por grupo) foram imunizados no dia 0 (dose) com 10<sup>8</sup> I.U das vacinas Adenovírus-NSALL e no dia 7 (reforço) com 10<sup>6</sup> PFU de vacinas MVA-NSALL. 8 dias após a primeira dose da vacina, o sangue dos animais imunizados foi extraído pela veia caudal e as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram cultivadas com 10 $\mu$ g/mL de pools de peptídeos NS3, NS4 e NS5 para avaliação de células formadoras de spots pelo ensaio de ELISpot. 14 dias após o reforço, os camundongos foram sangrados novamente (n=4) e as células formadoras de spots foram medidas usando a mesma técnica. As análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 8 pelo teste T seguido de um pós teste de Tukey. \* p  $\leq$  0,05.

#### 5.3.1.1 Identificação de epítomos de células T por ELISpot

A estimulação dos esplenócitos oriundos dos animais C57BL/6 vacinados com os quatro conjuntos vacinais levou a produção de IFN- $\gamma$  em diferentes níveis para os grupos 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL, quando estimuladas com 18 dos 179 peptídeos testados (Figura 34). Os resultados de ELISpot demonstram que nesse modelo os peptídeos de NS4 são imunodominantes, levando a uma produção expressiva de IFN- $\gamma$  pelas células CD8+ quando estimuladas com os peptídeos NS4-19, NS4-20 e NS4-32. A tabela 14 mostra número de células produtoras de spots/milhão ( $10^6$ ) após estimulação com os peptídeos.

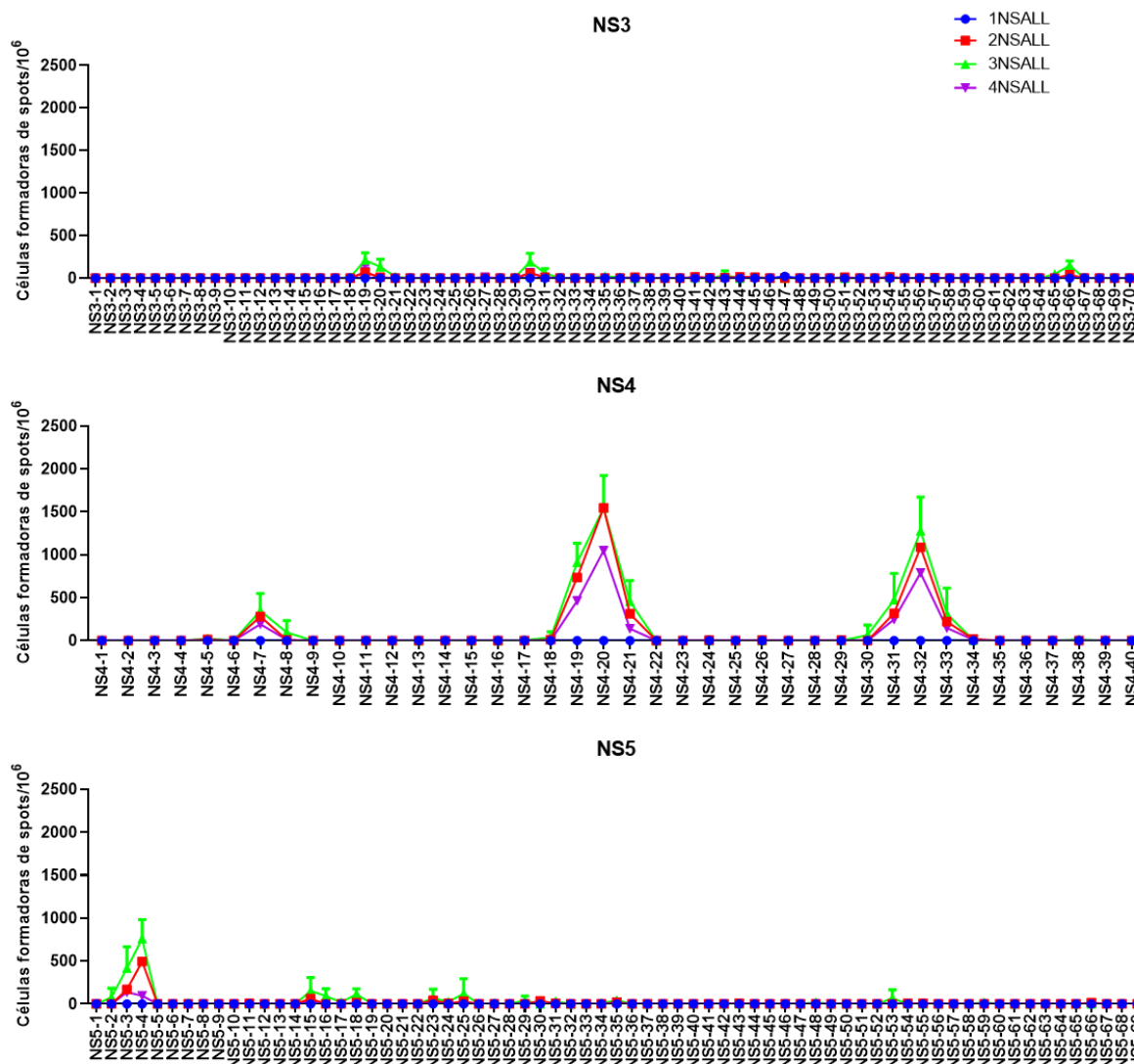


Figura 34 - **Triagem dos peptídeos cobrindo a proteína NS3, NS4 e NS5 do DENV em camundongos C57BL/6.** Os peptídeos sobrepostos que cobrem as proteínas NS3, NS4 e NS5 de DENV (10  $\mu$ g / mL) foram usados para estimulação de esplenócitos de camundongos C57BL/6 vacinados. Os valores representam as células formadoras de spots por milhão, medidas pelo ensaio de ELISpot. Em azul, vermelho, verde e roxo estão os resultados dos animais imunizados com as vacinas 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL, respectivamente.

Tabela 14 - Peptídeos positivos no ensaio de ELISpot para camundongos C57BL/6.

Peptídeo	Número de células produtoras de spots/10 <sup>6</sup>											
	1NSALL			2NSALL			3NSALL			4NSALL		
1 NS3-19	0	0	-	44	95	-	154	273	-	134	15	-
2 NS3-20	4	0	-	24	0	-	74	198	-	0	0	-
3 NS3-30	0	0	-	34	85	-	124	263	-	74	60	-
4 NS3-31	0	0	-	24	0	-	24	98	-	14	0	-
5 NS3-65	0	0	-	0	0	-	74	23	-	0	0	-
6 NS3-66	0	0	-	44	40	-	114	188	-	24	0	-
7 NS4-7	0	0	0	254	225	369	314	165	564	194	250	134
8 NS4-8	0	0	0	0	0	29	0	30	254	0	30	0
9 NS4-18	0	0	0	0	0	39	0	0	114	0	0	0
10 NS4-19	0	0	0	674	650	884	914	690	1134	384	545	464
11 NS4-20	0	0	0	1854	1370	1419	1854	1125	1659	1114	1055	979
12 NS4-21	0	0	0	444	190	304	494	195	679	184	200	34
13 NS4-31	0	0	0	314	245	404	414	200	809	314	250	179
14 NS4-32	0	0	0	1124	1010	1129	1644	860	1329	724	990	654
15 NS4-33	0	0	0	234	110	324	194	95	654	104	185	154
16 NS5-2	0	0	-	4	0	-	4	153	-	0	0	-
17 NS5-3	0	0	-	64	278	-	244	593	-	264	13	-
18 NS5-4	0	0	-	394	598	-	604	918	-	0	193	-

Fonte: Do autor. Os ensaios foram realizados em três replicatas biológicas (n=3) para os peptídeos de NS4 e em duas replicatas biológicas (n=2) para os peptídeos de NS3 e NS5.

### 5.3.2.2 Identificação de epítomos de células T por FACS

A estimulação das células do baço dos animais da linhagem C57BL/6 com os peptídeos levou a produção de IFN- $\gamma$  pelas células CD8+, sendo os peptídeos NS4-19, NS4-20 e NS4-32 os peptídeos que apresentaram maior percentual de produção da citocina no teste para os grupos 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL. As células CD4+ ao serem estimuladas com os peptídeos, apresentaram expressão de IFN- $\gamma$  baixa ou ausente (Figura 35). A tabela 15 apresenta as porcentagens de células CD4+IFN+ e CD8+IFN+ analisadas no ensaio.

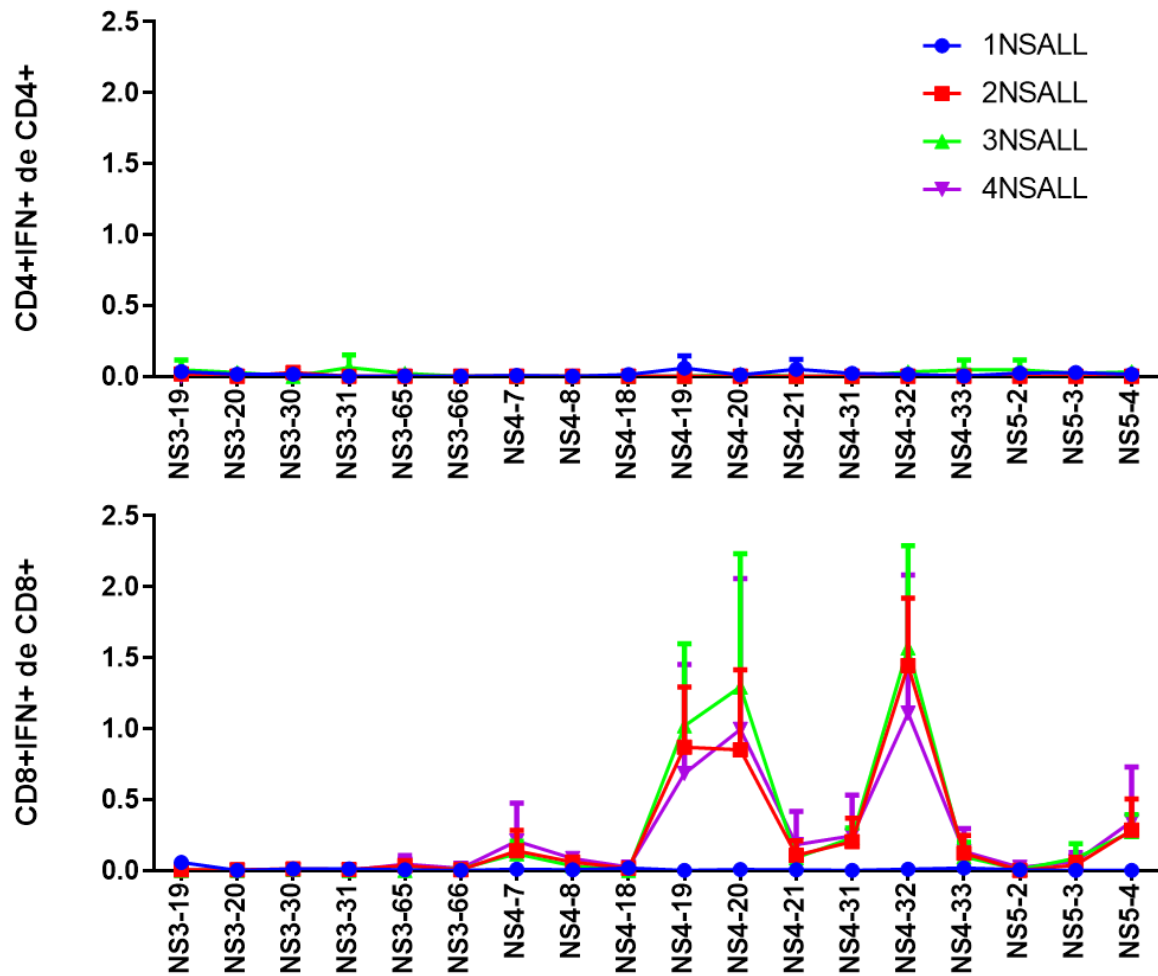


Figura 35– **Identificação dos epítomos de células T por FACS.** Os esplenócitos dos animais imunizados foram estimulados in vitro com os peptídeos positivos e marcados no ensaio de marcação de citocinas intracelulares (ICS) como células CD4+IFN+ e CD8+IFN+. Em azul, vermelho, verde e roxo estão os resultados dos animais imunizados com as vacinas 1NSALL, 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL, respectivamente.

Tabela 15 - Produção da citocina IFN- $\gamma$  pelas células CD4+ ou CD8+ frente à estimulação com os peptídeos.

