

Thiago Campolina Diniz

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Construção de um vírus Vaccinia Ankara
Modificado (MVA) Recombinante
expressando a proteína E do vírus
Dengue 3**

UFMG

2009

Thiago Campolina Diniz

**Construção de um vírus Vaccinia Ankara
Modificado (MVA) Recombinante
expressando a proteína E do vírus
Dengue 3**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Orientador: Flávio Guimarães da Fonseca

**Laboratório de Virologia Comparada
Belo Horizonte, Fevereiro de 2009**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	(i)
LISTA DE TABELAS.....	(iii)
LISTA DE ABREVIATURAS.....	(iv)
RESUMO.....	(vii)
ABSTRACT.....	(viii)
I INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Família Flaviviridae.....	14
1.1.1 <i>Características gerais</i>	14
1.1.2 <i>Estrutura do genoma</i>	14
1.1.3 <i>Proteínas virais</i>	16
1.1.4 <i>Ciclo de multiplicação</i>	21
1.1.5 <i>Interações entre Dengue vírus e hospedeiros</i>	24
1.1.6 <i>Manifestações clínicas da infecção por Dengue vírus</i>	26
1.1.7 <i>Patogênese das infecções por Dengue vírus</i>	27
1.2 Dengue e Saúde Pública.....	30
1.2.1 <i>Ocorrência de Dengue no Brasil</i>	31
1.2.2 <i>Epidemiologia mundial da Dengue</i>	33
1.3 Modelos vacinais desenvolvidos contra Dengue vírus.....	35
1.3.1 <i>Vacinas de vírus atenuados e quimeras</i>	35
1.3.2 <i>Vacinas de vírus inativados</i>	38
1.3.3 <i>Vacinas de Subunidade Recombinante</i>	39
1.3.4 <i>Vacinas de Ácidos Nucléicos</i>	40
1.3.5 <i>Vacinas com Vetores de Expressão</i>	40
1.4 Família Poxviridae.....	43
1.4.1 <i>Características gerais</i>	43
1.4.2 <i>Estrutura do genoma</i>	44
1.4.3 <i>Ciclo de multiplicação dos Poxvírus</i>	45
1.5 Vetores poxvirais.....	50
1.5.1 <i>A utilização de vetores poxvirais como vacina e o vírus MVA</i>	50
1.5.2 <i>Engenharia genética dos Poxvírus</i>	52
1.5.3 <i>Proteínas imunogênicas do Dengue para geração de vacinas</i>	53

1.5.4	<i>Imunogenicidade de MVAs como vacina</i>	54
II	JUSTIFICATIVA.....	56
III	OBJETIVOS.....	59
3.1	Objetivo geral.....	59
3.2	Objetivos específicos.....	59
IV	MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1	Células de Fibroblastos de embriões de galinha (CEF).....	60
4.2	Vírus e Plasmídeos de Transferência.....	60
4.3	Geração de Vírus Recombinantes.....	61
4.4	Seleção dos Vírus Recombinantes.....	62
4.5	Amplificação Viral.....	63
4.6	Deteção da Expressão da Proteína Recombinante E.....	63
4.7	RT-PCR.....	64
4.7.1	<i>Síntese do cDNA</i>	64
4.7.2	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	64
4.8	Eletroforese do DNA em agarose.....	65
4.9	Transformação de bactérias (SAMBROOK & RUSSEL, 2000).....	66
4.10	Sequenciamento.....	66
4.11	Análise das sequências de DNA.....	66
4.12	Western Blot.....	68
V	RESULTADOS.....	70
5.1	Obtenção do plasmídeo de clonagem pGEM-T Easy contendo o inserto codificante para a proteína DEN3-E.....	70
5.2	Obtenção do plasmídeo de transferência pLW 44 contendo o inserto codificante para a proteína DEN3-E.....	79
5.3	Avaliação da construção pLW 44 DEN3-E.....	82
5.4	Geração e amplificação dos clones virais MVA DEN3-E GFP.....	84
VI	DISCUSSÃO.....	86
VII	CONCLUSÃO.....	92
VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
IX	PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS.....	106
X	PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS.....	107
XI	ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS.....	108

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática da partícula viral de Dengue virus.....	14
FIGURA 2	Estrutura do genoma de Dengue virus.....	16
FIGURA 3	Partícula de Dengue virus DENV e organização da proteína E em sua superfície.....	19
FIGURA 4	Ciclo de multiplicação de Dengue virus.....	22
FIGURA 5	Ciclo de transmissão de Dengue virus.....	26
FIGURA 6	Distribuição de <i>Aedes aegypti</i> nas Américas em 1930, 1970 e em 2006.....	35
FIGURA 7	Morfologia e estrutura dos Poxvírus.....	44
FIGURA 8	Representação esquemática das características estruturais do DNA do Vaccínia vírus.....	45
FIGURA 9	Diagrama do ciclo de multiplicação dos Poxvírus.....	47
FIGURA 10	Eletromicrografia de transmissão de IMV, IEV e EEV.....	49
FIGURA 11	Média anual de número de casos de DF/DHF retratados pela Organização Mundial de Saúde de 1955 à 2005.....	50
FIGURA 12	Plasmídeo pLW 44.....	61
FIGURA 13	Representação esquemática do fluxograma de trabalho.....	69
FIGURA 14	Gel de Agarose mostrando fragmentos de DNA amplificados por PCR à partir de clones bacterianos contendo o gene correspondente para a proteína E do sorotipo 3 de Dengue vírus.....	71

FIGURA 15 Alinhamento da sequência genômica de E de Dengue 3 clonada em pGEM-T Easy comparada com 10 sequências depositadas no Gene Bank.....	76
FIGURA 16 Alinhamento da sequência primária de Dengue 3 obtidas das amostras depositadas no Gene Bank com a sequência E clonada no vetor pGEM-T Easy (clone 3).....	77
FIGURA 17 Análise da viabilidade da proteína DEN3-E do clone 3.....	78
FIGURA 18 Análise da digestão do inserto clonado em pGEM-T Easy (clone 3).....	80
FIGURA 19 Análise da presença de insertos em clones transformados com pLW 44/DEN3-E.....	81
FIGURA 20 Análise da expressão de E em células infectadas com Vaccinia WR, ou MVA e transfectadas com pLW 44.....	83
FIGURA 21 Seleção dos recombinantes MVA DEN3-E.....	85
FIGURA 22 Origem da amostra MVA.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 casos notificados de dengue, segundo mês de início de sintomas. Brasil, grandes Regiões e Unidades Federadas.2008.....	32
TABELA 2 Casos confirmados de FHD, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-1991, 1994-2008*	33
TABELA 3 Taxas de Incidência dos Casos Notificados de Dengue por Região de Residência,Brasil.....	34
TABELA 4 Oligonucleotídeos iniciadores (Desenhados por da Fonseca FG – não publicado).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – aminoácido

ADCC - citotoxicidade mediada pela célula dependente de anticorpos

AUG – códon correspondente a metionina

ALT - alanina aminotransferase

AST - aspartato aminotransferase

ADE - exacerbação imune dependente de anticorpos

CAP- capeamento

cDNA – fita de DNA complementar

CEF - Células de Fibroblastos de Embrião de Galinha

CEV - vírus envelopados célula-associados

DEN-1 sorotipo 1 de *Dengue virus*

DEN-2 sorotipo 2 de *Dengue virus*

DEN-3 sorotipo 3 de *Dengue virus*

DEN-4 sorotipo 4 de *Dengue virus*

DENV- *Dengue virus*

DC-SIGN - não-integrina ligante de ICAM célula dendrítica específica

DF- febre do dengue

DHF- febre hemorrágica de dengue

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxinucleotídeo trifosfatado

DRs - repetições diretas

DSS – síndrome do choque da dengue

DTT - ditionitrito

ECP – efeito citopático

EDTA- ácido etilendiaminotetracético

EEV - envelopados extracelulares

EV - vírus extracelular

g - gravidade

GFP – proteína fluorescente verde

GRP78/BiP - proteína reguladora de glicose 78

HIV – vírus da imunodeficiência humana
IEV - vírus envelopados intracelulares
IMV - vírus maduro intracelular
IV - vírus imaturo
IPTG – isopropil β - D – tiogalactopiranosídeo
ITRs - regiões terminais invertidas
Kb – quilobases
KDa – quilodaltons
L-15- meio Leibowitz-15
LB – meio Luria Broth
MEM – meio mínimo de Eagle
MHC-I - Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe I
mL – mililitro
M-MLV – Moloney murine leukemia virus
mM – milimolar
min – minutos
Moi – multiplicidade de infecção
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
MS – Ministério da saúde
MV - vírus maduros
MVA - *Vaccinia virus* Ankara modificado
MVA-DEN3-E - *Vaccinia virus* Ankara modificado que expressa proteína E de
Dengue vírus sorotipo 3
MVA-DEN3-E-NS1 - *Vaccinia virus* Ankara modificado que expressa proteína E
e NS1 de *Dengue vírus* sorotipo 3
 μ g - micrograma
 μ L – microlitro
nt- nucleotídeos
nm – nanômetros
NS- proteína não-estrutural
ORF – janela aberta de leitura
PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida
PAHO - Organização pan-americana de saúde

pb – pares de bases do DNA
PBS – solução salina fosfatada
PCR – reação em cadeia da polimerase
PFU- unidade formadora de placa
pH – potencial hidrogeniônico
pmol - picomol
RFP- proteína fluorescente vermelha
RNA- ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa
SDS – sódio dodecil sulfato
SFB- soro fetal bovino
SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
TAE – tampão Tris acetato EDTA
TBE- tampão Tris-borato-EDTA
TE – tampão Tris EDTA
TGH - transferência genômica horizontal
TNF - Fator de Necrose Tumoral
TK - timidina quinase
UTR- região não traduzida
UV - ultravioleta
V – volts
VV - *Vaccinia virus*
WV - vírus envelopados
°C – graus Celsius
% - porcentagem

RESUMO

A dengue é hoje objeto da maior campanha de saúde pública do Brasil, encontrando-se presente nos 27 estados da Federação. Visto que, as campanhas de combate ao vetor foram historicamente mal sucedidas, o desenvolvimento de uma vacina antidengue, ainda não existente, torna-se a opção mais segura para o controle desta arbovirose urbana. Os vírus MVA pertencentes à família *Poxviridae*, podem ser utilizados como um vetor poxviral vacinal antidengue possuindo vantagens como: ser incapaz de se multiplicar em células de mamíferos, métodos de construção e manipulação genéticos são relativamente simples, baseados principalmente no fenômeno de recombinação homóloga, seu genoma suporta a inserção de enormes quantidades de DNA exógeno, proteínas produzidas são processadas e transportadas de maneira idêntica ao que ocorre nas células de origem do gene estudado, dentre outras. Neste trabalho foram realizadas técnicas de biologia molecular para a construção de uma vacina recombinante contra o sorotipo 3 de Dengue, sorotipo mais prevalente no Brasil. Inicialmente foi realizada uma RT-PCR de uma amostra clínica positiva de DEN3, com o intuito de amplificar a região do genoma que codifica a proteína E. A proteína E é a maior e a principal proteína do envelope viral, sendo também o principal alvo de anticorpos neutralizantes o que revela o importante potencial que esta proteína pode possuir na construção de uma vacina recombinante. Subseqüentemente, a região que codifica a proteína para DEN 3 E foi inserida num plasmídeo de clonagem e seqüenciada, na etapa seguinte, DEN3 E foi introduzida no plasmídeo de transferência pLW44. Células de fibroblasto de embrião de galinha (CEFs) foram preparadas para que ocorresse infecção por MVA, que se multiplicam muito bem nestas células, e transfeção com o plasmídeo de pLW44-DEN3-E afim de se avaliar a funcionalidade desta construção. O sucesso desta etapa foi confirmado pelo ensaio de western blot. Os resultados obtidos até agora sugerem que este projeto foi relevante para a obtenção da vacina tetravalente almejada pelo grupo.

ABSTRACT

Dengue is now the subject of the largest public health campaign in Brazil and is present in 27 states of the Federation. However, because the campaigns to combat the vector have been historically unsuccessful, the development of an antidengue vaccine, yet non-existent, is the safest option for the control of this urban arbovirus disease. The MVA virus belongs to the *Poxviridae* family, if used as a viral vector in antidengue immunization, has many advantages such as: being unable to multiply in mammalian cells, easy methods of construction, its genetic manipulation is relatively simple, based mainly on the phenomenon of homologous recombination, its genome supports the introduction of enormous quantities of exogenous DNA, proteins produced are processed and transported in a way similar to that happens in the origin cells from the gene studied, among others. Here, we report the construction of a recombinant monovalent vaccine against the Dengue virus serotype 3, the serotype more prevalent in Brazil. The E protein is the largest and the main protein of the viral envelope, and also the main target for neutralizing antibodies, which shows the great potential that this protein may have in recombinant vaccine building. We obtained a Dengue E cDNA and subsequently inserted it into a shuttle plasmid. Chicken embryo Fibroblast cells (CEFs) were inoculated with MVA and transfected with the shuttle plasmid, allowing for homologous recombination between the virus and plasmid. The obtained recombinant virus was able to express the E protein of *Dengue virus* serotype 3, as demonstrated by the western blot.

