

BÁRBARA RESENDE QUINAN

**Construção, Avaliação da Imunogenicidade e
Potencial Protetor em Modelo Murino, de
Diferentes Construções do *Vaccinia virus*
Ankara Modificado (MVA) Expressando a
Proteína E de *Dengue virus* Sorotipo 3**

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte, fevereiro de 2014**

BÁRBARA RESENDE QUINAN

**Construção, Avaliação da Imunogenicidade e
Potencial Protetor em Modelo Murino, de
Diferentes Construções do *Vaccinia virus*
Ankara Modificado (MVA) Expressando a
Proteína E de *Dengue virus* Sorotipo 3**

Tese apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Co-orientadores: Prof. David Carl Tscharke

Dra. Fabiana Magalhães Coelho

Belo Horizonte, fevereiro de 2014

"Mas na profissão, além de amar tem de saber.

E o saber leva tempo pra crescer."

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Uma parte dessa longa caminhada pelo saber chega ao fim e com ela a certeza de que só foi possível por causa das numerosas contribuições, tanto científicas como pessoais. Contribuições que geraram não somente uma tese, mas a pessoa que sou hoje. Portanto, agradeço e dedico a essas pessoas este volume. Provavelmente, não citarei todos os nomes, pois seria interminável, mas todos aqueles que participaram dessa caminhada tiveram o seu valor.

Inicialmente, agradeço ao Flávio, pelos ensinamentos, confiança, amizade e a oportunidade de desenvolver este trabalho. No início da minha caminhada, quando ainda era uma aluna de iniciação científica e procurava referências sobre o meu futuro orientador, me disseram: “Não basta ter inteligência racional se não houver inteligência emocional e o Flavinho tem os dois!”. Hoje, concordo com tal afirmação e acredito que por isso os ensinamentos ao longo desses anos foram inúmeros e me tornaram não só uma profissional melhor, mas uma pessoa melhor. E apesar dessa etapa que se encerra, espero contar sempre com o seu apoio e os seus ensinamentos!

Agradeço à Fabis, pelas correções, pela grande ajuda com os experimentos, por estar sempre disponível e, acima de tudo, pela amizade e pelo carinho. Como eu senti falta, na Austrália, de alguém tagarelado na mesa ao lado!!

Ao Prof. David Tschärke e ao seu grupo, pela receptividade e pela atenciosa orientação durante o meu estágio no exterior.

Aos membros da banca, pelas sugestões que enriqueceram e enriquecerão este trabalho.

À Prof. Edel Stancioli, pelos ensinamentos e convivência.

Agradeço à Tânia Mara, pelos almoços e lanches, pelas lembranças em cada viagem, pela grande ajuda com os experimentos e pelo apoio incondicional. Mesmo quando longe do laboratório, as suas preocupações continuavam. Obrigada pelo carinho, amizade, por toda essa preocupação de mãe, e, claro, por eu estar na primeira posição das suas listas!

Ao João Rodrigues, pelos protocolos confusos, pelos almoços, pelos artigos enviados sempre nos finais de semana, pela família bastarda (Olga, Nathy, PH e Lupy), pelas guloseimas deixadas na minha mesa, pelos vários “Sua burrinha!!” e “Tu tá virando bolinha!!”, pelas ligações diárias de Skype ou.....por simplesmente fazer parte da minha vida!!

À todos do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, por tornarem o trabalho mais agradável e se tornarem uma segunda família. À Lo, pela amizade, pela ótima companhia em viagens e pelos seus comentários únicos. Ao Mateus, pela amizade e pelos serviços gratuitos de sommelier e de informática. À Elaine pela imensa ajuda com os experimentos.

Ao Laboratório de Vírus, pela colaboração e disponibilização de materiais e equipamentos. Além disso, pelas grandes amizades que foram construídas. Todos foram e são muito importantes para o meu crescimento pessoal e científico.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG), pelo apoio prestado.

Agradeço às “velhas amigas” e à “diretoria” pelos momentos de descontração e diversão, pelo apoio nos momentos difíceis e pela grande amizade.

À minha família, avós, tios, primos e agregados, pelo amor, conforto e descontração.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e FIOCRUZ-PDTIS pelo apoio financeiro.