Peptídeo	1NSALL				2NSALL				3NSALL				4NSALL			
	CD4+IFN+ de CD4		CD8+IFN+ de CD8		CD4+IFN+ de CD4		CD8+IFN+ de CD8		CD4+IFN+ de CD4		CD8+IFN+ de CD8		CD4+IFN+ de CD4		CD8+IFN+ de CD8	
NS3-19	0,07	0,00	0,05	0,07	0,00	0,04	0,01	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NS3-20	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NS3-30	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	0,06	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NS3-31	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
NS3-65	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09
NS3-66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03
NS4-7	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,04	0,24	0,00	0,00	0,06	0,18	0,00	0,00	0,02	0,40
NS4-8	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,04	0,08	0,00	0,00	0,03	0,04	0,00	0,00	0,08	0,09
NS4-18	0,03	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
NS4-19	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	1,17	0,00	0,00	0,61	1,43	0,00	0,00	0,14	1,23
NS4-20	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,45	1,25	0,00	0,03	0,63	1,96	0,00	0,00	0,24	1,75
NS4-21	0,10	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,03	0,18	0,00	0,00	0,07	0,11	0,00	0,00	0,02	0,35
NS4-31	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,32	0,00	0,00	0,18	0,28	0,00	0,00	0,04	0,45
NS4-32	0,03	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	1,11	1,78	0,00	0,07	1,06	2,08	0,00	0,00	0,42	1,80
NS4-33	0,01	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,03	0,21	0,00	0,10	0,03	0,17	0,00	0,02	0,02	0,25
NS5-2	0,03	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
NS5-3	0,02	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,05	0,01	0,16	0,00	0,00	0,02	0,11
NS5-4	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,44	0,00	0,07	0,19	0,36	0,00	0,00	0,08	0,62

Fonte: Do autor. \*Os valores foram obtidos em duplicata através de réplicas biológicas para cada grupo. \*\* Peptídeos com maior a maior média células positivas para a expressão de IFN- $\gamma$ , entre todos os grupos testados, estão identificados em vermelho



Os peptídeos que apresentaram resultados positivos após triagem nos ensaios de ELISpot e confirmação da produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos TCD8+ pela técnica de FACS foram indicados como epítomos imunodominantes de células TCD8+ presentes nas vacinas testadas. Os peptídeos identificados estão representados na tabela 16.

Tabela 16 - Peptídeos identificados como regiões imunodominantes para camundongos C57BL/6 (alelos H2-Db e H2-kb) presentes nas vacinas NSALL.

	Peptídeo	Sequência	Posição no proteoma do DENV)
1	NS4-19	WPISKMDLGVPLLALGCYSQ	2327
2	NS4-20	PLLALGCYSQVNPLTLTAAV	2338
3	NS4-32	TLWEGNPGKFWNTTIAVSMA	2446

Os peptídeos positivos também foram testados para a ativação de células T com capacidade de produção da citocina TNF- $\alpha$  e pela presença do marcador de degranulação CD107a. Todos os peptídeos testados induziram o fenótipo de células CD8+ IFN+TNF+. Entretanto, a presença de células CD8+ IFN+CD107+ não foi detectada (Figura 36). As percentagens de células para ambos fenótipos estão indicadas na tabela 17.

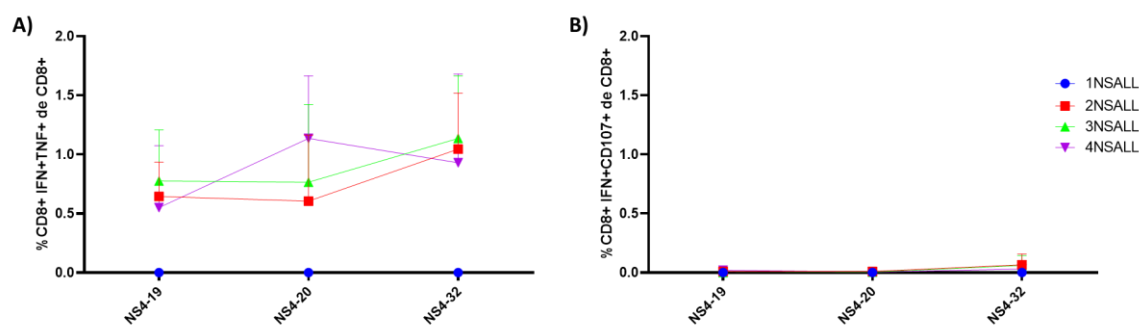


Figura 36 - Análise da produção da citocina TNF- $\alpha$  e do marcador de superfície CD107a por linfócitos TCD8+ de camundongos BALB/c estimulados com os peptídeos de NS3. As células dos camundongos imunizados foram estimuladas com 10  $\mu$ g / mL dos peptídeos e marcadas intracelularmente pela técnica ICS. **A)** Porcentagem de linfócitos TCD8+ com expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ; **B)** Porcentagem de linfócitos TCD8+ produtores de citocina IFN- $\gamma$  e que apresentam o marcador se superfície de CD107. Os resultados foram lidos em FACSCelesta<sup>TM</sup>

Os peptídeos identificados foram alinhados com a sequência da poliproteína do DENV proveniente da amostra Mochizuki, depositada no Genbank com o código de acesso de BAB72261.1. A figura 37 ilustra o resultado do alinhamento realizado.

Tabela 17 - Porcentagem de linfócitos TCD8+ de camundongos C57BL/6/c com fenótipo IFN+TNF+ e IFN+CD107+ após estimulação com os peptídeos.

Peptídeo	1NSALL				2NSALL				3NSALL				4NSALL			
	IFN+TNF+		IFN+CD107+		IFN+TNF+		IFN+CD107+		IFN+TNF+		IFN+CD107+		IFN+TNF+		IFN+CD107+	
<b>NS4-19</b>	0	0	0	0	0,85	0,44	0,01	0,01	1,08	0,47	0	0	0,92	0,18	0,01	0,03
<b>NS4-20</b>	0	0	0	0	1,00	0,21	0,01	0,01	1,23	0,3	0	0,01	1,51	0,76	0	0,01
<b>NS4-32</b>	0	0	0	0	1,38	0,71	0	0,13	1,51	0,76	0	0,12	1,46	0,4	0	0,06

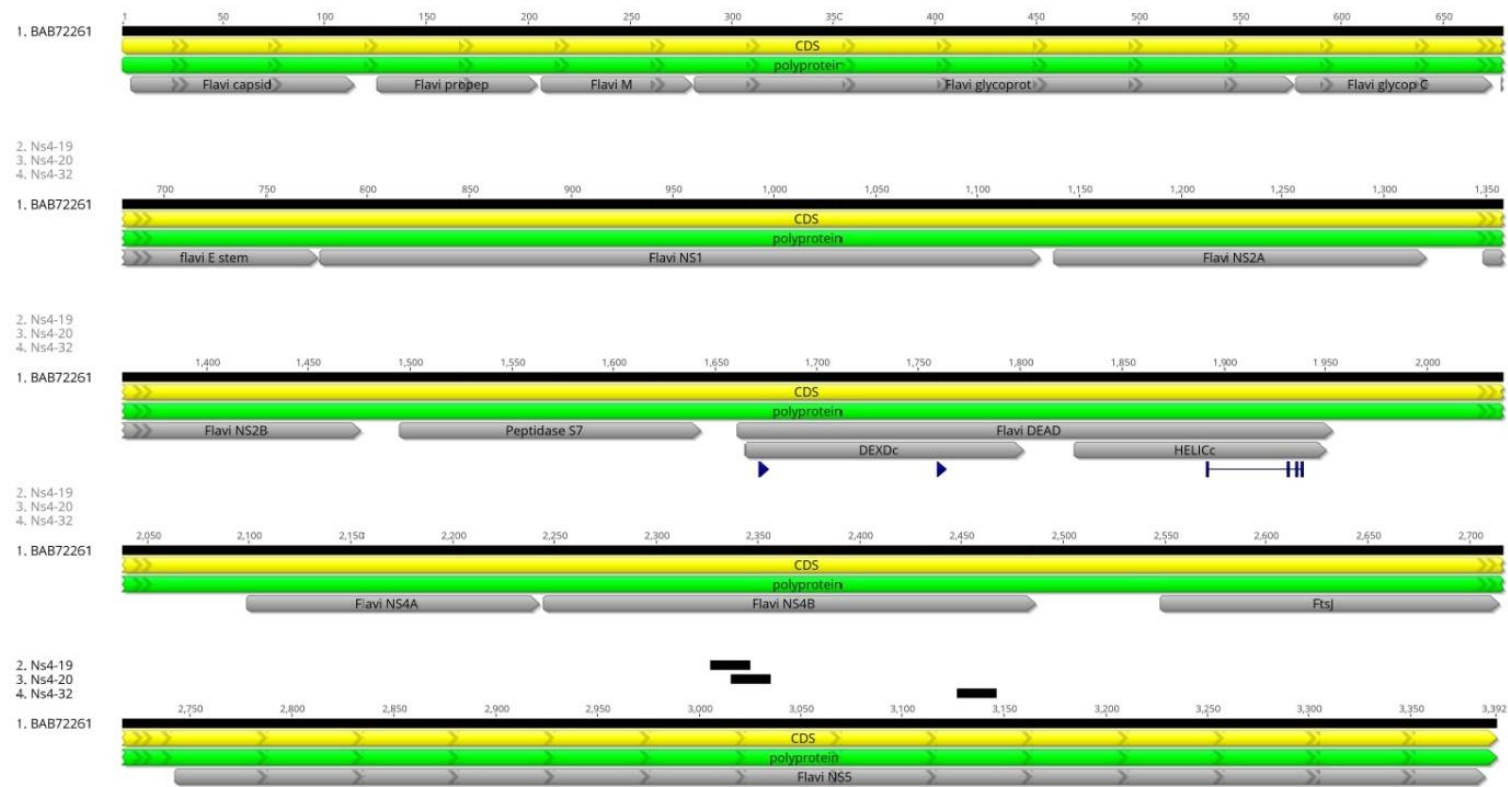


Figura 37– Alinhamento dos peptídeos identificados como epítomos de células T CD8+ para camundongos C57BL/6 com a poliproteína do Dengue virus. Os peptídeos positivos foram alinhados com a poliproteína viral proveniente da amostra Mochizuki (código de acesso no GenBank BAB72261.1.) através do software Geneious. O alinhamento demonstra que os peptídeos alinham com regiões da proteína NS4B viral.

### 5.3.2.3 Predição de epítomos de células T pelo software NetMHC

Apesar de termos identificado três peptídeos imunodominantes de NS4 para a linhagem de camundongos C57BL/6, decidimos avançar nosso estudo no intuito de identificar dentro destas sequências, a região específica que se liga com maior afinidade ao MHC murino. Para tanto, foi utilizado o programa NetMHC para predizer sequências com 8 ou 9 aminoácidos (8-9mers) para ligação aos alelos H-2-Db e H-2-Kb, os quais são presentes em camundongos da linhagem C57BL/6.

Com base nas sequências previamente selecionadas em nossos ensaios, NS4-19, NS4-20 e NS4-32, o software fez a predição de 5 sequências as quais apresentaram *score* (%Rank) menor que 2, conforme estabelecido pelo algoritmo utilizado no programa. Adicionalmente, decidimos ampliar o score sugerido pelo software e selecionamos quatro outras sequências com *score* menor que 10 para comporem nosso painel de peptídeos a serem testados (tabela 18).

Tabela 18 - Peptídeos preditos pelo programa NetMHC para a ligação ao MCH de classe 1 para os haplótipos H-2-Db e H-2-kb.

Peptídeo	Sequência	Alelos	% Rank (NetMHC)
PEP1	SKMDLGVPL	H-2-Db	1.1430
PEP2	KMDLGVPLL	H-2-Db	1.0844
PEP 3	LGVPLLAL	H-2-kb	1.6787
PEP 4	YSQVNPLTL	H-2-Db	0.0035
PEP 5	SQVNPLTL	H-2-Db	0.1432
PEP 6	GKFWNTTIA	H-2-Db	5.8175
PEP 7	KFWNTTIAV	H-2-Db	5.8470
PEP 8	GKFWNTTI	H-2-Db	5.2897
PEP 9	WNTTIAVSM	H-2-kb	9.5869

A figura 38 demonstra as sequências preditas pelo *software* NetMHC alinhadas entre si, evidenciando as variações de aminoácidos existentes entre os peptídeos preditos.

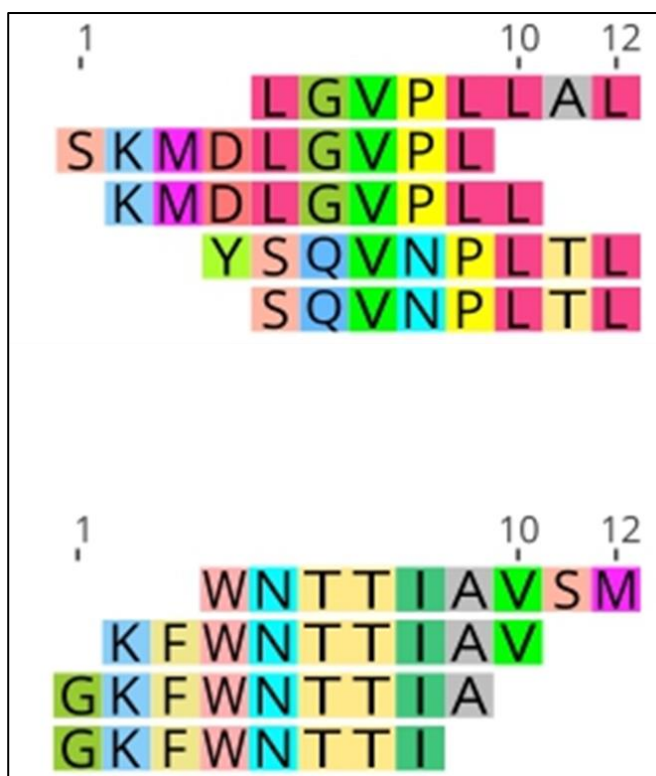


Figura 38– Variantes dos peptídeos NS4-19, NS4-20 e NS4-32 preditos pelo programa NetMHC.