I. INTRODUÇÃO

1.1 - Família Flaviviridae

1.1.1 - Características Gerais

Os *Dengue virus* são vírus pertencentes a família *Flaviviridae* sendo estes vírus compostos de 6% de RNA, 66% de proteína, 9% de carboidrato e 17% de lipídio. Os vírus do gênero *Flavivirus* são relativamente pequenos (40 –50 nm) e esféricos. A estrutura do vírus é composta de genoma, envolvido por um nucleocapsídeo e um envelope de natureza lipídica (Figura 1) (LINDENBACH & RICE, 2001).

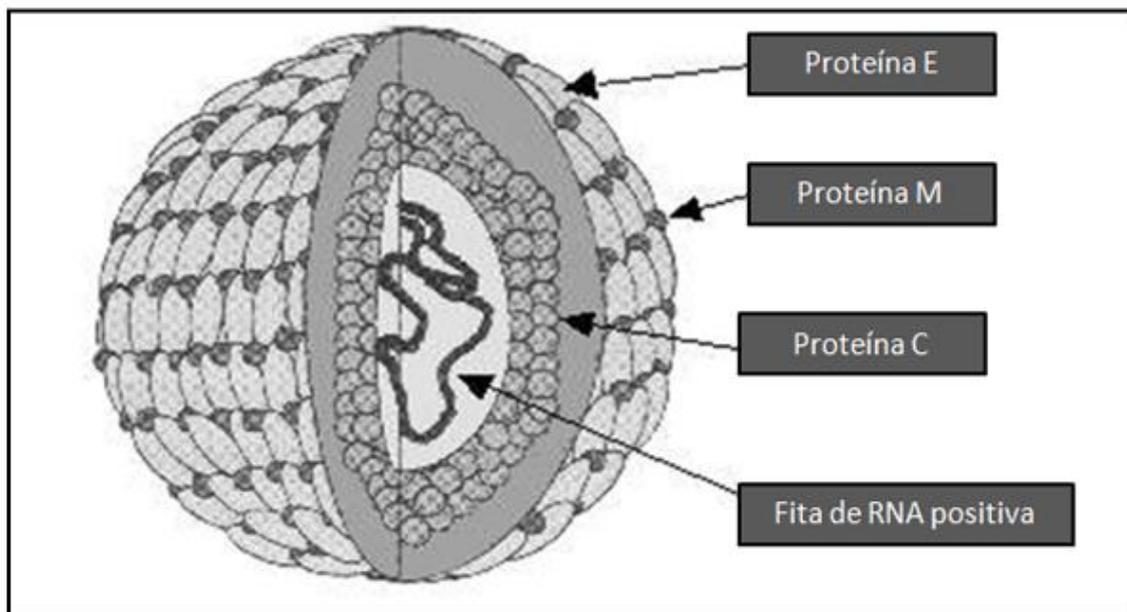


Figura 1 – Representação esquemática da partícula viral de *Dengue virus*. Fonte : Rice,1996 – modificado.

1.1.2 - Estrutura do Genoma

O genoma do vírus é formado de RNA fita simples, polaridade positiva e com aproximadamente 11Kb. Este genoma forma uma única janela aberta de leitura (ORF), codificando para três proteínas estruturais e sete não-estruturais (NS), flanqueadas por duas regiões não traduzidas (5' e 3' NCR). O RNA genômico codifica uma poliproteína precursora com 3400 aminoácidos (aa) a qual é processada co- e pós-traducionalmente pela célula hospedeira e proteases virais para produção das proteínas virais. (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH & RICE, 2001).

A falta da cadeia poli (A) na região NCR 3' é uma característica da família *Flaviviridae* que a distingue de outros vírus RNA com polaridade positiva. Apesar da seqüência da NCR 5' não ser bem conservada entre diferentes *Flavivírus*, estruturas secundárias comuns têm sido encontradas dentro desta região (Figura 2) (BRINTON e DISPOTO, 1988; THURNER et al., 2004). Estas estruturas influenciam a tradução do genoma, de fato oligonucleotídeos complementares à alça da região 5' impediram a transcrição e tradução do RNA de DENV (DEAS et al., 2005; KINNEY et al., 2005; HOLDEN et al., 2006). Outra importante função da região 5' NCR reside provavelmente no sítio complementar da fita negativa, que tem a função de iniciar a síntese da fita de RNA positiva durante a replicação do RNA. Deleções nesta região demonstraram ser letais para a replicação de DENV4 apesar de possuírem efeitos mínimos na tradução do RNA mutante (CAHOUR et al., 1995). Um dos mutantes viáveis apresentou um espectro de hospedeiros reduzido, sugerindo que fatores específicos do hospedeiro possam interagir com esta região do RNA (SHI et al., 1996; LI et al., 2002; YOCUPICIO-MONROY et al., 2003).

Apesar da NCR 3' variar muito entre os flavivírus padrões similares de seqüências e estruturas conservadas têm sido encontradas entre os flavivírus (MARKOFF, 2003). A maior similaridade é um "stem-loop" 3' (SL3') (Figura 2) de 90 a 110 nucleotídeos que foi relacionada a aumento de tradução, interação com diversas proteínas importantes como NS3 e NS5 e o fator de alongamento de tradução 1A. Os flavivírus transmitidos por mosquitos, possuem duas pequenas seqüências conservadas (CS1 e CS2) que estão localizadas na extremidade 3' (Figura 2). CS1 tem aproximadamente 26 nucleotídeos e está localizada adjacente à estrutura

secundária terminal. Parte da CS1 é complementar à seqüência conservada próxima da extremidade 5' do genoma na região que codifica a proteína do capsídeo (LINDENBACH *et al.*, 2007).

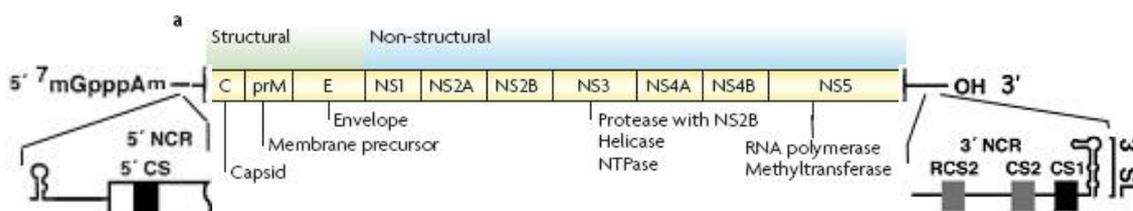


Figura 2 – Estrutura do genoma de *Dengue vírus*. Fonte: Rice, 1996.

A ordem das proteínas codificadas na janela aberta de leitura é 5' (NH₄) - C - prM (M) - E - NS1 - NS2a - NS2b - NS3 - NS4a - NS4b - NS5 - 3' (COOH). A região não-traduzida 5'NCR (N-ternal) é formada por aproximadamente 100 nucleotídeos (nt), enquanto que a região 3'NCR (C-terminal) é formada por 450 nt (Figura 2). O vírus possui três proteínas estruturais que correspondem a 25% da região codificadora da ORF na extremidade 5' do genoma viral; são elas: C, proteína do nucleocapsídeo ou do cerne de 13,5 KDa; M, proteína de membrana-associada ao envelope através de âncoras hidrofóbicas inseridas na camada bilipídica de 8 KDa e a proteína de envelope E, de 51 KDa (LINDENBACH & RICE, 2001). Uma única janela de leitura (ORF) codifica uma poliproteína de cerca de 3400 aminoácidos (aa) a qual é processada em proteínas estruturais e não estruturais, sendo que as últimas fornecem funções proteolíticas e de replicação do RNA. Uma característica distinta da região 3'NCR é ainda, a presença de repetições diretas (DRs) consistindo de 20-70 sequências duplicadas de nucleotídeos separadas por comprimentos variados de regiões não repetidas (GRISTSUN & GOULD, 2006).

1.1.3 - Proteínas Virais

A proteína C, que compõem a estrutura do cerne viral, é pequena e possui as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas de aa conservados apresentando caráter básico. A

proteína forma um complexo com o RNA genômico, formando a nucleoproteína (LINDENBACH & RICE, 2001; LINDENBACH *et al*, 2007).

A proteína prM (26KDa) é uma precursora glicosilada da proteína estrutural M (8KDa). A prM é clivada para formar a proteína M e um segmento pr N-terminal. Esta clivagem está relacionada com a maturação viral ou sua liberação, pois prM e M são encontradas nos vírus intracelulares e extracelulares respectivamente. O segmento N-terminal de prM é, predominantemente, hidrofílico e contém de 1 a 3 sítios de glicosilação e 6 resíduos de cisteína conservados que formam as pontes dissulfeto. A proteína M localiza-se na porção C-terminal de prM, contendo um domínio extracelular formado de 41 aminoácidos, seguido por 2 domínios transmembrana (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH & RICE, 2001). Contudo, antes de sofrer clivagem durante o processo de maturação da partícula viral, produzindo o pepídeo pr e a proteína M (~75 aminoácidos), a proteína prM pode exercer uma função de chaperona para o dobramento e montagem da proteína E (MUKHOPADHYAY, *et al*, 2005).

A proteína de envelope E (~53KDa) possui cerca de 495 aminoácidos é a maior e a principal proteína do envelope viral, possuindo ligantes aos receptores celulares e um peptídeo de fusão (MUKHOPADHYAY *et al*, 2005; LINDENBACH *et al*, 2007). Esta proteína parece desempenhar um papel importante também nas seguintes etapas do ciclo de multiplicação, incluindo montagem, hemaglutinação de eritrócitos, sendo o principal alvo de anticorpos neutralizantes e moduladora do sistema imune do hospedeiro (CHAMBERS *et al.*, 1990, revisado por GUZMÁN & KOURÍ, 1996, LINDENBACH *et al*, 2007).

A proteína E também se caracteriza como uma glicoproteína ancorada a membrana com cerca de 50 KDa que recobre o envelope de vírions maduros, ela está envolvida tanto com a adsorção quanto com a fusão destes vírions à célula (GUBLER *et al.*, 2007). Devido a estas características esta proteína desempenha um papel importante na geração de anticorpos neutralizantes e, por conseguinte, na geração de uma resposta imune protetora. Sendo assim, sua estrutura antigênica tem sido estudada extensivamente através do uso de anticorpos monoclonais e policlonais no modelo utilizando o *tick-borne encephalitis virus* (TBEV). Nesta proteína foram

definidos dezenove epitopos, destes, dezesseis estavam dentro dos três domínios antigênicos I, II e III. A maior parte dos anticorpos gerados era dependente de conformação (ROEHRIG, 2003), sendo que aqueles gerados contra o domínio I tiveram a mais alta atividade neutralizante, seguidos pelos domínios II e III, respectivamente. Estudos menos extensivos de anticorpos monoclonais da E de outros flavivírus geraram resultados que se encaixam com o modelo proposto para TBEV (GUBLER *et al.*, 2007).

A diferença de ligação de anticorpos neutralizantes entre os diferentes sorotipos de DENV está relacionada com um domínio de 56 resíduos de aminoácidos no domínio III exposto na superfície viral (MODIS *et al.*, 2005), sendo os anticorpos monoclonais voltados contra este domínio os mais fortes bloqueadores da adsorção viral (CRILL e ROEHRIG, 2001). Também é importante ressaltar que a indução de anticorpos neutralizantes depende da manutenção da conformação nativa de E. Estudos sugerem que a maioria epitopos em E são descontínuos, o que é consistente com a sensibilidade à desnaturação dos epitopos neutralizantes (GUBLER *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação de anticorpos policlonais que geram resposta imune protetora não é conhecido, mas eles provavelmente agem inibindo a adsorção e a fusão a membrana celular. Em alguns casos, a ligação de um anticorpo monoclonal à E depende de ou é auxiliada por um segundo anticorpo (GUBLER *et al.*, 2007).