Ao meu irmão e à minha cunhada, por todo o amor e carinho que uma família pode oferecer. Além disso, por proporcionar uma das maiores alegrias que é ser tia de pequeninos tão lindos como o Tiago e a Maria Clara!

Ao Bruno, pelo amor e companheirismo, mesmo com todas as distâncias que nos foram e são impostas. Essa caminhada tornou-se mais prazerosa quando você se juntou ao meu lado!

Aos meus pais, pelo amor, apoio, por aturarem o meu mau humor em vários momentos, por serem o meu maior exemplo de vida e as pessoas mais importantes.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS **I**

LISTA DE FIGURAS **II**

RESUMO **V**

ABSTRACT **VI**

1. INTRODUÇÃO **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.1 FAMÍLIA *FLAVIVIRIDAE* **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.2 GÊNERO *FLAVIVIRUS* **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.2.1 PARTÍCULA VIRAL E GENOMA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.2.2. GLICOPROTEÍNA DO ENVELOPE (E) **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.2.3 MULTIPLICAÇÃO VIRAL **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3 *DENGUE VIRUS (DENV)* **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3.1 TRANSMISSÃO **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3.2 EPIDEMIOLOGIA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3.3 DENGUE NO BRASIL **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO POR DENV **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3.5 PATOGÊNESE DA FHD **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3.6 TRATAMENTO E PREVENÇÃO **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3.7 VACINAS **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.3.7.1 Vacinas Candidatas **Erro! Indicador não definido.**

1.4 VETORES VIRAIS RECOMBINANTES **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.5 FAMÍLIA *POXVIRIDAE* **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.5.1 UTILIZAÇÃO DOS POXVIRUS COMO VETORES VACINAIS **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.5.2 MVA **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

1.5.2.1 Construção de MVA Recombinantes.	Erro! Indicador não definido.
1.6 RESULTADOS PRÉVIOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3. OBJETIVOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.1 OBJETIVO GERAL	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4. MATERIAL E MÉTODOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.1 ESTRATÉGIA DE TRABALHO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2 CULTIVO DE CÉLULAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2.1 CÉLULAS DE FIBROBLASTO DE EMBRIÃO DE GALINHA (CEF)	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2.2 CÉLULAS BHK21	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.3 AMOSTRAS DE VÍRUS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.3.1 VÍRUS MVA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.3.1.1 Origem	Erro! Indicador não definido.
4.3.1.2 Multiplicação Viral	Erro! Indicador não definido.
4.3.1.3 Purificação Viral	Erro! Indicador não definido.
4.3.1.4 Titulação Viral	Erro! Indicador não definido.
4.3.2 VÍRUS MVA-GFP	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.3.3 DENGUE VIRUS SOROTIPO 3 (DENV-3)	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.3.3.1 Amostra D94.283	Erro! Indicador não definido.
4.3.3.2 Amostra MG20	Erro! Indicador não definido.
4.4 PROTEÍNA RECOMBINANTE E DE DENV-3 (DEN3E)	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.5 PLASMÍDEO pCDNA/HIS-C-INI/FLAG	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6 OBTENÇÃO DOS DIFERENTES GENES E DE DENV-3	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.1 RNA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.2 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

4.6.3 RT-PCR	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.4 CLONAGEM NO PLASMÍDEO PGEM-T EASY	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.5 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.6 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO POR PCR	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.7 OBTENÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.8 SEQUENCIAMENTO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.9 ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQUÊNCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.6.10 MUTAGÊNESE DA SEQUÊNCIA DE KOZAK INTERNA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.7 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.7.1 PLASMÍDEO PLW44	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.7.2 SUBCLONAGEM DOS GENES E NOS PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.7.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.8 CONSTRUÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.8.1 GERAÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.8.2 SELEÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.8.3 AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E TITULAÇÃO VIRAL	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.9 ANÁLISES DOS VÍRUS RECOMBINANTES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.9.1 DETECÇÃO DOS GENES PARA A E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.9.2 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.9.3 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.9.3.1 Western Blot	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.10 IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS CD8⁺ PARA A PROTEÍNA E DE DENV-3	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.10.1 PREDIÇÃO IN SILICO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.10.2 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.10.3 AVALIAÇÃO IN VITRO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.10.3.1 Animais Experimentais	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.10.3.2 Infecção de Camundongos com MVA/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.10.3.3 Infecção de Camundongos com DENV-3	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