Os peptídeos preditos foram utilizados para estimulação dos esplenócitos de animais C57BL/6 vacinados com a vacina 2NSALL e a produção de IFN- $\gamma$  medida por ELISpot. Dentre os 9 peptídeos testados, os peptídeos 4, 5 e 9 levaram às células a produzirem IFN- $\gamma$ , como demonstrado na figura 39.

Quando comparada a performance dos peptídeos 4 e 5 preditos nos ensaios de ELISpot, observa-se a presença de um único aminoácido (tirosina-Y) (tabela 19) no início na sequência do peptídeo 4 pode estar contribuindo para um melhor ancoramento deste peptídeo ao MHC, uma vez que a presença desse aminoácido contribuiu para um aumento na produção de IFN no ensaio de ELISpot.

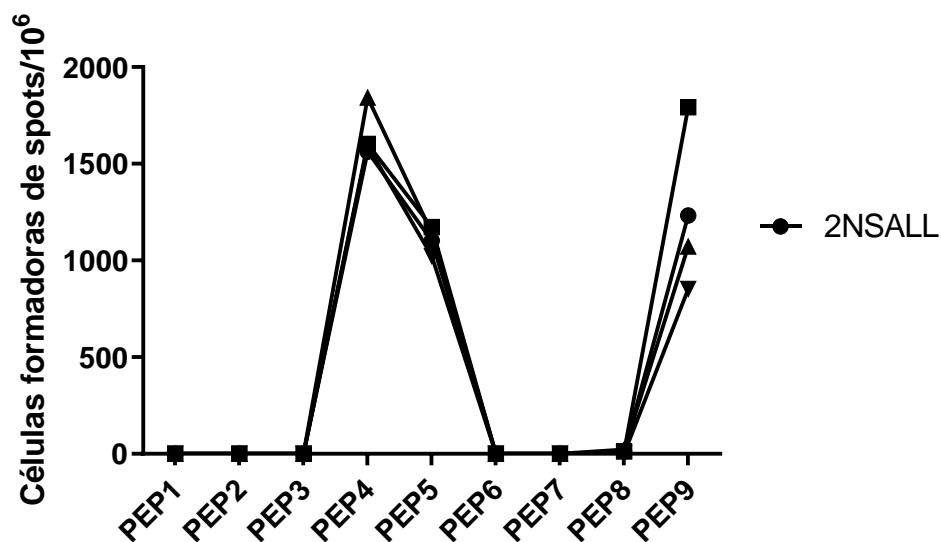


Figura 39 - ELISpot para a obtenção da sequência otimizada dos epítomos de células T. Os nove peptídeos preditos pelo programa NetMHC foram sintetizados e testados na estimulação de esplenócitos de animais C57BL/6 imunizados com a vacina 2NSALL. Os peptídeos PEP4, PEP5 e PEP9 levaram a produção de IFN- $\gamma$  pelas células estimuladas.

Tabela 19 - Epítomos de células TCD8+ para camundongos da linhagem C57BL/6

Peptídeo	Sequência	Posição proteoma do DENV
4	YSQVNPLTL	2344
5	SQVNPLTL	2345
9	WNTTIAVSM	2459

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve o intuito de realizar um estudo pré-clínico, em modelo murino, de diferentes imunógenos construídos para dengue.

Desde que se iniciaram as buscas de vacinas para dengue, a maioria dos estudos se basearam no uso de proteínas estruturais do DENV, buscando a indução de uma resposta humoral com presença de anticorpos neutralizantes. De fato, a resposta neutralizante em um contexto de infecção viral é benéfica, contudo, a problemática da dengue situa-se principalmente na geração de respostas sub-neutralizantes que podem aumentar a replicação viral e acarretar em manifestações mais graves da doença (MLADINICH et al., 2012).

Embora as células T tenham sido associadas com os mecanismos patogênicos observados na dengue, os quais são elucidados pela teoria do pecado antigênico original, estas células também desempenham um papel protetor durante a infecção viral que é dado tanto pela produção de citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , quanto pela apresentação de um perfil citotóxico por estas células (TIAN et al., 2019; WEISKOPF et al., 2013; YAUCH et al., 2009).

Embora a vacina *Dengvaxia* (SANOFI PASTEUR, FRANÇA) tenha sido licenciada em vários países, uma hipótese para, possivelmente, explicar os níveis decepcionantes de proteção verificados seria de que a não inclusão das proteínas não estruturais do DENV na construção da vacina possa ter levado a uma geração de respostas de células T ineficaz, contribuindo para que os resultados gerados por essa vacina sejam insatisfatórios (TIAN et al., 2019).

KHAN e colaboradores, visando estudar a conservação das proteínas do DENV e suas implicações no desenho de vacinas mostrou, a partir de uma extensiva análise de isolados depositados em banco de dados, que as proteínas não estruturais são altamente conservadas. Além disso, nos sítios identificados como conservados, existem regiões restritas ao HLA de classe I e II, levando à geração de respostas imune celulares baseadas em linfócitos T em humanos (KHAN et al., 2008).

Nossa proposta de associação de proteínas não estruturais do DENV a vetores virais, combinados a um protocolo de vacinação heteróloga se apresentou como uma estratégia importante na geração dos dados apresentados nesse manuscrito.

Nosso protocolo de imunização foi estabelecido através de um estudo realizado por nosso colaborador no qual foi demonstrado que o intervalo entre dose e reforço de uma



semana seguido por um intervalo de 14 dias antes do desafio foi suficiente para proteger os animais em um desafio com *Plasmodium berghei*. Dessa forma, este protocolo foi reproduzido em nosso estudo na realização dos desafios com DENV (REYES-SANDOVAL et al., 2011).

Muitos trabalhos utilizando a proteína NS1 do DENV como alvo para desenvolvimento de vacinas alcançaram sucesso na obtenção de altos títulos de anticorpos anti-NS1 em camundongos imunizados com as formulações vacinais, resposta de células T específicas e presença de imunidade protetora após desafio intracranial com DENV (AMORIM et al., 2012; BEATTY et al., 2015; COSTA et al., 2007). Entretanto, outros estudos apontam que anticorpos anti-NS1 exercem um papel ativo na patogênese da dengue, estando envolvidos nas formas mais graves de manifestação da doença (AMORIM et al., 2014; ZEIDLER et al., 2017).

Apesar das inconsistências sobre a eficácia de uma vacina baseada em NS1, na literatura, nós optamos por testar vacinas baseadas em NS1 utilizando vetores virais, o que poderia gerar respostas principalmente celulares potencialmente protetoras. No entanto, nossos resultados sugerem que NS1, de fato, pelo menos isoladamente, não é capaz de produzir tal proteção no modelo testado. Esta ausência de proteção pode estar relacionada à indução de anticorpos anti-NS1 que podem ter potencializado a patogênese, durante a infecção pelo DENV.

Uma vez que a proteína NS1 compartilha epítomos com plaquetas e proteínas de superfície de células presentes no endotélio dos seres humanos, anticorpos anti-NS1 podem inibir a agregação de plaquetas e recrutar o sistema complemento contra as células do endotélio, induzindo a inativação do sistema complemento ou apoptose, contribuindo principalmente com o extravasamento vascular. Além disso, anticorpos anti-NS1 podem apresentar reação cruzada com o plasminogênio, aumentando sua ativação e, podendo favorecer as formas mais graves de manifestação da dengue (AMORIM et al., 2014; AVIRUTNAN et al., 2007; CHENG et al., 2009; CHUANG et al., 2016; LIN et al., 2001, 2003).

As vacinas NSALL foram construídas contendo sequências das proteínas NS3, NS4 e NS5 do DENV. Como mencionado anteriormente, as sequências nucleotídicas e aminoacídicas destas vacinas não serão apresentadas neste volume devido ao processo de registro destas formulações por parte de nossos colaboradores. Desta forma, a explanação acerca destas vacinas será direcionada para as características globais contidas nos imunógenos.

Um trabalho realizado por Rivino e colaboradores (2016) demonstrou que durante a infecção pelo DENV, as proteínas NS3 e NS5 são os principais alvos de células TCD8+, onde houve um reconhecimento preferencial de resíduos presentes nestas proteínas, identificados por ELISPOT, em todos os pontos analisados da doença (fase aguda, pós febril e convalescença)(RIVINO, 2016).

A proteína NS3 atua em diversas reações enzimáticas no ciclo de replicação viral e é conservada entre os sorotipos do DENV (APPANNA et al., 2007; RAMÍREZ et al., 2014; ROTHMAN, 2004; SIMMONS et al., 2005; SIMMONS; SUN; PUTNAK, 2016).

Descrita como uma das proteínas mais imunodominantes do DENV, esta proteína é apontada como o principal alvo das células TCD8+ durante a infecção por este vírus (TIAN et al., 2019). Assim, a proteína NS3 vem sendo utilizada como alvo em formulações vacinais para dengue. Estes estudos demonstraram que imunizações baseadas em NS3 podem levar à ativação de linfócitos T, com produção de IFN- $\gamma$ , e de anticorpos anti-NS3 em modelo murino (HURTADO-MELGOZA et al., 2016; RAMÍREZ et al., 2014; SIMMONS; SUN; PUTNAK, 2016).

De forma semelhante, estudos apontam para o potencial vacinal da proteína NS5 do DENV, uma vez que esta possui um maior número de resíduos de aminoácidos conservados entre os quatro sorotipos de DENV, comparados a outras proteínas do vírus. Além disso, a partir de análises de predição de epítomos, foi verificado que a proteína NS5 possui sequências com afinidade de ligação a diferentes supertipos de HLA em seres humanos e em modelo murino (HLA-DR) (KHAN et al., 2008).

Estes dados corroboram a excelente performance das vacinas NSALL em proteger os animais da linhagem C57BL/6 após o desafio intracranial com o DENV. Contudo, os animais imunizados com a vacina 1NSALL e desafiados apresentaram uma percentagem de sobrevivência baixa ou ausente.

Nossos ensaios de ELISPOT e FACS realizados com as células provenientes dos animais C57BL/6 levou a identificação de 3 epítomos de células T para os quais as respostas celulares possam estar sendo direcionadas. Porém, os mesmos epítomos não se encontram presentes na sequência da vacina 1NSALL e a não geração de uma resposta imune contra esses epítomos possa ter levado à uma ausência de proteção dos animais vacinados e desafiados com os diferentes sorotipos do DENV.

No que se refere às respostas geradas por células TCD4+, o estudo de Tian e colaboradores (2019) apontou que os principais alvos destas células são as proteínas do capsídeo viral, seguida pelas proteínas do envelope e pelas proteínas não estruturais do

DENV. Nossos dados corroboram este estudo, uma vez que os peptídeos testados em nossos ensaios não induziram a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos CD4<sup>+</sup> oriundos dos animais vacinados (TIAN et al., 2019).

No presente trabalho, identificamos epítomos de células T para camundongos da linhagem C57BL/6 (alelos das moléculas de MHC-I murinos H-2-Db e H-2-kb) e para BALB/c (alelos H2-Kd, H2-Dd e H2-Ld). Interessantemente, os epítomos imunodominantes divergiram nos dois modelos, sendo epítomos imunogênicos de NS4 identificados nos animais C57BL/6 e os epítomos de NS3 identificados para BALB/c.

Os epítomos imunodominantes identificadas para C57BL/6 foram NS4B<sub>100-108</sub>, NS4-B<sub>101-108</sub> e NS4B<sub>213-221</sub>. Sendo o epítomo NS4B<sub>100-108</sub> também um dos epítomos identificados por Yauch e colaboradores (2009) em um estudo no qual camundongos C57BL/6 foram infectados com uma amostra adaptada de DENV-2 S221. Além disso, para verificar a imunogenicidade dos peptídeos identificados frente a uma infecção com a amostra S221, os animais foram imunizados com os peptídeos imunodominantes identificados no estudo. A imunização com os peptídeos resultou em uma diminuição da carga viral de 350 vezes quando se comparado com os animais não infectados, mostrando que o epítomo imunodominante presente em nossa vacina também gera resposta em um modelo de infecção com o DENV em camundongos C57BL/6 (YAUCH et al., 2009).