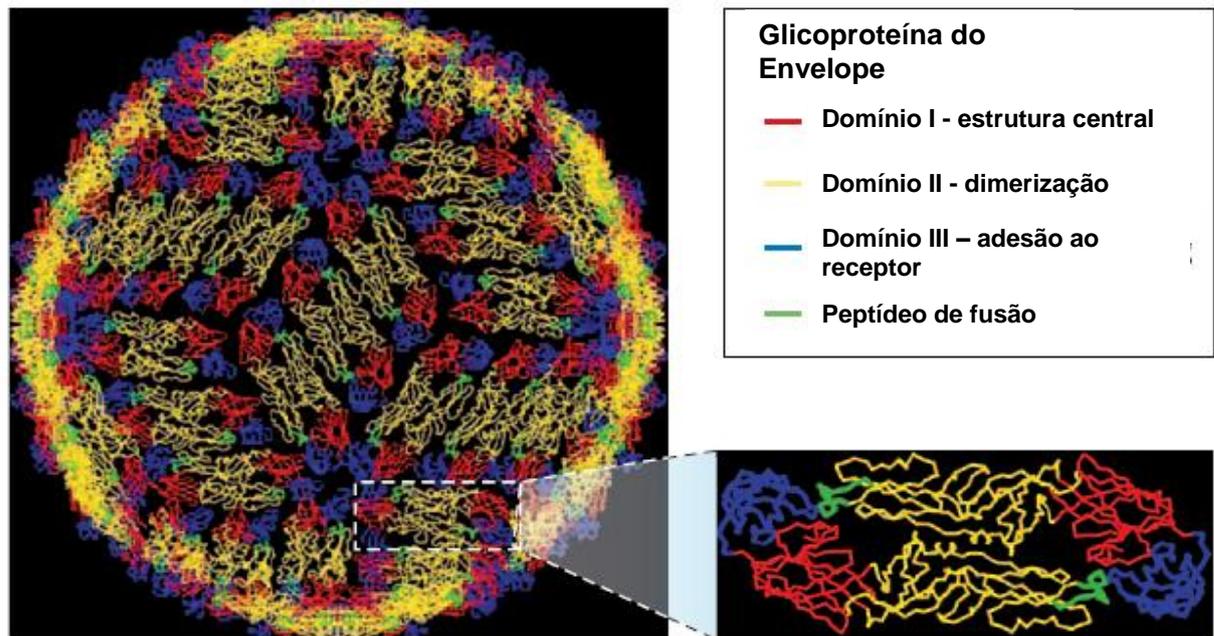


Figura 3 – Partícula de DENV e a organização da proteína E em sua superfície, em destaque a proteína e seus respectivos domínios. Fonte: Adaptado de (KUHN *et al.*, 2002)

As proteínas não-estruturais NS1 - NS2a – NS2b – NS3 – NS4a – NS4b – NS5 estão codificadas em 75% da ORF. Entre as regiões altamente conservadas de NS1, NS3 e NS5, são encontradas regiões hidrofóbicas menos conservadas que dão origem a quatro proteínas não estruturais NS2a – NS2b – NS4a – NS4b (CHAMBERS *et al.*, 1990, revisado por GUZMÁN & KOURÍ, 1996).

NS1 (~46KDa) é uma glicoproteína que é translocada no retículo endoplasmático no momento em que é sintetizada e é clivada à partir da proteína E por uma por uma peptidase sinal do hospedeiro, enquanto uma desconhecida enzima presente no retículo endoplasmático cliva a junção NS1/2a (LINDENBACH *et al.*, 2007). NS1 pode ser encontrada no meio intracelular, associada à membrana da célula ou no meio extracelular. Esta proteína é secretada em células de mamíferos, o mesmo não ocorrendo em células de mosquito. As funções de NS1 na multiplicação do vírus ainda não estão totalmente elucidadas, no entanto, alguns estudos sugerem um papel da proteína em fases precoces do ciclo. A proteína NS1 também tem papel na virulência, tornando o vírus menos infectivo quando ocorrem mutações nesta região do genoma (LINDENBACH & RICE, 2001). Infecções naturais com *Dengue virus* acabam por secretar NS1 na sua forma solúvel que possui atividade de fixação de complemento, e a ativação deste por sua vez é acentuada por anticorpos

monoclonais e policlonais contra NS1. A resposta pelo complemento também é ativada por NS1 associado á célula na presença de anticorpos específicos (AVIRUTNAN *et al*, 2006).

A proteína NS1 parece exercer um importante papel na Febre Hemorrágica do Dengue/Síndrome do choque do Dengue (DHF/SSD) . Estudos recentes apontam que altos níveis circulantes desta proteína, coincidentes com picos de viremia, são encontrados no plasma de pacientes infectados por dengue, principalmente nos casos de DHF/SSD. Nestes pacientes, concentrações superiores a 600ng/ml são detectadas 72 horas após o surgimento dos primeiros sintomas de febre em crianças, sendo inclusive um importante critério na identificação de pacientes em risco de desenvolver DHF/SSD (Libraty *et al*, 2002).

Devido ao fato de NS1 ser altamente imunogênica, a produção de vacinas utilizando NS1 como antígeno têm sido avaliada, e, em alguns modelos experimentais, com sucesso (Costa *et al*, 2005). Apostando na viabilidade de NS1 como candidata a antígeno vacinal, e também como marcador de progressão do quadro clínico de febre assintomática para febre hemorrágica, várias pesquisas tem sido realizadas visando aperfeiçoar a expressão de altos níveis de NS1 em sistemas heterólogos, como também o desenvolvimento de kits diagnósticos baseados nesta proteína (Zhou *et al*,2006; Dussart *et al*,2006).

A proteína NS3, a segunda maior proteína viral (68 a 70KDa), é altamente conservada entre os membros do gênero *Flavivirus*. Análises bioquímicas sugerem que NS3 tem, pelo menos, três funções possuindo atividade protease, helicase e RNA trifosfatase, tendo, portanto função na replicação do RNA. Embora NS3 não possua longos domínios hidrofóbicos, a proteína está associada à membrana talvez por interações com domínios hidrofóbicos da proteína NS2b (LINDENBACH & RICE, 2001). JOHANSSON *et al.*, (2001), demonstraram que os aa 160-187 de NS3 são essenciais para sua atividade de NTPase.

As proteínas NS2a, NS2b, NS4a e NS4b são processadas a partir das regiões hidrofóbicas menos conservadas da poliproteína, que se encontram entre as regiões altamente conservadas das proteínas NS1, NS3 e NS5. São pouco conhecidas as

funções destas proteínas no ciclo de multiplicação dos vírus do gênero *Flavivirus*. No caso do NS2a, a remoção da porção C-terminal pode inibir a clivagem no sítio de NS1/NS2a. A proteína NS2a de *Dengue virus* pode inibir a sinalização gerada por interferon do tipo 1. A proteína NS2b contém uma região central muito conservada flanqueada por segmentos hidrofóbicos. Esta proteína, juntamente com o domínio serina - protease da proteína NS3, parece ser essencial para o processamento de todos os sítios conhecidos de proteínas estruturais e não estruturais. NS3 parece exercer uma atividade de RNA trifosfatase, desfosforilando a região 5' final do genoma antes da adição do cap (LINDENBACH & RICE, 2001). NS4a e NS4b são pequenas (16 KDa e 27KDa) proteínas hidrofóbicas. É sugerida um papel de NS4a na replicação devido a colocalização desta proteína com complexos replicativos. Como relatado para a proteína NS2a, as proteínas de *Dengue virus* NS4a e NS4b também parecem bloquear a sinalização induzida por interferons do tipo 1, sendo que NS4 B possui o efeito antagônico mais forte (LINDENBACH *et al* , 2007).

NS5 (103KDa) é a última proteína codificada na ORF, sendo altamente conservada dentre os vírus do gênero *Flavivirus*. NS5 é uma proteína básica que não possui porção hidrofóbica e tem função de RNA polimerase dependente de RNA. O domínio N-terminal está envolvido na metilação da estrutura de cap na extremidade 5', sendo portanto uma proteína bifuncional com a atividade metiltransferase e RNA polimerase (LINDENBACH & RICE, 2001). A atividade de RNA polimerase dependente de RNA foi comprovada com a produção da proteína NS5 do *Dengue virus* 1 recombinante em *Escherichia coli* (JOHANSSON *et al.*, 2001).

1.1.4 Ciclo de multiplicação

Os vírus do gênero *Flavivirus* penetram na célula hospedeira através de uma endocitose mediada por receptores. Os receptores primários sugeridos para *Dengue virus* são DC-SIGN (não-integrina ligante de ICAM célula dendrítica específica), que é uma lectina manose-específica sugerida para interagir com resíduos de carboidratos presentes nas proteínas E de *Dengue virus*, GRP78/BiP (proteína reguladora de glicose 78), e moléculas associadas a CD-14. Adicionalmente,

heparina e outros glicosaminoglicanos são co-receptores de baixa afinidade para muitos vírus do gênero *Flavivírus*.

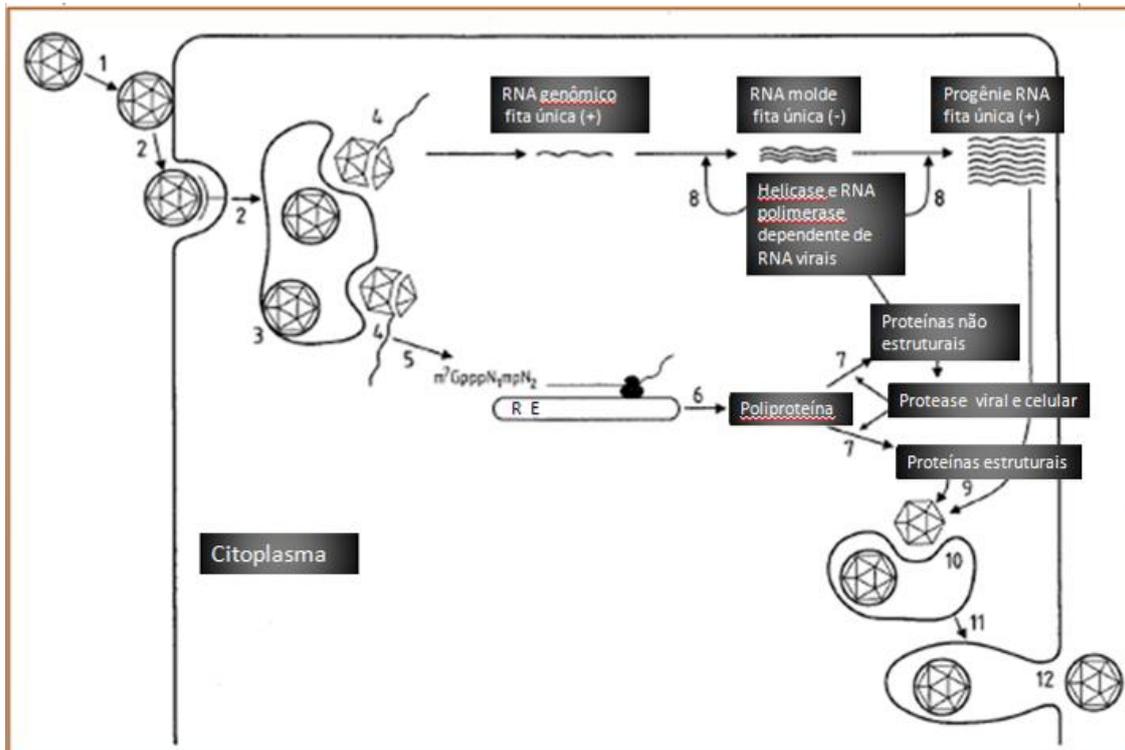


Figura 4 – Ciclo de multiplicação de *Dengue vírus*. Fonte: LEYSSEN et al., 2000 – modificado.

Nas vesículas pré-lisossomais o ambiente ácido dos endossomos induz uma trimerização irreversível da proteína E que promove a fusão de membrana. O pH ácido pode promover a fusão dos vírus com a membrana lisossomal ou com a membrana plasmática, embora, neste último caso não ocorra infecção produtiva em experimentos *in vitro*. Após esta fusão o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, a proteína do capsídeo e o RNA se separam e a transcrição e a replicação se iniciam (Figura 4 – 3 e 4) (LINDENBACH & RICE, 2001).

O início da tradução comumente ocorre no primeiro AUG ao longo da primeira ORF, mas também pode ocorrer no segundo AUG localizado de 12 a 14 códons à frente em vírus do gênero *Flavivírus* veiculados por mosquitos. O produto da tradução primária é clivado co-traducionalmente e pós-traducionalmente por proteases virais e

celulares para produzir componentes virais e da replicação (Figura 4 – 5, 6 e 7) (LINDENBACH & RICE, 2001).

Após a tradução do mRNA genômico, a replicação se inicia com a síntese de fitas negativas complementares, as quais são usadas como molde para produção de fitas de polaridade positiva. Estas podem ser usadas para tradução de proteínas estruturais e não-estruturais; ou síntese de fitas de polaridade negativa ou podem ser encapsidadas para formação de novas partículas virais. As fitas de polaridade positiva de RNA são sintetizadas a partir de fitas moldes negativas através de mecanismo semiconservativo (Figura 3– 8) (LINDENBACH & RICE, 2001).