4.10.3.4 Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas (ICS) para IFN- γ	Erro! Indicador não definido.
4.11 AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DAS CONSTRUÇÕES MVA/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.11.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR TCD8 ⁺	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.11.1.1 Animais Experimentais	Erro! Indicador não definido.
4.11.1.2 Avaliação da Resposta Aguda - Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas (ICS)	Erro! Indicador não definido.
4.11.1.3 Avaliação da Resposta Aguda - Ensaio de Citotoxicidade In Vivo	Erro! Indicador não definido.
4.11.1.4 Avaliação da Resposta de Memória - Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas (ICS)	Erro! Indicador não definido.
4.11.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.11.2.1 Animais experimentais	Erro! Indicador não definido.
4.11.2.2 Esquema de Imunizações	Erro! Indicador não definido.
4.11.2.3 ELISA	Erro! Indicador não definido.
4.12 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL DE DENV-3 MG20	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.13 AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5. RESULTADOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.1 OBTENÇÃO DOS DIFERENTES GENES E DE DENV-3	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.2 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PGEM-T/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.3 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA PLW44/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PLW44/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.5 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E PELOS PLASMÍDEOS PLW44/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.6 GERAÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.7 DETECÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.8 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS MVA/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.9 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE E PELOS VÍRUS MVA/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.10 IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS CD8⁺ PARA A PROTEÍNA E DE DENV-3	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

5.10.1 AVALIAÇÃO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM MVA/DENV-3E	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.10.2 AVALIAÇÃO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM DENV-3	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.11 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.11.1 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA RESPOSTA CELULAR TCD8 ⁺	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.11.1.1 Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas (ICS) - Resposta Celular TCD8 ⁺ Aguda	Erro! Indicador não definido.
5.11.1.2 Ensaio de Citotoxicidade In Vivo- Resposta Celular TCD8 ⁺ Aguda	Erro! Indicador não definido.
5.11.1.3 Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas (ICS) - Resposta Celular TCD8 ⁺ de Memória	Erro! Indicador não definido.
5.11.2 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.11.2.1 Avaliação em camundongos BALB/c	Erro! Indicador não definido.
5.11.2.2 Avaliação em camundongos C57BL/6	Erro! Indicador não definido.
5.12 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL DE DENV-3 MG20	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.13 AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6. DISCUSSÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
7. CONCLUSÕES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8. PERSPECTIVAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
11. ANEXOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
11.1 ANEXO 1	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
11.2 ANEXO 2	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
12. PUBLICAÇÕES E MANUSCRITOS SUBMETIDOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
12.1 ARTIGO PUBLICADO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
12.2 ARTIGO SUBMETIDO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
12.3 OUTRAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

12.3.1 TRADUÇÃO/LIVRO

ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

12.3.2 ARTIGOS PUBLICADOS

ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Vacinas candidatas em fase clínica de testes.

TABELA 2 – Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificar e modificar o gene E do DENV-3.

TABELA 3 – Combinações de iniciadores utilizados nas construções MVA/DENV-3E.

TABELA 4 – Peptídeos sintéticos utilizados no trabalho.

Tabela 5 – Probabilidade para as possíveis substituições em determinada posição de acordo com o programa SIFT.

Tabela 6 – Relação dos aa toleráveis e não toleráveis de acordo com o programa SIFT.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Classificação dos *Flavivirus*.

FIGURA 2 – Morfologia da partícula viral característica do gênero *Flavivirus*.

FIGURA 3 – Organização do genoma dos membros do gênero *Flavivirus* e esquema do processamento da poliproteína.

FIGURA 4 – Estrutura da proteína E dos *Flavivirus*.

FIGURA 5 – Esquema representativo das partículas virais dos *Flavivirus*.

FIGURA 6 – Partículas maduras irregulares a altas temperaturas (37°C).

FIGURA 7 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos vírus do gênero *Flavivirus*.

FIGURA 8 – Desenho esquemático do ciclo de transmissão do DENV.