Rothman e colaboradores (1996) identificaram um epítomo de NS3 em camundongos BALB/c pelo isolamento de um clone de células TCD8<sup>+</sup> após a infecção desses animais com DENV. Uma parte da sequência aminoacídica do epítomo identificado por aqueles autores é ARGYISTRVEMGEAA (NS3<sub>296-310</sub>), sendo a sequência GYISTRVEM suficiente para ser reconhecida pelos clones de linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Esta sequência está contida em parte dos epítomos imunodominantes para BALB/c identificados em nosso trabalho (NS<sub>3-30</sub>: **HFTDPASIAARGYISTRVEM** e NS<sub>3-31</sub>: **RGYISTRVEMGEAAAIFMTA**) (ROTHMAN; KURANE; ENNIS, 1996; SPAULDING et al., 1999).

Por fim, os epítomos presentes nas vacinas identificados em nosso estudo como epítomos imunodominantes, também foram identificados por outros autores em amostras humanas de pacientes previamente expostos ao vírus. Weiskopf e colaboradores (2013) identificaram epítomos de células T a partir da análise de PBMC's humanos isolados de paciente de região endêmica para dengue. Dentre os diversos epítomos identificados, os epítomos localizados na região do proteoma do DENV nas posições 1978 (**TPEGIIPAL** e suas variantes identificadas no estudo), 1977(**YTPEGIIPTL** e suas variantes),

2338(YPLLAIGCY) e 1768 (DPASTAARGY) contém parte das sequências que também foram identificados em nosso modelo de estudo NS3-54, NS4-19, NS4-20 e NS3-30 (WEISKOPF et al., 2013).

Adicionalmente, Tian e colaboradores analisou todos os epítomos capazes de induzir respostas de células T específicas que foram publicados nos últimos anos, totalizando 57 estudos avaliados. Os epítomos de células TCD8+ humanos identificados **HPGAGKTKRY**, **DPASIAARGY**, **RVIDPRRCLK**, **TPEGIIPSM**, **TPEGIIPAL**, **TPEGIIPALF**, **TPEGIIPSMF**, **TPEGIIPTLF**, **VPLLAIGCY**, **SPGKFWNTTI**, **IAVSMANIF** estão em quase sua totalidade (identificados em negrito) contidos nos epítomos que identificamos em nosso trabalho (TIAN et al., 2019).

Os dados em conjunto apontam que as vacinas contém regiões imunodominantes que já foram descritas em modelos de infecção natural pelo DENV em modelo murino, bem como contém determinantes antigênicos identificados em amostras humanas de pacientes que vivem em região endêmica para dengue, demonstrando que os resultados obtidos nos experimento de desafio apresentados para os animais C57BL/6 podem também ser exitosos quando traduzidos para camundongos BALB/c e futuramente, em estudos de ensaios clínicos das vacinas em seres humanos.

Além disso, as vacinas NSALL foram capazes de gerar a ativação de células TCD8+ polifuncionais, com capacidade produzir citocinas importantes para um contexto de infecção viral (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e de exercer atividade citotóxica (principalmente no contexto dos camundongos da linhagem BALB/c).

Apesar do uso de um modelo artificial para o desafio dos animais imunizados, este se mostrou satisfatório na realização do estudo de eficácia protetora das vacinas testadas, uma vez que os resultados de proteção *in vivo* foram corroborados nos estudos *in vitro*, principalmente para a vacina 1NSALL que não apresentou capacidade de proteção dos animais infectados com DENV e também, não possui em sua constituição, as sequências de aminoácidos imunodominantes que foram identificadas *in vitro* para camundongos C57BL/6.

O presente estudo destacou que as vacinas 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL apresentaram eficácia protetora em modelo murino (camundongos C57BL/6) e que em sua sequência estão contidos epítomos capazes de gerar respostas de linfócitos CD8+, sendo estes também identificados como epítomos imunodominantes em modelo animal e humano.

## 7 CONCLUSÕES

As vacinas NS1, NS1HepB, HepBNS1 e 1NSALL não apresentaram eficácia protetora na maioria dos desafios realizados. Porém, as vacinas 2NSALL, 3NSALL e 4NSALL apresentaram resultados positivos importantes, incluindo-se a capacidade multivalente destes candidatos vacinais em gerar resposta imune protetora para mais de um sorotipo do DENV.

As vacinas NSALL são capazes de induzir a ativação de células TCD8+ com atividade polifuncional nos animais imunizados e suas construções contém epítomos de células T que já foram descritos em trabalhos prévios como sequências potenciais para construções de vacinas para dengue, demonstrando que os estudos com essas vacinas podem ser levados adiante no intuito de obter uma nova vacina para dengue.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Produzir uma amostra de DENV-4 adaptada ao cérebro de camundongos;
- Desafiar os animais, previamente vacinados com as formulações vacinais, com a amostra de DENV-4 adaptada;
- Desafiar os animais BALB/c, previamente vacinados com as formulações vacinais, com todos os sorotipos do DENV;
- A partir dos epítomos identificados para camundongos BALB/c, sintetizar sequências de 8mers ou 9 mers para serem testados em ELISpot a fim da obtenção da sequência que melhor se liga à molécula de MHC.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AKKINA, R. Human immune responses and potential for vaccine assessment in humanized mice. **Curr Opin Immunol.**, v. 25, n. 3, p. 403–409, 2013.

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.

AMARAL, D. C. G. et al. Intracerebral infection with dengue-3 virus induces meningoencephalitis and behavioral changes that precede lethality in mice. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 23, 2011.

AMORIM, J. H. et al. Protective immunity to DENV-2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. **Vaccine**, v. 30, n. 5, p. 837–845, 2012.

AMORIM, J. H. et al. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. **Virus Research**, v. 181, p. 53–60, 2014.

ANDREATTA, M.; NIELSEN, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: Application to the MHC class I system. **Bioinformatics**, v. 32, n. 4, p. 511–517, 2016.

ANTROBUS, R. D. et al. Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved influenza A antigens. **Molecular Therapy**, v. 22, n. 3, p. 668–674, 2014.

ANVISA, A. D. V. S. Vacina dengue: esclarecimentos. 2018.

APPANNA, R. et al. Cross-reactive T-cell responses to the nonstructural regions of dengue viruses among dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients in Malaysia. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 8, p. 969–977, 2007.

APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Current opinion in virology**, v. 9, p. 134–42, 2014.

AVIRUTNAN, P. et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. 1798–1812, 2007.

BADEN, L. R. et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine (IPCAVD 001). **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 2, p. 240–247, 2013.

BARNES, E. et al. Europe PMC Funders Group Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. **Sci Transl Med**, v. 4, n. 115, p. 1–22, 2013.

BEATTY, P. R. et al. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, 2015.

BECKETT, C. G. et al. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. **Vaccine**, v. 29, n. 5, p. 960–968, 2011.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–7, 2013.

CALVO-PINILLA, E. et al. Vaccination of mice with a modified Vaccinia Ankara (MVA) virus expressing the African horse sickness virus (AHSV) capsid protein VP2 induces virus neutralising antibodies that confer protection against AHSV upon passive immunisation. **Virus Research**, v. 180, p. 23–30, 2014.

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

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

CHAWLA, P.; YADAV, A.; CHAWLA, V. Clinical implications and treatment of dengue. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 3, p. 169–178, 2014.

CHENG, H. J. et al. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 2–3, p. 398–406, 2009.

CHUANG, Y.-C. et al. Dengue Virus Nonstructural Protein 1–Induced Antibodies Cross-React with Human Plasminogen and Enhance Its Activation. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 3, p. 1218–1226, 2016.

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

COTTINGHAM, M. G.; CARROLL, M. W. Recombinant MVA vaccines: Dispelling the myths. **Vaccine**, v. 31, n. 39, p. 4247–4251, 2013.

DANKO, J. R. et al. Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue DNA Vaccine Administered with a Cationic Lipid-Based Adjuvant in a Phase 1 Clinical Trial. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, p. 1–17, 2018.

DE ANGEL, R. M.; VALLE, J. R. DEL. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1–5, 2013.

DE SOUZA, K. P. R. et al. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement. **Virology journal**, v. 10, p. 267, 2013.



- DECROLY, E. et al. Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 51–65, 2012.
- DUFFY, D. et al. Neutrophils Transport Antigen from the Dermis to the Bone Marrow, Initiating a Source of Memory CD8+ T Cells. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 917–929, 2012.
- EL FEZZAZI, HANNA FRAGO, C. et al. Resource Use and Costs of Dengue: Analysis of Data from Phase III Efficacy Studies of a Tetravalent Dengue Vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 1898–1903, 2017.
- ELONG NGONO, A.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual review of immunology**, v. 36, n. 1, p. annurev-immunol-042617-053142, 2018.
- ETAPA, S.; EPIDEMIOLOGIA, S.; EPIDEMIOLOGIA, B. Orientações técnico-operacionais para a segunda etapa da vacinação contra o sarampo 2019. v. 50, p. 1–21, 2019.
- EWER, K. et al. A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine Boosted with MVA. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 17, p. 1635–1646, 2016.
- FARES, R. C. G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- FARINA, S. F. et al. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. **Journal of virology**, v. 75, n. 23, p. 11603–11613, 2001.
- FIGUEIREDO, L. B. et al. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 314–316, 2008.
- FRIAS-STAHOLI, N. et al. Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing. **Journal of virology**, v. 88, n. 4, p. 2205–18, 2014.
- GARCÍA-RIVERA, E. J.; RIGAU-PÉREZ, J. G. Encephalitis and dengue. **Lancet**, v. 360, n. 9328, p. 261, 2002.
- GEBHARD, L. G.; FILOMATO, C. V.; GAMARNIK, A. V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1739–1756, 2011.
- GEIBEN-LYNN, R. et al. Kinetics of recombinant adenovirus type 5, vaccinia virus, modified vaccinia ankara virus, and DNA antigen expression in vivo and the induction of memory T-lymphocyte responses. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 4, p. 691–696, 2008.
- GÓMEZ, C. E. et al. MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. **Current gene therapy**, v. 11, n. 3, p. 189–217, 2011.
- GONÇALVES, D. et al. Immunocompetent mice model for dengue virus infection. **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 525947, 2012.

GOODMAN, A. L. et al. A viral vectored prime-boost immunization regime targeting the malaria pfs25 antigen induces transmission-blocking activity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–11, 2011.

GREEN, C. A. et al. Chimpanzee adenovirus and MVA-vectored respiratory syncytial virus vaccine is safe and expands humoral and cellular immunity in adults. **Science translational medicine**, v. 7, n. 300, p. 300ra126, 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.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. **Dengue Bulletin**, v. 21, p. 1–14, 1997.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. 2015.

HADINEGORO, S. R. et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 13, p. 1195–1206, 2015.

HALSTEAD, S. B. Dengue. 2007.

HAYTON, E. J. et al. Safety and tolerability of conserved region vaccines vectored by plasmid DNA, simian adenovirus and modified vaccinia virus Ankara administered to human immunodeficiency virus type 1-uninfected adults in a randomized, single-blind phase i trial. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–8, 2014.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301–4306, 2012.

HILL, A. V. S. et al. Prime-boost vectored malaria vaccines: Progress and prospects. **Human Vaccines**, v. 6, n. 1, p. 78–83, 2010.

HODGSON, S. H. et al. Evaluation of the efficacy of ChAd63-MVA vectored vaccines expressing circumsporozoite protein and ME-TRAP against controlled human malaria infection in malaria-naive individuals. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 7, p. 1076–1086, 2015.

HOTTA, S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 90, n. 1, p. 1–9, 1952.

HUANG, C. Y. H. et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 305–315, 2010.

HURTADO-MELGOZA, M. L. et al. Differential humoral and cellular immunity induced by vaccination using plasmid DNA and protein recombinant expressing the NS3 protein of dengue virus type 3. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p. 1–10, 2016.

**International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).**

JOHNSON, A. J.; ROEHRIG, J. T. New Mouse Model for Dengue Virus Vaccine Testing. **J. Virol.**, v. 73, n. 1, p. 783–786, 1999.

KAGINA, B. M. N. et al. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, is safe in healthy infants previously vaccinated with BCG, and induces dose-dependent CD4 and CD8T cell responses. **Vaccine**, v. 32, n. 45, p. 5908–5917, 2014.

KARDANI, K.; BOLHASSANI, A.; SHAHBAZI, S. Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits. **Vaccine**, v. 34, n. 4, p. 413–423, 2015.

KASTENMÜLLER, W. et al. Peripheral Prepositioning and Local CXCL9 Chemokine-Mediated Guidance Orchestrate Rapid Memory CD8+ T Cell Responses in the Lymph Node. **Immunity**, v. 38, p. 502–513, 2013.

KENNEDY, S. B. et al. Implementation of an Ebola virus disease vaccine clinical trial during the Ebola epidemic in Liberia: Design, procedures, and challenges. **Clinical Trials**, v. 13, n. 1, p. 49–56, 2016.

KHAN, A. M. et al. Conservation and Variability of Dengue Virus Proteins: Implications for Vaccine Design. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. e272, 2008.

KING, C. A; ANDERSON, R.; MARSHALL, J. S. Dengue Virus Selectively Induces Human Mast Cell Chemokine Production. **The journal of virology**, v. 76, n. 16, p. 8408–8419, 2002.

KUCZERA, D. et al. Highlights for Dengue Immunopathogenesis: Antibody-Dependent Enhancement, Cytokine Storm, and Beyond. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 38, n. 2, p. 69–80, 2018.