Estudos ultraestruturais indicam que a morfogênese dos vírus ocorre em associação com membranas intracelulares. Estudos de microscopia eletrônica de células infectadas por vírus do gênero *Flavivirus* têm constantemente mostrado vírus morfológicamente maduros dentro do lúmen de um compartimento que se acredita ser o retículo endoplasmático ou acumulados desordenadamente, dentro de vesículas associadas à membrana. O processo de montagem ocorre rapidamente e uma grande quantidade de estruturas membranosas intracelulares é uma característica marcante da infecção por vírus do gênero *Flavivirus*. O transporte dos vírus recém-formados do retículo endoplasmático para a superfície celular ocorre por um processo de exocitose. O brotamento dos vírus através da membrana plasmática pode ocorrer, mas não parece ser o principal processo de maturação (LINDENBACH & RICE, 2001).

Trabalhos recentes mostraram que o primeiro alvo do *Dengue virus* são células dendríticas presentes na pele. Ao ser introduzido na pele do hospedeiro pela picada de mosquitos, o vírus infecta tanto células de Langherhans, como células dermais e macrófagos, tidos por muito tempo como alvos preferenciais desta infecção (WU *et al*, 2000).

Além das células dendríticas, estudos *in vitro* sugerem que a infecção ocorra ainda em uma grande variedade de células humanas, tais como: hepatócitos, linfócitos B e T, células endoteliais e fibroblastos. Condizente com estas observações, espécimes

obtidos de pacientes com DHF/DSS, e analisados por imunohistoquímica e imunofluorescência, revelam a presença de antígenos virais em muitos tecidos, incluindo fígado, baço, linfonodos, timo, rins, pulmões, pele e, principalmente, células fagocíticas mononucleares (Jessie *et al*, 2004).

No entanto, a presença de antígenos num determinado tipo celular não implica que ela seja permissiva a infecção viral, já que estes antígenos podem ter sido fagocitados. Estas questões foram recentemente elucidadas através da técnica de hibridização *in situ*, que permite a precisa localização do RNA viral em tecidos infectados. Os resultados confirmam que nem todas as células portadoras de antígenos virais apresentam o RNA viral (Jessie *et al*, 2004).

1.1.5 - Interações entre Dengue virus e hospedeiros

O grupo sorológico de *Dengue virus* consiste de quatro sorotipos antigenicamente relacionados, Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 e Dengue 4 (DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4, respectivamente). Dengue 1 foi isolado pela primeira vez durante a II Guerra Mundial por pesquisadores japoneses e americanos, independentemente. A seguir os americanos isolaram o dengue 2 e então os dengue 3 e 4 foram subsequentemente isolados em epidemias nas Filipinas e na Malásia na década de 1950. Desde então, centenas de vírus têm sido isolados nos trópicos, mas nenhum novo sorotipo foi documentado (Mackenzie *et al*, 2004).

Embora não se conheça como, e de onde estes vírus evoluíram, algumas evidências sugerem que eles derivam de animais africanos introduzidos na Ásia e que o *Dengue virus* ancestral provavelmente originou-se há 1000 anos atrás. Estima-se também que a transferência zoonótica sustentável de animais, provavelmente macacos, para humanos tenha ocorrido entre 125 a 320 anos (Mackenzie *et al*, 2004).

Os quatro sorotipos do *Dengue virus* têm uma história natural similar, sendo o homem o hospedeiro vertebrado e os mosquitos do gênero *Aedes* do subgênero *Stegomyia* (especialmente o *A. aegypti*, *A. albopictus* e o *A. polynesiensis*) os

vetores (RODHAIN & ROSEN, 1997, citado por MCBRIDE & BIELEFELDT-OHMANN, 2000; GUBER D.J. *et al*, 2007).

A transmissão vetorial ocorre através da picada do mosquito vetor *A. aegypti*, que é o principal envolvido na transmissão urbana da doença. Possui hábitos domésticos, pica durante o dia, e prefere alimentar-se em humanos (antropofílico). É um mosquito altamente urbano que se procria em águas estocadas para uso doméstico ou coletadas de águas de chuva em reservatórios (HENCHAL & PUNTAK, 1990).

Nos mosquitos a transmissão do vírus pode ser horizontal ou vertical, tendo esta última importância epidemiológica pela possibilidade de estabelecer novos focos de dengue com a importação de materiais que contenham ovos infectados, já que são as fêmeas que necessitam se alimentar de sangue para a geração de proles. Os mosquitos tornam-se infectados principalmente quando se alimentam do sangue de pessoas infectadas por *Dengue virus* em sua fase aguda. Um único espécime infectado por esta via pode transmitir o vírus a várias pessoas durante o seu ciclo de vida. Caso o mosquito tenha se infectado ao se alimentar, um período de incubação de 10 a 14 dias é necessário para que o vírus possa ser transmitido a outras pessoas (Mackenzie *et al*, 2004).

O mais importante ciclo de transmissão do ponto de vista de saúde pública é o ciclo endêmico/epidêmico em grandes centros urbanos dos trópicos. (GUBLER, 1998). Na África e Malásia ocorre um ciclo silvestre que envolve primatas não-humanos e diferentes espécies de mosquitos *Aedes*, (WANG *et al.*, 2000), como ilustrado na FIGURA 5 (LINDENBACH & RICE, 2007).

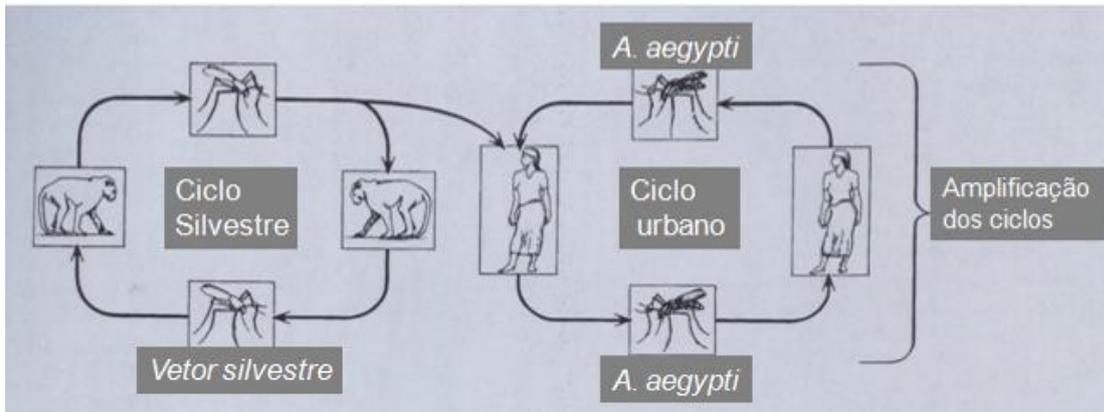


Figura 5 : Ciclo de transmissão de *Dengue virus*. Fonte Fields Virology, 2007 - modificado.

1.1.6 - Manifestações Clínicas da infecção por *Dengue virus*

Uma pessoa infectada por *Dengue virus* geralmente apresenta os seguintes sintomas: febre, dores de cabeça, dores nas costas, nos olhos, nas juntas, náusea e vômitos. Em alguns casos, esta febre pode evoluir para uma febre hemorrágica ou síndrome do choque de dengue, que ocorre em menos de 3% dos indivíduos infectados e se resolve entre 2 e 7 dias. Nela pequenos vasos sanguíneos tornam-se excessivamente permeáveis, permitindo que fluidos sanguíneos escapem dos vasos resultando num choque hipovolêmico e provocando colapso circulatório (Dengue Fact Sheet, 2005).

A DHF é uma doença febril grave caracterizada por anormalidades na homeostase e aumento da permeabilidade vascular como a principal anormalidade patofisiológica observada na DHF/DSS que leva ao derramamento de plasma no compartimento extravascular, resultando em hemoconcentração e diminuição da pressão sanguínea. A DF é distinguida da DHF e DSS pela classificação tradicional, por várias manifestações clínicas após a infecção por *Dengue virus* apresentar reações de leve a graves. O vírus pode causar alterações graves como hemorragias generalizada, falência de órgãos, e doença neurológica similar a encefalites virais (PANG *et al* 2006).

Embora o termo dengue hemorrágica sugira grandes manifestações hemorrágicas, muitos pacientes apresentam apenas pequenas hemorragias que, às vezes, só são detectadas como petéquias causadas pelo aumento de pressão sanguínea durante a realização da prova do laço, que consiste em envolver o braço do paciente em sua extremidade proximal por 5 minutos com uma mangueira de soro, dificultando o retorno do sangue para tórax através das veias superficiais. No entanto, há casos de manifestações hemorrágicas na pele, no nariz e grandes sangramentos na cavidade gastrointestinal em pacientes de DHF/DSS. O extravasamento de plasma também pode ser evidenciado por hemoconcentração e/ou por efusões nas cavidades pleural e peritoneal, que ocorre geralmente dentro de 3 a 5 dias. Outro fenômeno que acompanha o extravasamento de plasma é a trombocitopenia, que alcança valores inferiores a 100.000 plaquetas por mm³ (Rothman,2004).

A ocorrência de trombocitopenia é comum na febre de dengue e sempre presente em dengue hemorrágica. Há registros de que o vírus dengue 2 pode se ligar a plaquetas na presença de anticorpos específicos para este vírus, sugerindo que a diminuição da contagem de plaquetas pode ser mediada por reações imunes. Além disso, foi também relatado a presença de auto-anticorpos do tipo IgM, e IgG, em menor frequência, contra plaquetas em pacientes infectados pelo vírus da dengue. O alto título destas imunoglobulinas em pacientes, não somente induz a lise de plaquetas via ativação do complemento, como também inibe a agregação plaquetária. Assim sendo, a reação cruzada entre anticorpos gerados contra proteínas virais, especialmente NS1, e plaquetas sugerem um papel importante destes auto-anticorpos na patologia do dengue (Lin *et al*,2001; Lei *et al*, 2001; Oishi *et al*, 2003).

1.1.7 - Patogênese das infecções por Dengue vírus

A Dengue é uma doença febril aguda pela infecção com algum dos quatro sorotipos (1- 4) do *Dengue virus* que, podem causar uma enfermidade grave e mortal, e são transmitidos em um ciclo que envolve humano-mosquito-humano e confere imunidade prolongada contra a infecção homóloga do vírus, mas não contra a infecção heteróloga do vírus. Assim, pessoas habitando em uma mesma área

endêmica de dengue podem ser infectadas por três ou, possivelmente, os quatro sorotipos do *Dengue virus* durante à vida (GUBLER, 1998).

Os fatores que determinam a evolução de DF para DHF/SSD não são conhecidos e têm sido extensivamente estudados. Vários fatores de risco são apontados como determinantes neste processo, tais como: fatores relacionados ao vírus (diferentes sorotipos; amostras mais agressivas); ao meio ambiente (hiperendemicidade, circulação do vírus na região, alta densidade de vetores e o número de pessoas susceptíveis na região); e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, estado nutricional, resposta imunológica, infecção secundária), (Guzmán & Kourl, 2002).

Dentre os fatores relacionados a variações fenotípicas e genotípicas dos vírus, destaca-se as variações na proteína E, por ser a mais antigênica das proteínas virais e estar diretamente envolvida na penetração do vírus, e também às sequencias não traduzidas do genoma viral, que são essenciais para a replicação e funcionam como sinal de iniciação da síntese de RNA e, possivelmente, na maturação da partícula viral (Leitmeyer *et al*,1999).

Entretanto, o principal fator de risco para DHF/SSD é a ocorrência de uma infecção secundária por um sorotipo de dengue diferente daquele envolvido em uma infecção primária. A resposta imunológica gerada contra o vírus numa infecção primária protege o organismo de uma re-infecção pelo mesmo sorotipo. Esta resposta, no entanto, é ineficaz na proteção do indivíduo em uma infecção secundária na qual o vírus é de um sorotipo diferente (Welsh & Rothman, 2003).