FIGURA 9 – Distribuição do mosquito *A. aegypti* nas Américas nos anos de 1930s, 1970 e 2011.

FIGURA 10 – Mapa dos países do mundo sob risco de infecção pelo DENV e o número de infecções anuais.

FIGURA 11 – Nova classificação proposta pela OMS para diagnóstico da Dengue.

FIGURA 12 - Morfologia da partícula viral característica dos *Poxvirus*.

FIGURA 13 – Representação esquemática das características estruturais do genoma dos *Poxvirus*.

FIGURA 14 – Origem da amostra MVA.

FIGURA 15 - Esquema representativo dos diferentes MVA recombinantes construídos.

FIGURA 16 - Esquema representativo da metodologia utilizada.

FIGURA 17 – Representação esquemática da mutação da sequência de Kozak interna, no gene E de DENV-3.

FIGURA 18 – Representação esquemática do plasmídeo pLW44.

FIGURA 19 - Esquema da imunização com os vírus MVA/DENV-3E em camundongos C57BL/6 para avaliação da resposta celular aguda.

FIGURA 20 - Esquema da imunização com os vírus MVA/DENV-3E em camundongos C57BL/6 para avaliação da resposta celular de memória.

FIGURA 21 – Esquema da imunização com os vírus MVA/DENV-3E em camundongos BALB/c ou C57BL/6 para avaliação da resposta humoral.

FIGURA 22 - Amplificação dos cDNAs do gene E.

FIGURA 23 – Alinhamento das sequências de aa da proteína E truncada.

FIGURA 24 – Digestão dos plasmídeos pLW44 e pGEM-T/DENV-3 E1M com as enzimas *SmaI* e *PstI*.

FIGURA 25 – Digestão dos plasmídeos pLW44/DENV-3 E1 com as enzimas *SmaI* e *PstI*.

FIGURA 26 – *Western Blot* para detectar a expressão da proteína E pelos plasmídeos pLW44/DENV-3 E1 e E1M.

FIGURA 27 – *Western Blot* para detectar a expressão da proteína E pelos plasmídeos pLW44/DENV-3 E3, E3M, E4 e E4M utilizando o anticorpo primário anti-Dengue.

FIGURA 28 – Rodadas de seleção e amplificação do vírus recombinante MVA/DENV-3 E3.

FIGURA 29 – Amplificação dos genes E nos vírus recombinantes MVA/DENV-3E.

FIGURA 30 – *Western Blot* para detectar a expressão da proteína E pelos vírus MVA/DENV-3 E3, E3M, E4 e E4M.

FIGURA 31 – Avaliação da imunogenicidade dos epítomos CD8⁺ preditos para os alelos de camundongos BALB/c.

FIGURA 32 – Avaliação da imunogenicidade dos epítomos CD8⁺ preditos para os alelos de camundongos C57BL/6.

FIGURA 33 – Potência antigênica de epítomos previamente selecionados como capazes de estimular uma resposta CD8⁺ DENV-3E específica.

FIGURA 34 – Variantes do peptídeo D3E₄₀₈₋₄₁₉ (KVVQYENLKYTV).

FIGURA 35 – Definição da sequência ótima do peptídeo D3E₄₀₈₋₄₁₉ (KVVQYENLKYTV).

FIGURA 36 – Avaliação da imunogenicidade dos epítomos D3E₂₈₄₋₂₉₂ e D3E₄₀₈₋₄₁₅ no contexto de uma infecção por DENV-3.

FIGURA 37 – Avaliação e comparação da resposta celular TCD8⁺ aguda para as diferentes construções de MVA/DENV-3E.

FIGURA 38 – Células alvo CD45.1⁺ transferidas para animais C57BL/6 previamente imunizados com MVA, MVA/DENV-3 E3 e E4.

FIGURA 39 – Capacidade citotóxica das células TCD8⁺ específicas para epítomos DENV-3E.

FIGURA 40 – Avaliação e comparação da resposta celular TCD8⁺ de memória para as diferentes construções de MVA/DENV-3E.

FIGURA 41 – Avaliação e comparação da resposta humoral, em camundongos BALB/c, para as diferentes construções de MVA/DENV-3E.