LACKNER, P. et al. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 32, n. 2, p. 177–188, 2006.

LEDGERWOOD, J. E. et al. Chimpanzee Adenovirus Vector Ebola Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 10, p. 928–938, 2017.

LIMITED, T. P. C. **No Title**.

LIN, C. F. et al. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. **Journal of Medical Virology**, v. 63, n. 2, p. 143–149, 2001.

LIN, C. F. et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **Journal of Medical Virology**, v. 69, n. 1, p. 82–90, 2003.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. v. 59, p. 23–61, 2003.

MANOFF, S. B. et al. Preclinical and clinical development of a dengue recombinant subunit vaccine. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7126–7134, 2015.

MILLIGAN, G. N. et al. A Dengue Virus Type 4 Model of Disseminated Lethal Infection in AG129 Mice. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0125476, 2015.

MLADINICH, K. M. et al. Dengue virus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes target NS1, NS3 and NS5 in infected Indian rhesus macaques. **Immunogenetics**, v. 64, n. 2, p. 111–121, 2012.

MORRIS, S. J. et al. Simian adenoviruses as vaccine vectors. **Future Virology**, v. 11, n. 9, p. 649–659, 2016.

MOSS, B. Poxvirus DNA replication. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 9, p. 1–12, 2013.

MOTA, J.; RICO-HESSE, R. Dengue virus tropism in humanized mice recapitulates human dengue fever. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20762, 2011.

NA, W. et al. Animal models for dengue vaccine development and testing. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 6, n. 2, p. 104–110, 2017.

NIELSEN, M. et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations - Nielsen - 2009 - Protein Science - Wiley Online Library. p. 1007–1017, 2003.

O'HARA, G. A. et al. Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: A potent new vaccine vector. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 5, p. 772–781, 2012.  
OLIVEIRA, E. R. A. et al. Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. **Virology**, v. 489, p. 95–107, 2016.

PASTRANA, M. E. O. et al. Spatial and statistical methodologies to determine the distribution of dengue in Brazilian municipalities and relate incidence with the health vulnerability index. **Spatial and Spatio-temporal Epidemiology**, v. 11, p. 143–151, 2014.

PAWITAN, J. A. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. **Acta Medica Indonesiana**, v. 43, n. 2, p. 129–35, 2011.

PEIFANG SUN, T. J. K. The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 843469, 2013.

PRICE, P. J. R. et al. Modified vaccinia virus ankara: Innate immune activation and induction of cellular signalling. **Vaccine**, v. 31, n. 39, p. 4231–4234, 2013.

QUINAN, B. R. et al. An intact signal peptide on dengue virus E protein enhances immunogenicity for CD8(+) T cells and antibody when expressed from modified vaccinia Ankara. **Vaccine**, v. 32, n. 25, p. 2972–9, 2014.

QUINAN, B. R.; VERSIANI, A. F.; DA FONSECA, F. G. A MVA construct expressing a secretable form of the Dengue virus 3 envelope protein protects immunized mice from dengue-induced encephalitis. **Vaccine**, v. 34, n. 50, p. 6120–6122, 2016.

RAMAKRISHNAN, L.; RADHAKRISHNA PILLAI, M.; NAIR, R. R. Dengue Vaccine Development: Strategies and Challenges. **Viral Immunology**, v. 28, n. 2, p. 76–84, 2015.

RAMÍREZ, R. et al. Recombinant dengue 2 virus NS3 protein conserves structural antigenic and immunological properties relevant for dengue vaccine design. **Virus Genes**, v. 49, n. 2, p. 185–195, 2014.

RAMOS, C. et al. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. **Journal of neurovirology**, v. 4, n. 4, p. 465–8, 1998.

RASINHAS, A. DA C. et al. First detection of dengue virus in the saliva of immunocompetent murine model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 4, p. 2010–2013, 2018.

REY, F. A. et al. **The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution.** *Nature*, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7753193>>

REYES-DEL VALLE, J. et al. Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 1, p. 36–43, 2014.

REYES-SANDOVAL, A. et al. Single-dose immunogenicity and protective efficacy of simian adenoviral vectors against *Plasmodium berghei*. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 3, p. 732–741, 2008.

REYES-SANDOVAL, A. et al. Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8<sup>+</sup> T-cell responses. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 145–153, 2010.

REYES-SANDOVAL, A. et al. CD8<sup>+</sup> T Effector Memory Cells Protect against Liver-Stage Malaria. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 3, p. 1347–1357, 2011.

RIVINO, L. T cell immunity to dengue virus and implications for vaccine design. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 4, p. 443–453, 2016.

ROCHA, C. D. et al. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. **International Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 83–94, 2004.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, 2010.

ROGERS, D. C. et al. SHIRPA , a protocol for behavioral assessment : validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. **Advances**, v. 306, p. 304–307, 2001.

ROLLIER, C. S. et al. Viral vectors as vaccine platforms: Deployment in sight. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 377–382, 2011.

ROTHMAN, A. L. Dengue: Defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 946–951, 2004.

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

ROTHMAN, A. L.; KURANE, I.; ENNIS, F. A. Multiple specificities in the murine CD4+and CD8+T-cell response to dengue virus. **Journal of Virology**, v. 70, n. 10, p. 6540–6546, 1996.

RUPP, R. et al. Safety and immunogenicity of different doses and schedules of a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TDV) in healthy adults: A Phase 1b randomized study. **Vaccine**, v. 33, n. 46, p. 6351–6359, 2015.

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

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Safety and immunogenicity of one versus two doses of Takeda 's tetravalent dengue vaccine in children in Asia and Latin America : interim results from a phase 2 , randomised , placebo-controlled study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 615–625, 2017.

SAHILI, A. EL; LESCAR, J. Dengue virus non-structural protein 5. **Viruses**, v. 9, n. 4, p. 1–20, 2017.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; ARAKI, KOICHI AHMED, AND R. From Vaccines to Memory and Back. **Immunity.**, v. 33, n. 451–463, 2010.

SÁNCHEZ-SAMPEDRO, L. et al. The evolution of poxvirus vaccines. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1726–1803, 2015.

**SANOFI. SANOFI ATUALIZA INFORMAÇÕES SOBRE A VACINA CONTRA A DENGUE.**

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

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

SIMMONS, C. P. et al. Early T-Cell Responses to Dengue Virus Epitopes in Vietnamese Adults with Secondary Dengue Virus Infections Early T-Cell Responses to Dengue Virus Epitopes in Vietnamese Adults with Secondary Dengue Virus Infections. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5665–5675, 2005.

SIMMONS, M.; SUN, P.; PUTNAK, R. Recombinant dengue 2 Virus NS3 helicase protein enhances antibody and T-Cell response of purified inactivated vaccine. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 1–16, 2016.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 7, p. 22–35, 2007.

SIRIVICHAYAKUL, C. et al. Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Healthy Children and Adults in Dengue-Endemic Regions: A Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 10, p. 1562–1572, 2016.

SOUZA, A. P. D. et al. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 509–522, 2005.

SPAULDING, A. C. et al. Analysis of murine CD8<sup>+</sup> T-cell clones specific for the dengue virus NS3 protein: Flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 398–403, 1999.

SWADLING, L. et al. Supplementary Materials for A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA memory. v. 6, n. 261, p. 1–16, 2014.

TAN, G. K. et al. A Non Mouse-Adapted Dengue Virus Strain as a New Model of Severe Dengue Infection in AG129 Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. e672, 2010.

TAN, G. K. X. et al. Subcutaneous infection with non-mouse adapted dengue virus D2Y98P strain induces systemic vascular leakage in AG129 mice. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v. 40, n. 12, p. 523–532, 2011.

TAPIA, M. D. et al. Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-bli. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 31–42, 2016.

TATSIS, N. et al. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8<sup>+</sup>T cells: Implications for their use as vaccines. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 1916–1923, 2007.

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

THACI, B. et al. The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses. **Oncotarget**, v. 2, n. 3, p. 113–121, 2011.

THOMAS, S. J. et al. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 73–88, 2013.

TIAN, Y. et al. Human T Cell Response to Dengue Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. September, p. 1–9, 2019.

TUISKUNEN BÄCK, A.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, n. 1, p. 19839, 2013.

UMAREDDY, I. et al. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 9, p. 2605–2614, 2006.

URA, T.; OKUDA, K.; SHIMADA, M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 624–641, 2014.

VELANDIA-ROMERO, M. L.; ACOSTA-LOSADA, O.; CASTELLANOS, J. E. In vivo infection by a neuroinvasive neurovirulent dengue virus. **Journal of NeuroVirology**, v. 18, n. 5, p. 374–387, 2012.

WEISKOPF, D. et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8<sup>+</sup> T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, 2013.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518–528, 2007.

WHITEHEAD, S. S. Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD<sup>TM</sup> vaccine? **Expert Rev Vaccines**, v. 15, n. 5, p. 509–517, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **No Title**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) REGIONAL OFFICE FOR SOUTH-EAST ASIA. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. 147, 2009.

YANG, T. C. et al. Detailed analysis of the CD8<sup>+</sup> T-Cell response following adenovirus vaccination. **J. Virol.**, v. 77, n. 24, p. 13407–13411, 2003.

YAUCH, L. E. et al. A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8 + T Cells . **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 8, p. 4865–4873, 2009.

ZEIDLER, J. D. et al. Non-canonical roles of dengue virus non-structural proteins. **Viruses**, v. 9, n. 3, 2017.

ZOMPI, S.; HARRIS, E. Animal Models of Dengue Virus Infection. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 62–82, 2012.

ZUST, R. et al. Type I Interferon Signals in Macrophages and Dendritic Cells Control Dengue Virus Infection: Implications for a New Mouse Model To Test Dengue Vaccines. **Journal of Virology**, v. 88, n. 13, p. 7276–7285, 2014.



## ANEXO I (CEUA)



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

*Certificamos que o Protocolo nº. 27 / 2016, relativo ao projeto intitulado “ESTUDO PRECLÍNICO, EM MODELO INTRACRANIAL MURINO, DE UMA VACINA EXPERIMENTAL CONTRA DENGUE COMPOSTA POR VETORES ADENOVIRAIS E POXVIRAIS RECO”, que tem como responsável FLÁVIO GUIMARÃES DA FONSECA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/05/2016. Este certificado espira-se em 24/05/2021.*

**CERTIFICA**

*We hereby certify that the Protocol nº. 27 / 2016, related to the Project entitled “PRECLINICAL STUDY, IN INTRACRANIAL MURINE MODEL, OF AN EXPERIMENTAL VACCINE AGAINST DENGUE CONSISTING OF ADENOVIRUS AND POXVIRUS RECOMBINA”, under the supervision of FLÁVIO GUIMARÃES DA FONSECA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/05/2016. This certificate expires in 24/05/2021.*

*Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 24/05/2016.*

*Atenciosamente.*

**Sistema CEUA-UFMG**

<https://www.ufmg.br/bioetica/cea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cea](http://www.ufmg.br/bioetica/cea) - [cea@prpq.ufmg.br](mailto:cea@prpq.ufmg.br)**

## ANEXO II

## 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).

Aterrissagem:

- 0 = Sem problemas
- 1 = Aterrissa de lado
- 2 = Aterrissa 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
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. 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. 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. 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. 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	-																				

## ANEXO III

## Peptídeos sobrepostos

Número	Nome	Sequência
1	NS3-1	SQIGAGVFKEGVFHTMWHVT
2	NS3-2	GVFHTMWHVTRGAVLMHQGK
3	NS3-3	RGAVLMHQGKRIEPSWADV
4	NS3-4	RIEPSWADVKKDLISYSVKK
5	NS3-5	KDLISYSVKKDLISYGGGWR
6	NS3-6	DLISYGGGWRLEGEWDEGEE
7	NS3-7	LEGEWDEGEEVQVIAVEPGK
8	NS3-8	VQVIAVEPGKNPKAVQTKPG
9	NS3-9	NPKAVQTKPGLFKTPEGEIG
10	NS3-10	LFKTPEGEIGAIALDFKPGT
11	NS3-11	AIALDFKPGTSGSPIVNREG
12	NS3-12	SGSPIVNREGTSGSPIINRE
13	NS3-13	TSGSPIINREGKVVGLYGNG
14	NS3-14	GKVVGLYGNGVVTKSGAYVS
15	NS3-15	VVTKSGAYVSAIAQTNAEPL
16	NS3-16	AIAQTNAEPLPEIEDEVFRK
17	NS3-17	PEIEDEVFRKRNLTIMDLHP
18	NS3-18	RNLTIMDLHPGAGKTKRYLP
19	NS3-19	GAGKTKRYLPAIVREAIKRR
20	NS3-20	AIVREAIKRRLRTLILAPTR
21	NS3-21	LRTLILAPTRVVAAEMAPTR
22	NS3-22	VVAAEMAPTRVVASEMEEAL
23	NS3-23	VVASEMEEALKGLPIRYALR
24	NS3-24	KGLPIRYALRGLPIRYQTTA
25	NS3-25	GLPIRYQTTAIIKAEHTGKEI
26	NS3-26	IKAHTGKEIVDLMCHATFT
27	NS3-27	VVLMCHATFTMRLLSVPRVP
28	NS3-28	MRLLSVPRVPNYNLIIMDEA
29	NS3-29	NYNLIIMDEAHFTDPASIAA
30	NS3-30	HFTDPASIAARGYISTRVEM
31	NS3-31	RGYISTRVEMGEAAAFMTA
32	NS3-32	GEAAAFMTATPPGSADAFP
33	NS3-33	TPPGSADAFPQSNAPIEDEE
34	NS3-34	QSNAPIEDEEREIPERSWNS
35	NS3-35	REIPERSWNSGFDWITDFAG
36	NS3-36	GFDWITDFAGKTVWFVPSIK
37	NS3-37	KTVWFVPSIKAGNDIANCLR