Uma hipótese comumente aceita e que parece desempenhar um papel central na patogênese é a exacerbação imune dependente de anticorpos (ADE) (HALSTEAD, 1988 revisado por LEI *et al.*, 2001). Esta hipótese preconiza que anticorpos adquiridos em infecções prévias, específicos para um determinado sorotipo de *Dengue virus*, não seriam neutralizantes para um sorotipo diferente, que poderia ser o causador da infecção atual. Os anticorpos contra *Dengue virus* preexistentes reconheceriam o vírus infectante e formariam um complexo antígeno-anticorpo, capaz de facilitar a penetração dos vírus, através da ligação a receptores Fc γ

presentes nas membranas de células-alvo como monócitos. Além disso, seriam infectadas células do baço e fígado incluindo linfócitos, células de Kupffer e macrófagos alveolares. Em adição ao ADE, atividade cruzada de anticorpos dirigidos contra a proteína NS1 tem sido implicada no dano causado nas células endoteliais, induzindo estas células a sofrerem apoptose mediada por óxido nítrico. Mais recentemente, pesquisadores têm sugerido o possível papel da citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpos (ADCC). A atividade de ADCC foi detectada nos soros de pacientes com FHD aguda mas não de pacientes com febre de dengue suave, portanto indicando um possível papel de ADCC na patogênese de DHF/DSS (PANG *et al*, 2006) .

O papel das células CD8⁺ geradas durante uma infecção secundária foi analisado por pesquisadores, que notaram que estas ligavam-se fracamente a tetrâmeros de MHC ligados a epitopos do vírus envolvido nesta infecção, e se ligavam fortemente a outros epitopos, possivelmente de infecções anteriores. Consequentemente, estas células apresentaram-se em vantagem numérica sobre outras células com maior afinidade por epitopos do sotipo envolvido na infecção secundária. Assim sendo, as células em desvantagem numérica não conseguem controlar a infecção enquanto as demais células se proliferam inutilmente e promovem uma elevação dos níveis plasmáticos de citocinas, como IFN- γ e TNF- α , e ainda sofrem apoptose antes que a infecção seja controlada. Este profundo desequilíbrio de ativação e apoptose de células T, combinando a produção exagerada de citocinas e num aumento de vírus circulantes, promove um distúrbio sistêmico que pode resultar em FHD/SSD (MONGKOLSAPAYA *et al*,2003; WELSH & ROTHMAN, 2003; ROTHMAN & ENNIS, 1999).

Outro fator de risco muito importante em infecções secundárias é a presença de anticorpos não neutralizantes no plasma do hospedeiro. Os anticorpos gerados numa infecção primária, principalmente contra a proteína E, tanto impedem a ligação dos vírus às células, como conferem proteção a camundongos desafiados com *Dengue virus* após a transferência passiva de anticorpos. No entanto, numa infecção secundária estes anticorpos se ligam com maior facilidade a células monocíticas humanas, através da interação com receptores de imunoglobulinas, e,

consequentemente, infectam as mesmas com maior eficiência (WELSH & ROTHMAN, 2003; ROTHMAN, 2004). Este aumento da taxa de infecção de monócitos devido à presença de anticorpos não neutralizantes são adicionados às células endoteliais humanas, sendo estas ativadas e aumentando a expressão de moléculas de adesão. O mesmo não acontece quando as células endoteliais são apenas infectadas pelos vírus (ANDERSON *et al*, 1997).

Outra observação interessante são alterações de permeabilidade em células endoteliais humanas. Tais alterações são induzidas pelo sobrenadante de macrófagos (derivados de monócitos) e infectados com dengue, colhidos nos picos de viremia e de secreção de TNF- α . No entanto, esta indução não coincide com os picos de viremia ou a liberação de TNF- α pelas células endoteliais que são apenas infectadas. Estes dados sugerem a existência de fatores adicionais a partículas virais e TNF- α que são liberados por macrófagos infectados e não por células virais infectadas (CARR *et al*, 2003).

Estudos *in vitro* mostram que, quando células endoteliais são infectadas por DENV, há um aumento de secreção não apenas de TNF- α , mas também de quimiocinas com atividade pró-inflamatória, como IL-8 e RANTES. Além disso, ocorre também a ativação da via do complemento e indução de apoptose (AVIRUTNAN *et al*, 1998). Em função da importância desta célula para a biologia do sistema vascular, há um grande interesse em conhecer as alterações no perfil de expressão gênica nestas células induzidas pela infecção. Estas pesquisas podem revelar genes envolvidos nas alterações de permeabilidade celular (WARKE *et al*, 2003).

No entanto, observações histopatológicas indicam que na DHF/DSS, mesmo com evidência de edema perivascular, a taxa de infecção de células endoteliais é pequena ou inexistente como o extravasamento de plasma ocorre de forma rápida e sistêmica, e se resolve entre 1 e 2 dias sem deixar sequelas em órgãos e tecidos, estas observações sugerem que este fenômeno esteja mais relacionado a uma permeabilidade vascular alterada, devido a ativação do endotélio. Por sua vez, esta ativação parece estar mais relacionada a efeitos indiretos da infecção de outras

células do que propriamente a infecção das células endoteliais (Lei *et al*, 2001; Anderson *et al*, 1997).

1.2 - Dengue e Saúde Pública

Dengue é uma doença encontrada na maioria das zonas tropicais e subtropicais do mundo, e se tornou a arbovirose que mais frequentemente provoca doença em humanos. Atualmente cerca de 2.5 bilhões de pessoas vive em áreas propícias a infecção por *Dengue virus* (GUBLER, 2002). As taxas de pessoas acometidas relatadas para a doença durante epidemias variam de um por cem a um por mil na população (Organização pan-americana de saúde PAHO, 2005).

Devido ao fato de que pessoas com doença branda não procuram o serviço de saúde, o número atual de pessoas acometidas na população deve ser 5 a 10 vezes maior do que o número relatado. As epidemias causadas por todos os quatro sorotipos tornaram-se progressivamente mais freqüentes e maiores nos últimos 25 anos. Em 2005, a febre do dengue era endêmica na maioria dos países tropicais do Pacífico Sul, da Ásia, das ilhas do Caribe, das Américas, e da África. Adicionalmente, a maioria de centros urbanos tropicais possui múltiplos sorotipos co-circular (hiperendemicidade), o que é associado com a transmissão aumentada da dengue e facilita o surgimento de casos de febre hemorrágica de dengue. A incidência futura de dengue em locais específicos não pode ser predita com exatidão, mas uma elevação no nível da transmissão do dengue é antecipada em todas as áreas tropicais do mundo para um futuro indefinido. A incidência da doença severa, DHF, aumentou de forma dramática no Sudeste Asiático, no Pacífico Sul, e nos países Sul-americanos nos últimos 25 anos, como a principal epidemia que ocorre nestes países a cada 3-5 anos. A primeira grande epidemia nas Américas ocorreu em Cuba em 1981, e uma segunda ocorreu na Venezuela em 1989-1990 (PAHO, 1990).

1.2.1 – Ocorrência de Dengue no Brasil

No Brasil, os casos registrados em 2008 pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2009) são: 776.349 casos de Dengue e 4137 casos de Febre Hemorrágica da Dengue (Tabela 1 e 2).

Tabela 1: casos notificados de dengue, segundo mês de início de sintomas. Brasil, grandes Regiões e Unidades Federadas.2008 – Fonte: SVS/MS,2009.

Região e UF	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Mês Ignorado	Total
Região Norte	15.095	13.165	13.627	17.190	4.930	2.781	2.839	1.999	1.322	1.259	2.038	656	15	76.916
Rondônia	2.458	1.392	1.460	2.020	187	94	79	31	15	36	127	17		7.916
Acre	231	208	373	825	264	142	115	60	65	124	325	287	0	3.019
Amazonas	1.736	2.100	2.582	2.898	581	164	230	126	57	75	127	4		10.700
Roraima	321	322	390	1.147	1.032	1.138	1.644	1.336	638	281	228	86	2	8.565
Pará	5.746	4.689	4.241	5.185	1.484	646	487	246	355	318	492	196		24.085
Amapá	262	182	194	425	214	147	98	59	70	123	393	11	0	2.178
Tocantins	4.341	4.272	4.387	4.690	1.168	430	186	141	122	302	346	55	13	20.453
Região Nordeste	12.771	18.237	33.304	108.784	51.444	19.609	8.619	3.064	1.791	1.769	1.710	719	254	262.075
Maranhão	759	1.221	2.027	2.564	662	266	111	91	78	64	21	0	14	7.878
Piauí	454	474	1247	1784	545	276	118	12	21	13	17	0		4961
Ceará	3034	5411	7961	24651	14857	6214	1909	698	382	340	171	7		65635
Rio Grande do Norte	3.220	3.673	6.695	16.435	7.552	3.253	1.842	447	195	160	80	30	240	43.822
Paraíba	285	948	1.368	3.932	1.216	437	188	90	51	33	36	7		8.591
Pernambuco	1.296	1.958	4.439	18.018	8.483	3.496	1.673	661	341	293	159	6		40.823
Alagoas	657	647	1.449	8.490	4.111	1.436	1.034	533	407	358	186	44	0	19.352
Sergipe	634	717	2.848	18.731	8.690	2.293	367	76	57	125	96	15		34.649
Bahia	2.432	3.188	5.270	14.179	5.328	1.938	1.377	456	259	383	944	610	0	36.364
Região Sudeste	21.268	31.223	100.531	138.649	41.893	10.594	3.790	1.635	1.038	1.372	1.833	951	232	355.009
Minas Gerais	2.341	3.916	9.609	29.116	10.345	3.116	1.392	511	420	656	654	32	0	62.108
Espírito Santo	959	1.332	5.367	14.886	6.811	2.980	964	377	253	387	767	766		35.849
Rio de Janeiro	17.465	25.227	83.749	91.747	24.131	4.306	1.355	708	338	304	394	150		249.874
São Paulo	503	748	1.806	2.900	606	192	79	39	27	25	18	3	232	7.178
Região Sul	2.086	1.603	3.561	5.643	1.969	811	660	464	380	478	370	64	0	18.089
Paraná	1832	1420	3190	5258	1869	759	623	438	366	449	353	64		16621
Santa Catarina	121	86	157	197	49	30	24	14	6	17	11	0		712
Rio Grande do Sul	133	97	214	188	51	22	13	12	8	12	6	0	0	756
Região Centro-Oeste	6.982	7.909	13.188	23.356	5.919	2.147	1.033	590	627	1.020	1.118	371	0	64.260
Mato Grosso do Sul	828	526	889	1.358	255	128	93	79	78	148	218	90		4.690
Mato Grosso	2.228	2.252	2.536	2.661	475	218	159	99	99	163	185	8		11.083
Goiás	3.563	4.848	9.215	18.085	4.832	1.646	692	330	392	630	666	262		45.161
Distrito Federal	363	283	548	1.252	357	155	89	82	58	79	49	11		3.326
Brasil	58.202	72.137	164.211	293.622	106.155	35.942	16.941	7.752	5.158	5.898	7.069	2.761	501	776.349

Tabela 2: Casos confirmados de FHD, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-1991, 1994-2008*. Fonte: SVS/MS,2009.

Região e UF	1990	1991	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Região Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	5	58	15	19	18	172	414
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	3		11
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	2		5
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58	0	52	0	4	0	94	171
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	94
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	10	56	94
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	2	0	14	6
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0	1	3	5	33
Região Nordeste	0	0	25	8	6	38	65	54	41	125	571	405	38	310	427	878	1544
Maranhão	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	6	25	0	45	117	125	5
Piauí	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	8	28	0	8	34	86	7
Ceará	0	0	25	0	0	0	3	2	2	74	69	291	14	195	168	295	440
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	25	8	22	6	31	55	28	5	8	49	64	362
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	1	0	10	1	72	59
Pernambuco	0	0	0	6	6	13	46	28	33	13	328	23	7	18	31	133	92
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	11	9	22	78	89
Sergipe	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	3	0	0	1	0	8	396
Bahia	0	0	0	2	0	0	1	2	0	1	81	9	1	16	5	17	94
Região Sudeste	274	188	0	106	63	8	37	14	17	430	2013	195	28	39	141	321	1932
Minas Gerais	0	0	0	0	0	1	8	1	2	0	21	79	21	14	15	13	41
Espírito Santo	0	0	0	1	0	0	7	0	0	0	66	47	3	4	11	7	70
Rio de Janeiro	274	188	0	105	63	7	22	12	13	425	1895	47	4	13	78	218	1807
São Paulo	0	0	0	0	0	0	1	2	2	5	31	22	0	8	37	83	14
Região Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	9	0
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	9	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	0	0	0	3	4	4	67	124	67	22	95	96	206	247
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	2	3	0	43	42	1	0	3	16	93	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	13	24	1	14	9	14	4
Goias	0	0	0	0	0	0	1	1	3	24	64	36	20	78	71	92	239
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	1	0	0	7	4
Brasil	274	188	25	114	69	46	105	72	62	682	2714	727	103	463	682	1588	4137

Fonte: Planilha Simplificada SESs/UFs - atualizado em 28/12/08

* Dados até semana epidemiológica 48

*Dados preliminares sujeito a revisão

O Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) caracteriza as áreas do Brasil de acordo com a taxa de incidência:

- Áreas de baixa incidência: regiões, estados ou municípios com taxa de incidência menor que 100 casos por 100.000 habitantes;
- Áreas de média incidência: regiões, estados ou municípios com taxa de incidência entre 100 e 300 casos por 100.000 habitantes;
- Áreas de alta incidência: regiões, estados ou municípios com taxa de incidência maior que 300 casos por 100.000 habitantes.