FIGURA 42 – Avaliação e comparação da resposta humoral, em camundongos C57BL/6, para as diferentes construções de MVA/DENV-3E.

FIGURA 43 – Determinação da dose letal da amostra DENV-3 MG20.

FIGURA 44 – Avaliação da proteção.

RESUMO

A Dengue é, atualmente, a mais importante doença humana causada por um arbovírus. O vírus da Dengue (DENV) possui quatro sorotipos (DENV 1-4) e estima-se que seja responsável por 390 milhões de infecções por ano em todo o mundo, sendo que dessas, pelo menos 2 milhões resultam nas formas graves da doença. Apesar dos altos números de casos por ano e de, aproximadamente, a metade da população do mundo estar sob-risco de infecção, não existem drogas antivirais para o tratamento da doença e, muito menos, vacinas aprovadas como prevenção. Dentre as técnicas utilizadas para o desenvolvimento de vacinas, a utilização de vetores virais recombinantes baseados no *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) vem se mostrando promissora. Dessa forma, esse trabalho realizou a construção de diversos vírus MVA recombinantes, todos expressando a proteína E de DENV-3, porém com diferentes elementos inseridos nas extremidades do gene exógeno. O objetivo foi avaliar qual desses elementos foi capaz de melhorar a imunogenicidade do vírus recombinante ou a detecção da proteína exógena. Para que a avaliação da resposta celular TCD8⁺ fosse possível, 2 epítomos para a proteína E de DENV-3 em camundongos C57BL/6 foram identificados e descritos. Assim, a avaliação da resposta TCD8⁺ em camundongos imunizados com os diferentes vírus recombinantes demonstrou que os vírus MVA recombinantes que possuem o peptídeo sinal natural da proteína E e, portanto, endereçam essa proteína para o retículo endoplasmático, apresentam uma melhor resposta. Avaliações da resposta humoral também demonstraram que esses vírus contendo essa sequência sinal são capazes de estimular uma produção robusta de anticorpos anti-E, enquanto os vírus sem o peptídeo sinal não induzem nenhuma produção de anticorpos. Além disso, análises de proteção em camundongos C57BL/6 sugerem que a imunização com essa construção mais imunogênica é protetora. Assim, esses resultados demonstram a importância dessa sequência de peptídeo sinal e, no futuro, essa construção mais imunogênica poderá ser utilizada para a construção de MVA recombinantes para os outros sorotipos de DENV. Esses, por sua vez, poderão ser utilizados para a geração de vacinas tetravalentes contra o DENV.

ABSTRACT

Dengue is, currently, the most important human disease caused by an arbovirus. *Dengue virus* (DENV) has four serotypes (DENV 1-4) and is estimated to be responsible for 390 million infections per year worldwide, in which at least 2 million result in severe forms of the disease, Dengue hemorrhagic fever and Dengue shock syndrome (DHF/DSS). Despite the high number of cases per year and the fact that approximately half of the world's population are at risk of for dengue, effective drugs for the disease treatment and vaccines are still not available. Among different strategies used for vaccine development, vectors based on recombinant *Vaccinia* Ankara Modified virus (MVA) shows promise in a number of settings. Thus, in this work, several recombinants of MVA were constructed, all expressing the E protein of DENV-3, but with different elements inserted at the ends of the foreign gene. The ultimate aim was to test which of these modifications would make the most immunogenic vaccine. To enable CD8⁺ T cell responses evaluation, two epitopes in the DENV-3 E protein in C57BL/6 mice were identified and described. Thus, the evaluation of CD8⁺ T cell responses in mice immunized with the different recombinant viruses demonstrated that recombinant MVA viruses holding the natural signal peptide of the E protein and, therefore, addressing this protein into the endoplasmic reticulum, have a better response. Evaluations of the humoral response have also shown that these viruses containing this signal sequence are able to stimulate a robust production of anti-E antibodies, while the virus without the signal peptide does not induce any production of antibodies. Furthermore, analyses of protection in C57BL/6 mice suggest that immunization with this more immunogenic construct is protective. Thus, these results demonstrate the importance of this signal peptide sequence and, in the future, this more immunogenic construction could be used for construction of recombinant MVA to other DENV serotypes. Ultimately these could be combined to make a tetravalent DENV vaccine.