38	NS3-38	AGNDIANCLRKNGKKVIQLS
39	NS3-39	KNGKKVIQLSRKTFDTEYPK
40	NS3-40	RKTFDTEYPKTKLNDWDFVV
41	NS3-41	TKLNDWDFVVTTDISEMGAN
42	NS3-42	TTDISEMGANFKADRVIDPR
43	NS3-43	FKADRVIDPRRCLKPVILTD
44	NS3-44	RCLKPVILTDGPERVILAGP
45	NS3-45	GPERVILAGPMPVTAASAAQ
46	NS3-46	MPVTAASAAQRRGRIGRNHK
47	NS3-47	RRGRIGRNHKKENDQYIYMG
48	NS3-48	KENDQYIYMGQPLNNDDEDHA
49	NS3-49	QPLNNDDEDHAHWTEAKMLLD
50	NS3-50	HWTEAKMLLDNINTPEGIIP
51	NS3-51	NINTPEGIIPALFTPEGIIP
52	NS3-52	ALFTPEGIIPSMFTPEGIIP
53	NS3-53	SMFTPEGIIPTLFTPEGIIP
54	NS3-54	TLFTPEGIIPSLEPEREKSA
55	NS3-55	SLEPEREKSAIDGEYRLRG
56	NS3-56	AIDGEYRLRGEARKTFVELG
57	NS3-57	EARKTFVELGEARKTFVDLG
58	NS3-58	EARKTFVDLGEQRKTFVELM
59	NS3-59	EQRKTFVELMRRGDLPVWLS
60	NS3-60	RRGDLPVWLSYKVASAGFQY
61	NS3-61	YKVASAGFQYKDREWCFDGE
62	NS3-62	KDREWCFDGERNNQILEENM
63	NS3-63	RNNQILEENMDVEIWTKEGE
64	NS3-64	DVEIWTKEGEKKKLRPRWLD
65	NS3-65	KKKLRPRWLDARTYADPLAL
66	NS3-66	ARTYADPLALKEFKDFAAGR
67	NS3-67	KEFKDFAAGRKSIAATEIGRV
68	NS3-68	KSIAATEIGRVPSHLAHRTRA
69	NS3-69	PSHLAHRTRAYQHAELELPE
70	NS3-70	YQHAELELPETLETLLLLAL
71	NS4-1	TLETLLLLALLGAFLFFLSG
72	NS4-2	LGAFLLFLLSGKGIGKMSIGL
73	NS4-3	KGIGKMSIGLCCIIAASLLW
74	NS4-4	CCIIAASLLWMAEIQPHWIA
75	NS4-5	MAEIQPHWIAASIILEFFLM
76	NS4-6	ASIILEFFLMVLLIPEPEKQ
77	NS4-7	VLLIPEPEKQRTPODNQLAY
78	NS4-8	RTPQDNQLAYVVIGILTLAA
79	NS4-9	VVIGILTLAAIAANEMGLL
80	NS4-10	AIAANEMGLLETTKKDLGIG



81	NS4-11	ETTKKDLGIGHVAPTALDV
82	NS4-12	HVAPTALDVDLHPASAWTL
83	NS4-13	DLHPASAWTLYAVATTIITP
84	NS4-14	YAVATTIITPMLRHTIENST
85	NS4-15	MLRHTIENSTANVSLTAIAN
86	NS4-16	ANVSLTAIANQAAVLMIANQ
87	NS4-17	QAAVLMIANQATVLMGLDKG
88	NS4-18	ATVLMGLDKGWPISKMDLGV
89	NS4-19	WPISKMDLGVPLLALGCYSQ
90	NS4-20	PLLALGCYSQVNPLTLTAAV
91	NS4-21	VNPLTLTAAVLLLITHYAI
92	NS4-22	LLLITHYAIIGPGLQAKATR
93	NS4-23	GPGLQAKATREAQKRTAAGI
94	NS4-24	EAQKRTAAGIMKNPTVDGIM
95	NS4-25	MKNPTVDGIMAILDPIPYD
96	NS4-26	AIDLPIPYDPKFEKQLGQV
97	NS4-27	PKFEKQLGQVMLLILCVSQI
98	NS4-28	MLLILCVSQILLMRTTWAVL
99	NS4-29	LLMRTTWAVLLMRTTWALCE
100	NS4-30	LMRTTWALCEALTLATGPIT
101	NS4-31	ALTLATGPITTLWEGNPGKF
102	NS4-32	TLWEGNPGKFWNTTIAVSMA
103	NS4-33	WNTTIAVS MANIFRGSYLAG
104	NS4-34	NIFRGSYLAGAGLAFSLIKN
105	NS4-35	AGLAFSLIKNRRGTGAQGET
106	NS4-36	RRGTGAQGETLGEKWKRQLN
107	NS4-37	LGEKWKRQLNQLDKSEFEEY
108	NS4-38	QLDKSEFEEYKKS GILEVDR
109	NS4-39	KKSGILEVDRTEAKEAIKRG
110	NS4-40	TEAKEAIKRGETDHHAVSRG
111	NS5-1	ETDHHAVSRGSAKLRWFVER
112	NS5-2	SAKLRWFVERN MVIPEGRVI
113	NS5-3	NMVIPEGRVIDLGCGRGGWS
114	NS5-4	DLGCGRGGWSYYCAGLKKVR
115	NS5-5	YYCAGLKKVREVRGYTKGGP
116	NS5-6	EVRGYTKGGPGHEEPIPMAT
117	NS5-7	GHEEPIPMATYGWNLVKLHS
118	NS5-8	YGWNLVKLHSGVDVFFPEKC
119	NS5-9	GVDVFFPEKCDTLLCDIGES
120	NS5-10	DTLLCDIGESSPNPTIEEGR
121	NS5-11	SPNPTIEEGRTLRLVLMVEP
122	NS5-12	TLRLVLMVEPW LKGNQFCIK
123	NS5-13	WLKGNQFCIKILNPYMPSVI

124	NS5-14	ILNPYMPSVIEELEKLQRKH
125	NS5-15	EELEKLQRKHGGMLVRNPLS
126	NS5-16	GGMLVRNPLSRNSTHEMYWV
127	NS5-17	RNSTHEMYWVSNGTGNIVSA
128	NS5-18	SNGTGNIVSAVNMISRMLIN
129	NS5-19	VNMISRMLINRFTMAHKKPT
130	NS5-20	RFTMAHKKPTYERDVDLGAG
131	NS5-21	YERDVDLGAGSTWHYDEDNP
132	NS5-22	STWHYDEDNPYKTWAYHGSY
133	NS5-23	YKTWAYHGSYEVKATGSASS
134	NS5-24	EVKATGSASSMVNGVVKLLT
135	NS5-25	MVNGVVKLLTKPWDVVPMT
136	NS5-26	KPWDVVPMTQMAMTDTPF
137	NS5-27	QMAMTDTPFGQQRVFKEKV
138	NS5-28	GQQRVFKEKVDTRTPEAKEN
139	NS5-29	DTRTPEAKENAAIGAVFQDE
140	NS5-30	AAIGAVFQDENGWKSAREAV
141	NS5-31	NGWKSAREAVEDSERALHLE
142	NS5-32	EDSERALHLEGKCESCVYNM
143	NS5-33	GKCESCVYNMMGKREKKLGE
144	NS5-34	MGKREKKLGEFGKAKGSRAI
145	NS5-35	FGKAKGSRAIWYMWLGARFL
146	NS5-36	WYMWLGARFLEFEALGFLNE
147	NS5-37	EFEALGFLNEDHWFSRENSL
148	NS5-38	DHWFSRENSLSGVEGEGHLK
149	NS5-39	SGVEGEGHLKLG YILRDISK
150	NS5-40	LG YILRDISKIPGGAMYADD
151	NS5-41	IPGGAMYADDTAGWDTRITE
152	NS5-42	TAGWDTRITEDDLHNEEKIL
153	NS5-43	DDLHNEEKILAKAIFKLTYQ
154	NS5-44	AKAIFKLTYQNKVVKVQRPT
155	NS5-45	NKVVKVQRPTPRGAVMDIIS
156	NS5-46	PRGAVMDIISRKDQRGSGQV
157	NS5-47	RKDQRGSGQVGTYGLNTFTN
158	NS5-48	GTYGLNTFTNMEAQLIRQME
159	NS5-49	MEAQLIRQMEAEGVITECGV
160	NS5-50	AEGVITECGVDRLKRMAISG
161	NS5-51	DRLKRMAISGDDCVVKPPQW
162	NS5-52	DDCVVKPPQWEPKSGWHDWQ
163	NS5-53	EPKSGWHDWQQVPFCSHHFH
164	NS5-54	QVPFCSHHFHEIFMKDGRKL
165	NS5-55	EIFMKDGRKLVVPCRNQDEL
166	NS5-56	VVPCRNQDELIGRARISQGA

<b>167</b>	NS5-57	IGRARISQGAGWSLREACL
<b>168</b>	NS5-58	GWSLREACLGKSYAQMWQL
<b>169</b>	NS5-59	GKSYAQMWQLMYFHRRDLRL
<b>170</b>	NS5-60	MYFHRRDLRLASNAICSAVP
<b>171</b>	NS5-61	ASNAICSAVPSHWVPTSRTT
<b>172</b>	NS5-62	SHWVPTSRTTWSIHAHHEWM
<b>173</b>	NS5-63	WSIHAHHEWMTTEDMLAVWN
<b>174</b>	NS5-64	TTEDMLAVWNRVWIEENPWM
<b>175</b>	NS5-65	RVWIEENPW MEDKTHIHSWE
<b>176</b>	NS5-66	EDKTHIHSWEDVPYLGKRED
<b>177</b>	NS5-67	DVPYLGKREDQWCGSLIGLT
<b>178</b>	NS5-68	QWCGSLIGLTSRATWAKNI
<b>179</b>	NS5-69	DQWCGSLIGLTSRATWAKNI

## ANEXO IV

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA (2016-2019)



Article

## Identification of B-Cell Epitopes with Potential to Serologically Discriminate Dengue from Zika Infections

Alice F. Versiani <sup>1,2</sup>, Raissa Prado Rocha <sup>1</sup>, Tiago A. O. Mendes <sup>3</sup>, Glauco C. Pereira <sup>4</sup>, Jordana Graziella A. Coelho dos Reis <sup>1</sup>, Daniella C. Bartholomeu <sup>3</sup> and Flávio G. da Fonseca <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; afversiani@gmail.com (A.F.V.); raissa.biotec@gmail.com (R.P.R.); reisjordana@gmail.com (J.G.A.C.d.R.)

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Virologia, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto 15090-000, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; tiagomgmdes@yahoo.com.br (T.A.O.M.); daniellaufmg@gmail.com (D.C.B.)

<sup>4</sup> Fundação Ezequiel Dias, FUNED, Belo Horizonte 30510-010, Brazil; glaiconep@gmail.com

\* Correspondence: fdafonseca@icb.ufmg.br; Tel.: +55-31-3409-2746

Received: 24 October 2019; Accepted: 15 November 2019; Published: 19 November 2019



**Abstract:** Dengue is currently one of the most important arbovirus infections worldwide. Early diagnosis is important for disease outcome, particularly for those afflicted with the severe forms of infection. The goal of this work was to identify conserved and polymorphic linear B-cell Dengue virus (DENV) epitopes that could be used for diagnostic purposes. To this end, we aligned the predicted viral proteome of the four DENV serotype and performed *in silico* B-cell epitope mapping. We developed a script in Perl integrating alignment and prediction information to identify potential serotype-specific epitopes. We excluded epitopes that were similarly present in the yellow fever and zika viruses' proteomes. A total of 15 polymorphic and nine conserved peptides among DENV serotypes were selected. Peptides were spotted on cellulose membranes and tested against sera from rabbits that were monoinfected with each DENV serotype. Although serotype-specific peptides failed to recognize any sera, three conserved peptides were recognized by all anti-dengue sera and were included on an ELISA test employing a well-characterized human sera bank. Of the three peptides, one was able to efficiently identify sera from all four DENV serotypes and to discriminate them from Zika virus positive sera.

**Keywords:** dengue diagnose; Zika; peptides; epitopes; pepELISA

### 1. Introduction

Dengue is currently considered as one of the most important arbovirus' infections in the world. Almost half of the world's population-or 3.9 billion people in 128 countries-live in areas where there is a considerable risk of Dengue virus (DENV) transmission [1,2]. Estimates show that 390 million people are infected annually, of which about 96 million result in infections ranging from minimally symptomatic to severe [3].