A análise das taxas de incidências por região demonstra alta incidência na Região Centro-Oeste, média incidência na Região Norte e baixa incidência nas Regiões Nordeste, Sudeste e Sul em 2007(Tabela 3).

Tabela 2: Taxas de Incidência dos Casos Notificados de Dengue por Região de Residência, Brasil, 2007.

Regiões	Taxas de Incidência /100.000 habitantes	Incidência
Centro-Oeste	654,8	Alta
Norte	153,5	Média
Nordeste	75,8	Baixa
Sudeste	85,6	Baixa
Sul	88,9	Baixa
Brasil	129,5	Média

Fonte: SVS/SES (Dados até SE 18, sujeitos a alteração)

Tabela 3: Taxas de Incidência dos Casos Notificados de Dengue por Região de Residência, Brasil

1.2.2 - Epidemiologia mundial da dengue

Além de afetar países como o Brasil, pesquisas recentes realizadas sobre a pandemia global causada pela infecção por *Dengue virus*, que começou durante a segunda guerra mundial e que, progressivamente se disseminou em praticamente todos os países tropicais, apontam anualmente os seguintes dados: 5 milhões de crianças hospitalizadas, 500.000 pessoas acometidas por dengue hemorrágica ou síndrome do choque do dengue (DSS) com cerca de 70.000 mortes, afetando ainda milhões de adultos entre os quais viajantes e militares (HALSTEAD, 2002). É preciso ainda considerar o impacto econômico gerado por infecções por *Dengue virus*, especialmente nos países em desenvolvimento que se situam na zona tropical do planeta (PANG *et al*, 2006). Além disso, a falha dos programas de controle do mosquito que se iniciaram devido a um esforço que ocorreu nas décadas de 1950 e 1960 quando para impedir a febre amarela urbana, que também é transmitida por *A. aegypti*, a PAHO começou uma campanha de erradicação do artrópode vetor nos países da América Central e da América do Sul. Como consequência, neste período, dengue epidêmica foi apenas registrada de forma esporádica em alguns países do caribe. Contudo, em 1970, o programa de erradicação do mosquito foi interrompido oficialmente nos Estados Unidos, e conseqüentemente enfraqueceu-se gradualmente em todos os outros países americanos como ilustrado na figura 6. Isto resultou em uma distribuição geográfica em 2006 muito mais ampla do que o observado antes do programa de erradicação.

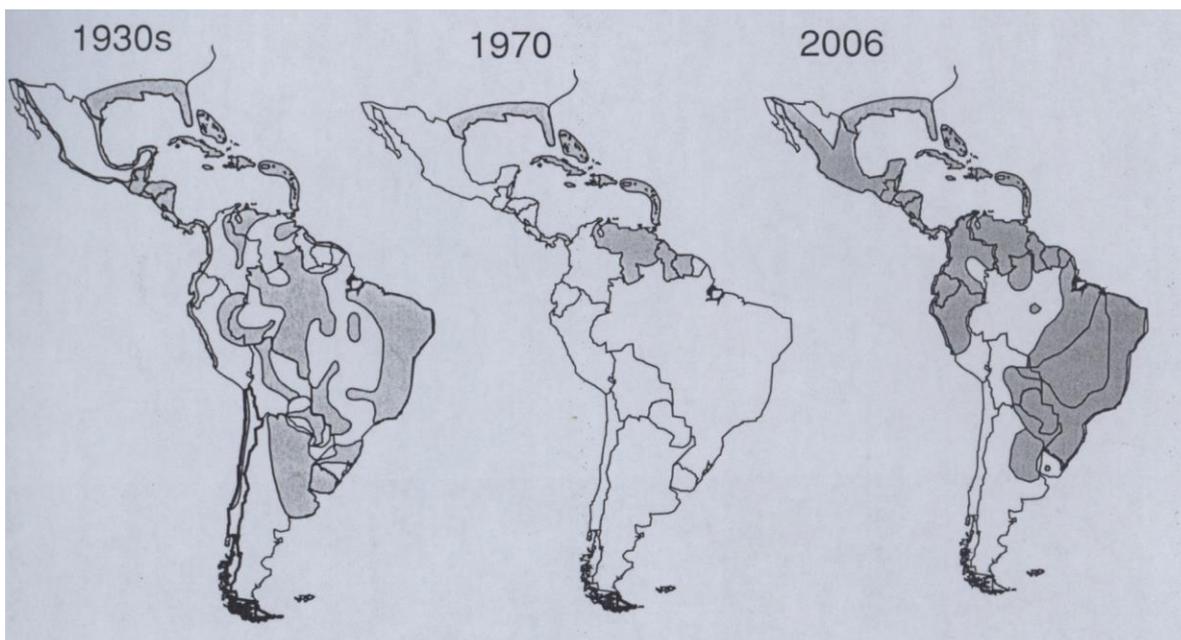


Figura 6: Distribuição de *A. aegypti* nas Américas em 1930, 1970 e 2006. Fonte: Fields Virology.

Atualmente, devido ao excesso de urbanização, superpopulação, número crescente de viagens regionais e internacionais e falhas de sustentar o controle do vetor *Aedes aegypti*, este vírus tornou-se impossível de ser erradicado e de difícil controle (EDELMAN, 2005). A doença ocorre durante todo o ano não se restringindo aos 4-6 meses de período de chuvas das zonas tropicais, com isso a febre do dengue está liderando os casos de morbidade de viajantes e militares na América e na Europa, rivalizando ou excedendo os casos de acometimentos por malária em muitos países (EDELMAN, 2007). Além disso, não há nenhum tratamento específico para DHF/DSS. E as taxas de mortalidade variam de < 1% a 30% >, dependendo do diagnóstico e da disponibilidade de tratamento, que consiste basicamente da reposição de fluidos e repouso. O indivíduo acometido pela doença pode apresentar o quadro clínico de choque hipovolemico causado por uma hemorragia massiva e extravasamento do plasma capilar (EDELMAN, 2005). Portanto, visando conter o crescente problema de saúde pública dos países situados nas regiões tropicais e subtropicais gerado pela epidemia do dengue, o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas para o vírus da dengue está sendo realizado. Apesar de décadas de pesquisa, as vacinas produzidas até o momento se encontram em fase de teste (MEN *et.al* , 2000).

1.3 - Modelos vacinais contra desenvolvidos contra Dengue virus

Em um congresso na cidade de HoChiMinh, Vietnã, em dezembro de 2001, conferencistas prepararam um plano de acelerar a introdução de vacinas seguras e eficazes contra o vírus da dengue nos próximos 10 anos (HALSTEAD, 2004). Apesar de um financiamento limitado, houve um progresso excelente no desenvolvimento vacinal do dengue nos últimos 10 anos. Pesquisadores com vacinas candidatas a experimentação em seres humanos em fase 1 ou 2 divulgaram progresso recentemente (SABCHAREON *et al.*, 2004).

1.3.1 Vacinas de vírus atenuados e quimeras.

Diversos princípios têm guiado o desenvolvimento vacinas de vírus atenuados contra DENV. Estas vacinas têm a vantagem de imitar a infecção natural e, em teoria, gerarem uma resposta imune humoral e celular duradoura e ampla tanto contra proteínas estruturais e não-estruturais. No entanto, elas devem realizar isto sem gerar doença, sendo assim, sintomas como febre, enxaqueca e artralgia, não seriam aceitáveis durante a vacinação. Porém sinais subclínicos como erupções cutâneas moderadas, um leve aumento de enzimas hepáticas e leucopenia transiente poderiam ser aceitos. Os vírus utilizados na vacina também deverão apresentar uma transmissibilidade reduzida nos mosquitos vetores, o que pode ser controlado por uma viremia de baixo título, e/ou por mutações virais que restrinjam a replicação no mosquito. Os vírus também deverão ser capazes de se desenvolver de forma eficaz em cultura celular, e possuir relativa eficiência de replicação em humanos para que seja infecciosa em baixos títulos, e os custos de produção não sejam elevados. Cada um dos quatro componentes da vacina também deverá se multiplicar suficientemente em humanos para gerar uma resposta imune balanceada. Também deverá ser estabelecida a base genética da atenuação e sua estabilidade deverá ser acompanhada durante os testes clínicos, na produção e na utilização da vacina (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

A universidade de Mahidol (Banguecoque, Tailândia) e o Instituto de Pesquisas do Exército Walter Reed (Walter Reed Army Institute of Research - WRAIR) têm utilizado o método convencional de múltiplas passagens em cultura celular para a geração dos vírus atenuados. A vacina Mahidol não obteve uma resposta imune

balanceada para os quatro componentes e gerou sintomas sistêmicos nos indivíduos que receberam com a vacina tetravalente (KANESA-THASAN, 2001; SABCHAREON, 2004; KITCHENER, 2006). Os DENV da vacina WRAIR, individualmente, sofreram passagens em células hepáticas primárias de cachorro (Primary Dog Kidney - PDK) e passagens finais em células de pulmão de macacos rhesus. Estes vírus foram testados de forma monovalente em macacos rhesus e em testes clínicos de fase I, para que fosse identificado o nível de passagens que geraria o melhor balanço entre atenuação e imunogenicidade. Nos estudos em humanos, a resposta ao DENV-2 e DENV-3 apresentou um bom balanço. O DENV-1 utilizado nestes testes ainda apresentava alta reatogenicidade, sendo que, primeiramente teve seu título reduzido e depois o vírus utilizado foi substituído por um vírus com mais passagens e, portanto, mais atenuado (PDK-27 ao invés de PDK-20). Também foi necessário ajustar o DENV-4 utilizado uma vez que, ao contrario do DENV-1 primeiramente utilizado, este vírus apresentava-se excessivamente atenuado, primeiramente tentou-se aumentar o título do vírus, mas no fim este acabou por ser substituído por um vírus com menos passagens (PDK20 por PDK-6) (EDELMAN, 2003; SUN, 2003). Os testes clínicos de fase dois da vacina tetravalente com a formulação atual estão em progresso na América do Norte e no Sudeste Asiático. É importante ressaltar que, com exceção do DENV-2 da vacina WRAIR (BUTRAPET, 2000), não foram identificadas as mutações que geraram o fenótipo atenuado das vacinas WRAIR e Mahidol, uma vez que os candidatos a vacinas nunca foram biologicamente clonados, fator que tornou sua análise genética ou re-derivações mais difíceis (SANCHEZ, 2006).

Uma estratégia distinta foi utilizada no Instituto Nacional de Doenças Infecciosas e Alérgicas (National Institute of Allergy and Infectious Diseases –NIAID). Os estudos realizados neste centro utilizaram técnicas de genética reversa para induzirem mutações atenuadoras definidas na região NCR 3' de clones com o genoma completo em cDNA de DENV-1 e DENV-4 (MEN *et al.*, 1996; WHITEHEAD, 2003a). A deleção do fragmento 3' 172–143, denominada $\Delta 30$, gerou o grau desejado de atenuação e imunogenicidade para DENV-1 e DENV-4 em macacos e humanos, mas não ocorreu o mesmo para DENV-2 e DENV-3 (BLANEY, 2004; BLANEY *et al.*, 2004). Os DENV-1 e DENV-4 com a mutação $\Delta 30$ não eram transmitidos dos indivíduos vacinados para os mosquitos vetor, provavelmente devido à sua baixa

viremia apresentada e a sua baixa taxa de replicação em mosquitos (87). Estudos também demonstraram que a mutação $\Delta 30$ é geneticamente estável mesmo após a replicação em humanos. Devido ao fato dos vírus DENV-2 $\Delta 30$ e DENV-3 $\Delta 30$ não serem candidatos apropriados para vacinas, foi utilizada a estratégia alternativa baseada em vírus quiméricos. Estes vírus foram construídos utilizando-se o DENV-4 $\Delta 30$ para expressar as proteínas E e Pr-M de DENV-2 e DENV-3, individualmente. Desta forma, foram criados os vírus DEN2/4 $\Delta 30$ e DEN3/4 $\Delta 30$, que demonstraram ser altamente atenuados em macacos e possuem baixa infectividade em *A. aegypti* (WHITEHEAD, 2003b; BLANEY, 2004)). Os vírus DENV-2 $\Delta 30$, DENV-3 $\Delta 30$ DENV-2/4 $\Delta 30$ e DENV-3/4 $\Delta 30$ foram então utilizados na geração de uma vacina tetravalente que demonstrou ser atenuada, amplamente imunogênica e protetora em macacos rhesus (BLANEY *et al.*, 2005), porém esta ainda não foi testada em humanos.