Dengue viruses are transmitted through the bite of the female mosquito of the species *Aedes aegypti* or other species within the *Aedes* genus [4]. The viruses belong to the Flaviviridae family-Flavivirus genus-and there are four DENV serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4), which are genetically and antigenically related [5]. Thus, an infection with a single serotype leads to long-lasting



# Different DNA methylation profile is demonstrated in paracoccidioidomycosis patients without oral lesions

Paola Singi<sup>1</sup> | Raissa P. Rocha<sup>2</sup> | Marina L. de Carli<sup>1</sup> | João Adolfo C. Hanemann<sup>1</sup> |  
Alessandro A. C. Pereira<sup>3</sup> | Luiz Felipe L. Coelho<sup>4</sup> | Luiz Cosme C. Malaquias<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Department of Clinic and Surgery, School of Dentistry, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

<sup>2</sup>Graduate Program in Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>3</sup>Department of Pathology and Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

<sup>4</sup>Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

#### Correspondence

Luiz Cosme C. Malaquias, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, Zip code: 37130-001, Alfenas, MG, Brazil.  
Email: luizcosme@hotmail.com

#### Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: 001

#### Summary

**Background:** Paracoccidioidomycosis (PCM) is a neglected fungal infection with a high impact on the quality of life of the affected patients. The disease presents primary pulmonary involvement and systemic dissemination may occur. About 50% of the cases show oral involvement, and the factors that lead to this manifestation are not clear.

**Objectives:** The aim of this study was to evaluate the DNA methylation profile in PCM patients with oral lesions.

**Material and Methods:** Genomic DNA was extracted from whole blood of eighteen PCM patients, being ten with oral lesions and eight with no oral lesion. Analysis of methylation profile was performed using the technique of methylation-sensitive arbitrarily primed PCR (MS-AP-PCR). The sequences of recombinant plasmids obtained were evaluated according to parameters that define a CpG island, as well as their relative position in the known human genome genes and/or CpG islands.

**Results:** After DNA amplification, three different expressed bands were observed between the two groups, being found in the samples of patients with no oral manifestations. The cloned fragment in the plasmid showed similarity with a DNA sequence present in chromosome 20, next to the YTHDF1 gene. Other bands showed homology with intronic region in the genes RBPMS2 and DPH6 and no CpG island was identified.

**Conclusions:** DNA methylation was found in PCM patients with no oral lesion affecting the YTHDF1 gene. Further studies are necessary to elucidate to role of YTHDF1 gene in the oral PCM manifestations.

#### KEYWORDS

DNA methylation, oral manifestations, paracoccidioidomycosis

## 1 | INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a neglected infectious disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and/or *Paracoccidioides lutzii*, being one of the most important systemic mycosis in South America.<sup>1-4</sup> The disease has primary pulmonary involvement and may spread to the skin, reticuloendothelial system, adrenal glands and oral mucosa.<sup>5</sup> About 30% to 50% of the chronic PCM patients exhibit oral manifestations, characterised by

erythematous granular ulcers with haemorrhagic dots that is called moriform stomatitis involving mainly hard and soft palate, buccal, labial and gingival mucosa, or severe periodontal bone loss.<sup>6,7</sup> Oral PCM manifestations favour the recognition of the disease and make possible the diagnosis through incisional biopsy.<sup>8</sup>

Interestingly, the clinical variability of chronic PCM, which accounts for 90% of the cases,<sup>9</sup> may be related to special mechanisms regulating gene expression involved in many physiological and pathological situations.<sup>10,11</sup> Some changes in gene expression are



## Bovine serum albumin nanoparticles induce histopathological changes and inflammatory cell recruitment in the skin of treated mice



Natalia Ingrid Oliveira da Silva<sup>a</sup>, Ezequiel Aparecido Salvador<sup>a</sup>, Isabella Rodrigues Franco<sup>a</sup>, Gabriel Augusto Pires de Souza<sup>a</sup>, Stella Maria de Souza Moraes<sup>a</sup>, Raissa Prado Rocha<sup>a</sup>, Rômulo Dias Novaes<sup>b</sup>, Patrícia Paiva Corsetti<sup>a,c</sup>, Luiz Cosme Cotta Malaquias<sup>a</sup>, Luiz Felipe Leomil Coelho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biomedical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Federal University of Alfenas, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Biomedical Sciences, Department Structural Biology, Federal University of Alfenas, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> University Jose Rosário Vellano, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Albumin  
Nanoparticles  
Skin inflammation  
Immunization

### ABSTRACT

Albumin is a natural, biocompatible, biodegradable and nontoxic polymer and due to these features, nanoparticles made of albumin are a good system for drug or antigen delivery. Polymeric nanoparticles are being widely explored as new vaccine platforms due to the capacity of those nanoparticles to prime the immune system by providing sustained release of the antigen after injection. Biodegradable nanoparticles associated with proteins represent a promising method for *in vivo* delivery of vaccines. In our previous studies, bovine serum albumin nanoparticles (BSA-NPs) were identified as a promising system for *in vivo* delivery of microbial antigens. The aim of this work was to show the effect of BSA-NPs on skin after nanoparticles administration. The pro-inflammatory activity of BSA-NPs was evaluated using *in vivo* models. BSA-NPs are easily uptake by macrophagic RAW 264.7 and BHK-21 cells without any significant cytotoxicity. Histological examination of skin sections from BSA-NPs-treated mice revealed intense cellular infiltration, increased skin thickness, follicular hypertrophy, vascular congestion and marked collagenesis. Mice immunized with recombinant non-structural protein 1 (rNS1) from Dengue virus 1 and BSA-NPs showed a high seroconversion rate if compared to animals immunized only with rNS1. Therefore, the effect of BSA-NPs on skin after BSA-NPs administration has a biotechnological relevance to the rational design of vaccine formulations based on albumin nanocarriers. However in the next years future studies should be carried out to best characterize the effect of BSA-NPs on dendritic cells and establish the role of these nanoparticles as a new vaccine platform for infectious diseases or cancer.

### 1. Introduction

Albumin is a natural nanocarrier that is able to form non-covalent complexes with several natural and synthetic molecules. This protein is also biocompatible, biodegradable and nontoxic and due to these features, albumin based nanocarriers have attracted great attention and could be used for drug or antigen delivery [1,2]. In our previous studies, bovine serum albumin nanoparticles (BSA-NPs) were identified as a promising system for delivery of *Dengue virus* (DENV) and *Pseudomonas aeruginosa* antigens. Mice immunized with BSA-NPs with inactivated DENV adsorbed into their surface elicited a stronger IgG response [3]. In turn, immunization of mice with BSA-NPs with entrapped antigens of *P. aeruginosa* induces strong humoral responses against the

bacteria and is also able to lower the inflammatory signs in lungs caused by nasal infection challenge with these live bacteria [4].

Polymeric nanoparticles based on biodegradable polymers have been widely explored as new vaccine platforms due to their ability to stimulate the immune system and provide sustained antigen release after vaccine administration [5,6]. Nanoparticles could be used as either a delivery system to enhance antigen processing and/or as an immunostimulant adjuvant to activate and potentiates the immunological response. Vaccines based on nanoparticles can be manipulated to optimize the immune response via selective targeting of antigen presenting cells [7,8]. Several works have used nanoparticles as therapeutic vaccines for cancer [9,10], but now this technology is being increasingly explored with a view to treating or preventing conditions

\* Corresponding author at: Laboratório de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro, 700 Centro, Alfenas, Minas Gerais, CEP: 37130-000, Brazil.

E-mail address: [coelho@unifal-mg.edu.br](mailto:coelho@unifal-mg.edu.br) (L.F. Leomil Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.08.106>

Received 17 May 2018; Received in revised form 4 August 2018; Accepted 22 August 2018  
0753-3322/ © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)

## Serum albumin nanoparticles vaccine provides protection against a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge

Stella Maria de Souza Morais<sup>a</sup>, Naiara Ferreira Rodrigues<sup>a</sup>, Natalia Ingrid Oliveira da Silva<sup>a</sup>, Ezequiel Aparecido Salvador<sup>a</sup>, Isabella Rodrigues Franco<sup>a</sup>, Gabriel Augusto Pires de Souza<sup>a</sup>, Pedro Henrique Cruvinel da Silva<sup>a</sup>, Luiz Gustavo Nogueira de Almeida<sup>a</sup>, Raissa Prado Rocha<sup>a</sup>, Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira<sup>b</sup>, Gustavo Portela Ferreira<sup>b</sup>, Patrick Veras Quelemes<sup>b</sup>, Matheus Pereira de Araújo<sup>c</sup>, Felipe Fornias Sperandio<sup>c</sup>, Lorena Júnia de Souza Santos<sup>d</sup>, Olindo Assis Martins Filho<sup>d</sup>, Luiz Cosme Cotta Malaquias<sup>a</sup>, Luiz Felipe Leomil Coelho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Biomedical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Federal University of Alfenas, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Federal University of Piauí, Minister Reis Velloso Campus, Laboratory of Biochemistry and Biology of Microorganisms and Plants (BOMIC), Piauí, Brazil

<sup>c</sup>Institute of Biomedical Sciences, Department of Pathology and Parasitology, Federal University of Alfenas, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup>René Rachou Research Center, FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 April 2018  
Received in revised form 18 August 2018  
Accepted 29 August 2018  
Available online xxx

#### Keywords:

*Pseudomonas aeruginosa*  
Nanoparticles  
Bovine Serum Albumin  
Vaccine

### ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes severe infections in immunocompromised individuals and in patients with cystic fibrosis. A range of vaccines to prevent infections caused by *P. aeruginosa* has already been tested, yet no vaccine against this pathogen is currently available. The goal of this study was to evaluate the potential of bovine serum albumin nanoparticles (BSA-NPs) associated with total *P. aeruginosa* ATCC 27853 antigens in inducing protection against the infection with virulent *P. aeruginosa* PA14 strain in murine model of nasal infection. Swiss mice were immunized with BSA-NPs associated with total *P. aeruginosa* antigens (NPPa) or empty NPs (NPe). As positive and negative control, groups of animals were immunized with total antigens of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and phosphate buffered saline, respectively. Immunized mice were infected via nasal route using *P. aeruginosa* PA14 strain. The survival after 48 h was evaluated and the lungs from animals were processed for quantification of bacterial load, cytokine expression and histopathological analysis. After infection with *P. aeruginosa* PA14, animals immunized with NPPa had the highest survival rate, the lowest bacterial lung load, a controlled production of cytokines and few histopathological changes. These results indicate that NPPa immunization protected mice from infection, contributing for the elimination of the bacteria from the lungs, which consequently reflected the survival of the animals. Therefore, this vaccine was able to induce a functional response in an animal model of lethal infection and thereby is a promising platform for *P. aeruginosa* vaccines.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative, extracellular, rod-shaped bacterium that is able to colonize and infect different hosts, such as animals, insects, plants and nematodes [1]. *P. aeruginosa* is widely distributed in nature and can be found in soil and water, as

well as in the intestinal and human skin microbiota [2]. It can also be isolated from abiotic environments, such as surfaces in medical facilities and hospital equipment [3,4].

*P. aeruginosa* is considered an opportunistic pathogen, affecting mainly patients with severe burns, acquired immunodeficiency syndrome, malignancy, neutropenia, and cystic fibrosis (CF) [5–8]. *P. aeruginosa* is an important nosocomial pathogen capable to infect hospitalized patients, mainly those with immunocompromising conditions. Therefore, *P. aeruginosa* is responsible for severe healthcare-associated infections [6,8,9]. Infections caused by this bacteria are difficult to treat and eradicate due to their intrinsic

\* Corresponding author at: Laboratório de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro, 700 Centro, Alfenas, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: [luiz.coelho@unifal-mg.edu.br](mailto:luiz.coelho@unifal-mg.edu.br) (L. Felipe Leomil Coelho).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.070>  
0264-410X/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Maria de Souza Morais S et al. Serum albumin nanoparticles vaccine provides protection against a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge. Vaccine (2018), <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.070>



## The Virulence of Different Vaccinia Virus Strains Is Directly Proportional to Their Ability To Downmodulate Specific Cell-Mediated Immune Compartments *In Vivo*

Lorena F. D. de Freitas,<sup>a</sup> Rafael P. Oliveira,<sup>b</sup> Mariana C. G. Miranda,<sup>c</sup> Raissa P. Rocha,<sup>a</sup> Edel F. Barbosa-Stancioli,<sup>a</sup> Ana Maria C. Faria,<sup>c</sup> Flávio G. da Fonseca<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup>Instituto Federal do Paraná, Palmas, PR, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

**ABSTRACT** Vaccinia virus (VACV) is a notorious virus for a number of scientific reasons; however, most of its notoriety comes from the fact that it was used as a vaccine against smallpox, being ultimately responsible for the eradication of that disease. Nonetheless, many different vaccinia virus strains have been obtained over the years; some are suitable to be used as vaccines, whereas others are virulent and unsuitable for this purpose. Interestingly, different vaccinia virus strains elicit different immune responses *in vivo*, and this is a direct result of the genomic differences among strains. In order to evaluate the net result of virus-encoded immune evasion strategies of vaccinia viruses, we compared antiviral immune responses in mice intranasally infected by the highly attenuated and nonreplicative MVA strain, the attenuated and replicative Lister strain, or the virulent WR strain. Overall, cell responses elicited upon WR infections are downmodulated compared to those elicited by MVA and Lister infections, especially in determined cell compartments such as macrophages/monocytes and CD4<sup>+</sup> T cells. CD4<sup>+</sup> T cells are not only diminished in WR-infected mice but also less activated, as evaluated by the expression of costimulatory molecules such as CD25, CD212, and CD28 and by the production of cytokines, including tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), interleukin-4 (IL-4), and IL-10. On the other hand, MVA infections are able to induce strong T-cell responses in mice, whereas Lister infections consistently induced responses that were intermediary between those induced by WR and MVA. Together, our results support a model in which the virulence of a VACV strain is proportional to its potential to downmodulate the host's immune responses.

**IMPORTANCE** Vaccinia virus was used as vaccine against smallpox and was instrumental in the successful eradication of that disease. Although smallpox vaccination is no longer in place in the overall population, the use of vaccinia virus in the development of viral vector-based vaccines has become popular. Nonetheless, different vaccinia virus strains are known and induce different immune responses. To look into this, we compared immune responses triggered by mouse infections with the nonreplicative MVA strain, the attenuated Lister strain, or the virulent WR strain. We observed that the WR strain was capable of downmodulating mouse cell responses, whereas the highly attenuated MVA strain induced high levels of cell-mediated immunity. Infections by the intermediately attenuated Lister strain induced cell responses that were intermediary between those induced by WR and MVA. We propose that the virulence of a vaccinia virus strain is directly proportional to its ability to downmodulate specific compartments of antiviral cell responses.

**Citation** de Freitas LFD, Oliveira RP, Miranda MCG, Rocha RP, Barbosa-Stancioli EF, Faria AMC, da Fonseca FG. 2019. The virulence of different vaccinia virus strains is directly proportional to their ability to downmodulate specific cell-mediated immune compartments *in vivo*. *J Virol* 93:e02191-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02191-18>.

**Editor** Rozanne M. Sandri-Goldin, University of California, Irvine

**Copyright** © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.  
Address correspondence to Flávio G. da Fonseca, [fdafonseca@icb.ufmg.br](mailto:fdafonseca@icb.ufmg.br).

**Received** 7 December 2018

**Accepted** 11 December 2018

**Accepted manuscript posted online** 19 December 2018

**Published** 5 March 2019





## Genetics and Molecular Microbiology

## Phylogenetic analysis of Dengue virus 1 isolated from South Minas Gerais, Brazil



Betania Paiva Drumond<sup>a,♦</sup>, Luiz Gustavo da Silva Fagundes<sup>b,♦</sup>, Raissa Prado Rocha<sup>b</sup>,  
 Marcilio Jorge Fumagalli<sup>b</sup>, Carlos Shigueru Araki<sup>c</sup>, Tatiana Elisa Colombo<sup>c</sup>,  
 Mauricio Lacerda Nogueira<sup>c</sup>, Thiago Elias Castilho<sup>d</sup>, Nelson José Freitas da Silveira<sup>d</sup>,  
 Luiz Cosme Cotta Malaquias<sup>a</sup>, Luiz Felipe Leomil Coelho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Pesquisas Em Virologia, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Bioinformática, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 October 2014

Accepted 24 July 2015

Associate Editor: João Pessoa Araújo Junior

## Keywords:

Dengue virus-1

Alfenas

Minas Gerais

Phylogenetic analysis

## ABSTRACT

Dengue is a major worldwide public health problem, especially in the tropical and subtropical regions of the world. Primary infection with a single *Dengue virus* serotype causes a mild, self-limiting febrile illness called dengue fever. However, a subset of patients who experience secondary infection with a different serotype can progress to a more severe form of the disease, called dengue hemorrhagic fever. The four *Dengue virus* serotypes (1–4) are antigenically and genetically distinct and each serotype is composed of multiple genotypes. In this study we isolated one *Dengue virus* 1 serotype, named BR/Alfenas/2012, from a patient with dengue hemorrhagic fever in Alfenas, South Minas Gerais, Brazil and molecular identification was performed based on the analysis of NS5 gene. Swiss mice were infected with this isolate to verify its potential to induce histopathological alterations characteristic of dengue. Liver histopathological analysis of infected animals showed the presence of inflammatory infiltrates, hepatic steatosis, as well as edema, hemorrhage and necrosis focal points. Phylogenetic and evolutionary analyses based on the envelope gene provided evidence that the isolate BR/Alfenas/2012 belongs to genotype V, lineage I and it is probably derived from isolates of Rio de Janeiro, Brazil. The isolate BR/Alfenas/2012 showed two unique amino acids substitutions (SER222THRE and PHE306SER) when compared to other Brazilian isolates from the same genotype/lineage. Molecular models were generated for the envelope protein indicating that the amino acid alteration PHE 306 SER could contribute to a different folding in

\* Corresponding author at: Laboratório de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro, 700 Centro, Alfenas, Minas Gerais, CEP 37130-000, Brazil.

E-mail: [coelho@unifal-mg.edu.br](mailto:coelho@unifal-mg.edu.br) (L.F.L. Coelho).

♦ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjmicrobiol.2015.11.016>

1517–8382/© 2015 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Demethylation Profile of the TNF- $\alpha$ Promoter Gene Is Associated With High Expression of This Cytokine in *Dengue virus* Patients

Alessandra Vilas Boas Terra Gomes,<sup>1</sup> Stella Maria de Souza Morais,<sup>1</sup> Sergio Luiz Menezes-Filho,<sup>1</sup> Luiz Gustavo Nogueira de Almeida,<sup>1</sup> Raissa Prado Rocha,<sup>1</sup> Jaqueline Maria Siqueira Ferreira,<sup>2</sup> Luciana Lara dos Santos,<sup>2</sup> Luiz Cosme Cotta Malaquias,<sup>1</sup> and Luiz Felipe Leomil Coelho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil  
<sup>2</sup>Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João Del-Rei, Divinópolis, Brazil

Dengue is the most prevalent arthropod-borne viral illness in humans. The overexpression of cytokines by *Dengue virus* (DENV) infected cells is associated with the most severe forms of the disease. Unmethylated CpG islands are related to a transcriptionally active structure, whereas methylated DNA recruits methyl-binding proteins that inhibit gene expression. Several studies have described the importance of epigenetic events in the regulation and expression of many cytokines. The purpose of the present study was to evaluate the methylation status of the IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  promoters in DNA extracted from dengue infected patients using methylation-specific polymerase chain reaction. A high frequency of demethylation was observed in the TNF- $\alpha$  promoter of DENV infected patients when compared to non-infected controls. The patients with an unmethylated profile showed higher expression of TNF- $\alpha$  mRNA than patients with the methylated status. No difference was found in the methylation frequency between the two analyzed groups regarding the IFN- $\gamma$  promoter or in the expression of IFN- $\gamma$  transcripts. The present study provides the first association of TNF- $\alpha$  promoter demethylation in DENV infected individuals and demonstrates a correlation between the methylation status of the region analyzed and the expression of TNF- $\alpha$  transcripts in DENV infected patients. *J. Med. Virol.* **88**: 1297–1302, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

**KEY WORDS:** *Dengue virus*; DNA methylation; promoter; IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$

### INTRODUCTION

*Dengue virus* (DENV) is an arbovirus transmitted to humans through the bite of infected *Aedes aegypti* female mosquitoes. Dengue is endemic in several

countries and almost half of the world's population lives in risk areas of dengue [Guzman and Harris, 2015]. DENV is a positive single strand RNA virus that belongs to the family Flaviviridae, genus *Flavivirus*. After infection, the patient may develop a mild, self-limiting febrile illness called Dengue Fever or a more severe clinical manifestation, known as Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS) [Halstead, 2007; Ranjit and Kisson, 2011].

These forms of the disease are characterized by spontaneous bleeding and plasma leakage after excessive immune activation of T cells and macrophages, which produce several cytokines in large quantities, which in turn can increase vascular permeability and cause endothelial dysfunction [Friberg et al., 2011; Malavige and Ogg, 2013; Guzman and Harris, 2015]. The cytokines involved in dengue pathogenesis are pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis alpha (TNF- $\alpha$ ) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). The high reactivity to DENV infection could be attributed to cross-reactive T cells that produce high concentrations of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , in a secondary infection caused by a heterologous serotype [Friberg et al., 2011; Malavige and Ogg, 2013].

DNA methylation is an epigenetic control mechanism of gene expression characterized by the addition of a methyl group to a cytosine within cytosine-phosphate-guanine islands. Unmethylated

Grant sponsor: CNPq; Grant numbers: 475940/2011-3; 404005/2012-8

\*Correspondence to: Luiz Felipe Leomil Coelho, Laboratório de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro, 700 Centro, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, CEP: 37130-000. E-mail: coelho@unifal-mg.edu.br

Accepted 19 January 2016

DOI 10.1002/jmv.24478

Published online 2 February 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).



## New Eugenol Glucoside-based Derivative Shows Fungistatic and Fungicidal Activity against Opportunistic *Candida glabrata*

Thiago Belarmino de Souza<sup>1</sup>, Keila Mercês de Oliveira Brito<sup>2</sup>, Naiara Chaves Silva<sup>3</sup>, Raissa Prado Rocha<sup>3</sup>, Grasiely Faria de Sousa<sup>4</sup>, Lucienir Pains Duarte<sup>4</sup>, Luiz Felipe Leomil Coelho<sup>3</sup>, Amanda Latércia Tranches Dias<sup>3</sup>, Marcia Paranho Veloso<sup>5</sup>, Diogo Teixeira Carvalho<sup>5</sup> and Danielle Ferreira Dias<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas, Brazil

<sup>2</sup>Centro Universitário de Lavras, Rua Padre José Poggel, 506 Lavras, Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Belo Horizonte, Brazil

<sup>5</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas, Brazil

\*Corresponding author: Danielle Ferreira Dias, daniferdias@gmail.com

A new series of glucosides modified in their saccharide units were synthesized, evaluated against *Candida* sp., and compared to prototype 1, an eugenol tetraacetyl glucoside previously synthesized and shown to be active against *Candida glabrata*. Among the new glucosides, benzyl derivative 5 was the most promising, showing fungistatic activity at  $IC_{50}$  18.1  $\mu$ M against *Candida glabrata* (threefold higher than fluconazole) and fungicidal activity with a low  $IC_{90}$  value of 36.2  $\mu$ M. Moreover, the cytotoxic activity of compound 5 ( $CC_{50}$ : 580.9  $\mu$ M), tested in peripheral blood mononuclear cells, suggests its potential as an agent to treat *Candida glabrata* infections, with a selectivity index of 32. The new eugenol glucoside 5 may be considered as a novel structural pattern in the development of new anti-*Candida* drugs.

**Key words:** antifungal activity, *Candida glabrata*, eugenol, glucosides

Received 10 June 2015, revised 9 July 2015 and accepted for publication 22 July 2015

Natural products represent an invaluable source of new bioactive entities. They may be used as found in living

organisms, such as plants and micro-organisms, or most of the time, they can be submitted to chemical modification to enhance potency, modify physicochemical properties, or reduce toxicity. Among these natural products, the essential oils and their components have received special attention in the medicinal chemistry field. Clove essential oil has been used since ancient times for its multiple medicinal and agrochemical activities. Many of these actions were attributed to eugenol, the major constituent. Some authors have validated the biological activities of eugenol such as antimicrobial (1,2), antiprotozoarial (3), antioxidant (4), anti-inflammatory (5,6), anti-carcinogenic (7), and anticonvulsant activity (8). Other works describe the semi-synthesis of eugenol derivatives and their wide biological potential as antibacterial, antifungal and antiviral agents (8–10).

Recently, our research team has described the synthesis and antifungal evaluation of a series of eugenol Mannich bases and it was discovered that some of them had good *in vitro* antifungal activity against *Candida* sp. (9). Moreover, in another work of the same group (10), the synthesis of eugenol glycosides was reported along with the potential of the eugenol peracetyl glucoside (**1**, Figure 1) against *Candida* species. One of these results was quite interesting as **1** was shown to be more active ( $IC_{50}$  3.8  $\mu$ M) than the standard drug (fluconazole) against *Candida glabrata*, an opportunistic pathogen in many immunocompromised patients.

Following our continuous interest in employing eugenol as a lead substance for derivatization and in view of these recent findings, we were encouraged to prepare a set of glucoside **1** derivatives to check the structural exigencies of the saccharide unit and to try to enhance its antifungal potential.

### Experimental

#### Physical measurements

Melting point of the compounds was determined on Microquímica MOAs 301 apparatus and was uncorrected. IR spectroscopy was performed by a FTIR-Affinity-1 spectrometer (Shimadzu). <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra were obtained on Bruker AC-300 spectrometer (300 MHz