A plataforma ChimeriVax têm sido utilizada pela Acambis (Cambridge, EUA) na criação de candidatos a vacinas quiméricos substituindo-se os genes das proteínas E e Pr-M da linhagem atenuada YF17D por genes de cada um dos quatro sorotipos do DENV individualmente. A atenuação destes candidatos às vacinas, possivelmente é derivada nas mutações genéticas preexistentes na linhagem YF17D e no processo de geração do vírus quimérico, no entanto a contribuição de cada um destes componentes não foi formalmente demonstrada (GUIRAKHOO, 2001). Quando estes vírus foram administrados de forma monovalente, estes demonstraram baixa ou nenhuma infectividade nos mosquitos vetores (HIGGS, 2006). Já em macacos a administração da formulação tetravalente de 10^3 - 10^4 pfu de cada componente induziu um alto nível de anticorpos neutralizantes que foram efetivos contra um amplo espectro de sorotipos de DENV. No entanto macacos experimentaram uma alta viremia de 10^2 - 10^3 pfu por mL, que é mais alta que a observada em outros vírus candidatos à vacina (GUIRAKHOO, 2002). A vacina monovalente chimerivax-DENV-2 foi testada com sucesso em humanos e demonstrou ser segura e imunogênica (GUIRAKHOO, 2006). Os relatos iniciais dos testes de fase um da vacina tetravalente ChimeriVax indicam que ela é segura e sem nenhum efeito colateral sério, mas pode ser necessário administra-la em doses maiores que 10^4 pfu por mL (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

1.3.2 Vacinas de vírus inativados

Vacinas de vírus inativados têm duas grandes vantagens sobre as vacinas de vírus atenuados. Sendo a primeira a sua segurança, uma vez que é impossível reverterem para um fenótipo patogênico, e a segunda a geração de uma resposta de anticorpos balanceada, pois cada um dos quatro sorotipos em uma vacina multivalente utilizando vírus inativados deve ser igualmente imunogênico. No entanto o uso destas vacinas apresenta seus próprios desafios, dentre eles está o fato desta vacina conter apenas as proteínas estruturais do vírus, deste modo não gera resposta contra proteínas não estruturais. Também são necessários adjuvantes para gerar uma imunogenicidade adequada em indivíduos soronegativos e estes podem adicionar despesas e reatogenicidade à vacina. Outro fator é a necessidade de múltiplas doses de reforço para gerar uma resposta imune duradoura. É também importante ressaltar que os DENV não se multiplicam a altos títulos em cultura celular. Estes desafios tornam a vacina utilizando DENV inativado um candidato vacinal menos atraente para o uso em regiões onde o DENV é endêmico, mas podem servir como uma vacina para militares e viajantes, ou como parte de uma estratégia de “*prime-boost*” em conjunto com outras vacinas (SIMMONS *et al.*, 2006; WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Uma vacina a partir de DENV-2 purificado e inativado tem sido produzida pelo WRAIR e uma equivalente para DENV-1 logo será sujeita a testes clínicos (PUTNAK, 1996a; b). Para a preparação destas vacinas os vírus são multiplicados em células Vero, concentrados por meio de ultrafiltração e purificados em gradiente de sacarose. O purificado viral de alto título (aproximadamente 10^9 pfu por mL) foi então inativado com formalina. A vacina contra DENV-2 acrescida de sulfato de alumínio e outros adjuvantes induziu altos níveis de anticorpos neutralizantes e proteção contra viremia em primatas (PUTNAK, 2005).

1.3.3 Vacinas de Subunidade Recombinante

Antígenos do dengue, primariamente a proteína E têm sido produzidos em diversos sistemas de expressão para gerar vacinas de subunidade. A maior parte destas preparações gerou níveis de anticorpos de variaram de moderados a altos após a

imugenziação de camundongos. Apesar de ser antecipado que estas vacinas apresentem um alto grau de segurança, é também provável que estas também compartilhem algumas senão todas as dificuldades descritas acima para as vacinas utilizando vírus inativados. Até este momento, nenhuma vacina DENV de subunidade foi testada em humanos (WHITEHEAD *et al.*, 2007). No entanto, dois estudos foram recentemente concluídos envolvendo trabalhos com macacos *Rhesus* que utilizaram vacinas monovalentes de proteínas E cortadas de DENV-2 ou DENV-4. Em um destes estudos macacos foram imunizados com quatro doses de 100 µg da proteína E de DENV-4, utilizando sulfato de alumínio como adjuvante, no entanto foi obtida apenas proteção parcial no desafio utilizando DENV-2 selvagem (GUZMAN, 2003). No outro estudo, macacos foram inoculados com duas doses de proteína E de DENV-2, produzida em células de drosófila, utilizando cinco combinações diferentes de adjuvantes (PUTNAK, 2005). Apesar dos títulos de anticorpos neutralizantes variarem amplamente antes do desafio, um grupo de macacos que recebeu a dose mais alta de antígeno e conjuntamente dois adjuvantes foi completamente protegida. No momento está sendo produzida a proteína E purificada por afinidade para cada um dos sorotipos do DENV e logo serão iniciados os testes clínicos de fase 1 (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

1.3.4 Vacinas de Ácidos Nucléicos

Antígenos podem ser expressos a partir de construções de DNA que são introduzidos em células e subsequentemente traduzidos em antígenos do DENV ou partículas subvirais. Em experimentos recentes utilizando genes que codificavam as proteínas E e Pr-M para DENV-1, foi demonstrado que três doses da vacina protegiam macacos *Aofus* após o desafio com o vírus selvagem (RAVIPRAKASH, 2003). Um teste clínico com uma construção de DNA aprimorada e administrada em três doses está atualmente em andamento. Vacinas de DNA apresentam vantagens sobre as vacinas convencionais, incluindo a facilidade de produção, estabilidade e capacidade de transporte em temperatura ambiente, diminuição da probabilidade de interferência na replicação e a possibilidade de vacinar contra múltiplos patógenos em uma única vacinação. No entanto, a experiência recente com vacinas de DNA demonstra que estas necessitam de várias doses, a adição de adjuvantes

experimentais, motivos imunostimulatórios, e equipamento de injeção especializado. Estratégias de *prime-boost* utilizando uma combinação de vetores de expressão com vacinas de DNA expressando a proteína E têm sido investigados, mas tais estratégias para o desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra DENV parece demasiadamente complicada para aplicação em regiões endêmicas (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Foi também observado que em animais vacinados com vetores plasmidiais que expressam NS1 exibiram um aumento de níveis de anticorpos específicos contra NS1 após o desafio com o vírus, indicando a ativação de uma memória imunológica com uma rápida e forte resposta imune secundária. Foi demonstrado também que a imunidade protetora induzida por vacinas de DNA que expressam NS1 não foram esterilizantes contra o vírus, tal fato não é surpreendente uma vez que NS1 não está presente no virion, e, portanto a resposta imune contra esta proteína só pode ser protetora após a multiplicação inicial nas células hospedeiras (COSTA *et al.*, 2006).

1.3.5 Vacinas com Vetores de Expressão

Este tipo de vacina utiliza vírus como plataformas de expressão para genes exógenos, no caso de sua utilização como vacinas contra o DENV, os genes a serem expressos são os antígenos do dengue. Uma das grandes vantagens da utilização de vetores virais para a expressão de proteínas heterólogas, em geral, está na capacidade que estes possuem de induzir uma forte resposta, tanto humoral quanto celular, contra os patógenos alvo. Outra vantagem reside no fato desta estratégia ser realizada sem os riscos associados a vacinas utilizando o patógeno atenuado que pode regredir à forma patogênica. Alguns destes vetores também possuem a vantagem de poder serem administrados em pacientes imunocomprometidos (EDELMAN, 2005).

Dentre as vacinas em desenvolvimento neste âmbito está uma utilizando o *Vaccinia Ankara Modificado* (*Modified Vaccinia Ankara – MVA*) como um vetor para a construção de recombinantes para a expressão da proteína E dos DENV-2 e DENV-4 truncada na extremidade C terminal deixando a proteína expressa

aproximadamente 80% de sua seqüência primária completa. Os vetores MVA construídos tiveram a capacidade de geração de resposta imune protetora testada em modelos animais. Testes de rádio-imunoprecipitação demonstraram que os dois recombinantes obtiveram uma resposta de anticorpos elevada, para os sorotipos alvo após a inoculação da dose de reforço em camundongos. No entanto, apenas MVA-DEN2 80%E induziu uma resposta de anticorpos neutralizantes em camundongos, devido a isto apenas esta construção foi testada para que se determinasse a sua capacidade de induzir resistência ao desafio com o vírus selvagem em macacos. Estes animais quando inoculados duas vezes com o MVA-DEN2 80%E desenvolveram uma resposta de anticorpos que variou de baixa à moderada e, como indicou o padrão de viremia, foram parcialmente protegidos contra o desafio com DENV-2. Subsequentemente, quando se utilizou um regime de três inoculações os animais desenvolveram um nível maior de anticorpos e foram completamente protegidos contra a infecção por DENV-2 (MEN *et al.*, 2000).

Uma outra estratégia vacinal que também tem sido desenvolvida para *Dengue vírus* é baseada na construção de um vetor utilizando um adenovírus não-multiplicativo capaz de ancorar uma grande quantidade de DNA exógeno, o que tornou possível a criação de vetores recombinantes multivalentes. Foram geradas duas vacinas bivalentes pela incorporação de genes que expressam as proteínas prM e E de *Dengue virus* sorotipos 1 e 2 (CAdVax-Den12) e uma para *Dengue virus* sorotipos 3 e 4 (CAdVax-Den34). Estas vacinas produziram respostas de anticorpos neutralizantes bivalentes em camundongos vacinados. Foi demonstrado posteriormente, que macacos do gênero *Rhesus* quando vacinados por uma inoculação intramuscular de uma vacina tetravalente (CAdVax-DenTV) formulada pela combinação das duas vacinas bivalentes produziram altos títulos de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos. A habilidade desta vacina de induzir uma rápida, e também sustentada, resposta imune protetora foi examinada por dois desafios, realizados separadamente, administrando-se vírus vivos 4 e 24 semanas após a vacinação final. Nestes dois estudos de desafio do vírus vivos, uma significativa redução de viremia foi demonstrada para os quatro sorotipos em animais vacinados. Viremia de Dengue sorotipos 1 e 3 foi completamente bloqueada enquanto que viremia para dengue 2 e 4 foi reduzida, mas não completamente

bloqueada, quando comparada com animais controle vacinados. Estes resultados sugerem que a formulação de uma vacina tetravalente induz uma proteção significativa em macacos *Rhesus* contra o desafio utilizando-se os quatro sorotipos da dengue (RAVIPRAKASH *et al*, 2008).

A dificuldade de se achar um vírus, que seja um vetor vacinal recombinante adequado para investigação clínica da forma mais irrestrita possível, torna atrativo uso de um vetor altamente atenuado como o *Vaccinia virus* Ankara modificado (MVA) um *Orthopoxvirus*, um candidato notável a ser utilizado como importante vetor para a geração de novas vacinas contra infecções e tumores (DREXLER *et al*, 2004). Particularmente atrativo porque ele é seguro para o uso em humanos tendo sido testado em um grande número de indivíduos. Além disso, amostras recombinantes derivadas de MVA também provaram reter o fenótipo atenuado *in vitro*, e a capacidade de multiplicar eficientemente em células de fibroblasto de embriões de galinha, mas não em humanos ou na maioria das outras células de mamíferos (MEN, 2000).

Baseando-se nestes dados, surge a questão sobre a segurança das vacinas construídas em um vetor viral vivo, uma vez que hoje em dia é crescente o número de imunossuprimidos, e ainda visto que a infecção por HIV é crescente nas populações com risco de infecção por *Dengue virus*. Vacinas de vírus vivos atenuados são geralmente contra-indicadas em pessoas infectadas por HIV. Mas, com exceção de 1 paciente, o qual se recuperou de DHF, não há nenhum relato de infecção em pessoas HIV-soropositivas. Os candidatos vacinais para dengue necessitam ser cuidadosamente testados em indivíduos imunossuprimidos, mas questões éticas tornam este tipo de estudo problemático (EDELMAN, 2005).

1.4 - Família Poxviridae

1.4.1 – Características Gerais

Os vírus Variola, VV (*Vaccinia virus*) e MVA fazem parte da família *Poxviridae*, gênero *Orthopoxvirus* que compreende complexos vírus animais, capazes de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados. As partículas maduras apresentam forma ovóide ou de tijolo, com dimensões variando entre 220-450nm X 140-260nm (ESPY *et al.*, 2002; CYRKLAFF *et al.*, 2005). O capsídeo, em forma de halter (FIGURA 7A), envolve o material genético, enzimas e fatores de transcrição de genes precoces. Uma membrana lipídica, contendo túbulos de superfície irregulares (FIGURA 7B), envolve o nucleocapsídeo e dois corpúsculos laterais, cuja função e composição química ainda são pouco definidas (FIGURA 7C) (MOSS, 2001).

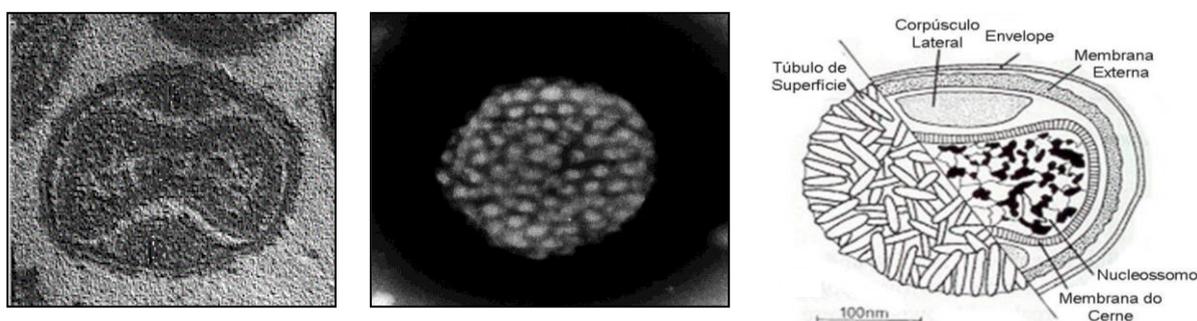


Figura 7 : Morfologia e estrutura dos poxvírus. (A) Eletromicrografia de secção longitudinal de VACV. **(B)** Eletromicrografia em contraste negativo de *Variola virus*. **(C)** Representação esquemática de um poxvírus. Fontes: www.smbs.buffalo.edu; www.ucm.es; FENNER, 1989 – modificado.

1.4.2 - Estrutura do Genoma

O genoma dos poxvírus é constituído por uma molécula de DNA dupla-fita linear, covalentemente ligada nas extremidades, variando de 130kb (*Parapoxvirus*) a 300kb (*Avipoxvirus*) e codificando aproximadamente 200 genes. Este tamanho relativamente grande do genoma permite aos poxvírus codificarem proteínas não-essenciais para seu ciclo de multiplicação, mas que modulam sua patogenicidade. A ausência de infecções latentes e a não-integração no genoma do hospedeiro justificam a importância de genes que protejam os poxvírus do sistema imune durante uma infecção (MOSS, 2001; HUGHES & FRIEDMAN, 2005).

A região central do genoma dos poxvírus, sobretudo dos *Orthopoxvirus*, é altamente conservada, e codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas no

metabolismo do ácido nucléico. Nas extremidades do genoma são observadas as regiões terminais invertidas (ITRs), seqüências idênticas dispostas em orientações contrárias, que codificam vários genes responsáveis pela interação vírus-hospedeiro, conferindo a cada poxvírus características únicas de patogênese e imunomodulação (ESPOSITO & KNIGHT, 1985; MOSS, 2001). As duas fitas de DNA são conectadas em suas porções terminais por seqüências nucleotídicas de fitas simples em A + T (alças), contendo aproximadamente 100 bases (FIGURA 8) (MOSS, 2001).

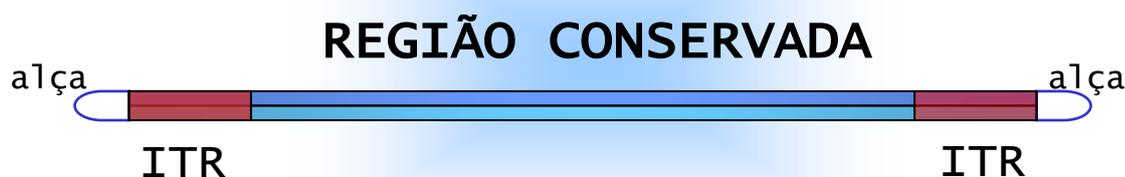


Figura 8: Representação esquemática das características estruturais do DNA do VACV. Fonte Fields Virology, 2007.

A transferência genômica horizontal (TGH) também contribui para a relativa expressividade numérica de genes observada nos poxvírus. Pelo menos 34 genes presentes na família *Poxviridae* parecem ter sido adquiridos por TGH a partir de seus hospedeiros, incluindo genes envolvidos na resposta imune, como o Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I, Interleucinas 10 e 24, receptor de Interferon-gama e receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF) (HUGHES & FRIEDMAN, 2005).

1.4.3 - Ciclo de multiplicação dos Poxvírus

Diferentemente da maioria dos vírus de DNA, a multiplicação dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira, característica compartilhada apenas com a família *Asfarviridae* (FIGURA 8). A partícula viral possui quase todos

os elementos necessários para a sua multiplicação, incluindo RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação, poli A polimerase e fatores de transcrição de genes precoces (MOSS, 2001; FENNER, 2002, *revisado por* SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002).

O ciclo tem início com a adsorção viral na membrana da célula hospedeira, todavia, pouco se conhece acerca dos ligantes virais e receptores celulares envolvidos no processo. A proteína de superfície A27, presente no vírus maduro intracelular (IMV) parece estar envolvida na adsorção viral. Além disso, uma série de outras proteínas de superfície como D8 e H3 também vêm sendo relacionadas como possíveis ligantes de IMV, porém nenhuma das proteínas em questão se mostrou individualmente essencial (MOSS, 2005). Elementos de expressão ubíqua e de caráter aniônico, como os glicosaminoglicanos e outros componentes da matriz extracelular, como condroidina sulfato e heparano sulfato, vêm sendo apontados como possíveis receptores celulares envolvidos na adsorção dos poxvírus (MOSS, 2001; *revisado por* McFADDEN, 2005)

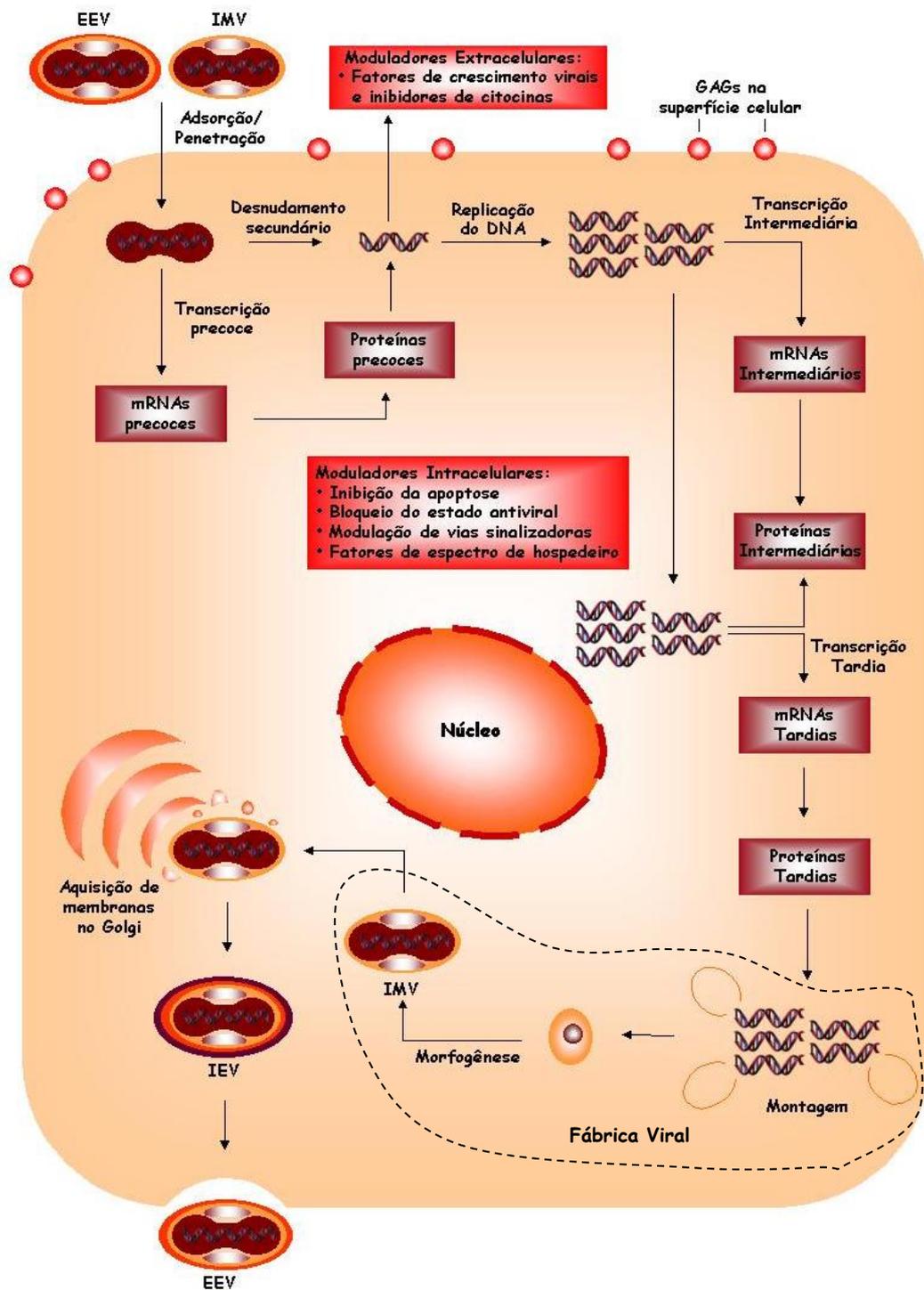


Figura 9: Diagrama do ciclo de multiplicação dos poxvírus. Fonte: McFADDEN, 2005 – modificado.

Após a adsorção, a partícula viral se funde com a membrana plasmática, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma celular. A proteína A28 é altamente conservada entre os poxvírus, e parece estar envolvida no processo de fusão. Experimentos envolvendo a deleção dessa proteína em VV demonstraram que A28 está presente em todas as partículas infecciosas dos poxvírus (SENKEVICH *et al.*, 2003).

Após a penetração na célula, a maquinaria transcricional do vírus é ativada pelos fatores de transcrição de genes precoce presentes no nucleocapsídeo (BULLER & PALUMBO, 1991). Proteínas moduladoras de resposta imune e fatores de crescimento celular são então traduzidos (FENNER, 2001; McFADDEN, 2005). Em seguida ocorre um desnudamento secundário, e o DNA começa a ser replicado, formando concatâmeros. Os genes intermediários e tardios são transcritos e traduzidos, originando proteínas estruturais, além de elementos que serão associados às partículas virais em formação (MOSS, 2001). A morfogênese acontece em sítios celulares onde ocorre acúmulo de um material nucleoprotéico denso, embebido em uma matriz granular, conhecidos como corpúsculos de inclusão do tipo basófilo ou “fábricas virais” (SMITH *et al.*, 2002).

As membranas dos poxvírus não são inicialmente adquiridas de forma adjacente às membranas celulares. Ao invés disso, as membranas parecem ser montadas de forma seqüencial, em estruturas lipoprotéicas denominadas crescentes, formando partículas uniformes e esféricas, que em um estágio subsequente de maturação, formam o vírus imaturo (IV) (*revisado por* BULLER & PALUMBO, 1991).

Após clivagens proteolíticas de elementos de capsídeo e condensação do cerne viral, os IV dão origem aos vírus maduros intracelulares (IMV), que representam a maioria das partículas virais infecciosas (MOSS, 2001). Algumas partículas IMV podem ser transportadas através de microtúbulos até o Complexo de Golgi, onde adquirem uma dupla membrana, dando origem aos vírus envelopados intracelulares (IEV), que são partículas virais não infecciosas (DUBOCHET, 1993; MOSS, 2001). Os IEV seguem para a periferia da célula direcionados por microtúbulos, e então se fundem com a membrana plasmática, formando os vírus envelopados extracelulares

(EEV). Entretanto, algumas partículas podem eventualmente permanecer associadas com a membrana plasmática da célula, formando os vírus envelopados célula-associados (CEV), importantes na dispersão viral célula-célula (MOSS, 2001).

O número e a composição das membranas presentes nas formas virais envolvidas no ciclo de multiplicação dos poxvírus é alvo de intensa pesquisa. Nos últimos anos, técnicas de microscopia eletrônica, associadas ao avanço de procedimentos bioquímicos de identificação protéica, demonstraram que a composição das proteínas de membrana dos IMV é diferente da encontrada nos IEV e CEV (MOSS, 2005). Além disso, foi demonstrado de forma consistente que os IMV apresentam apenas uma membrana, enquanto as partículas extracelulares (CEV e IEV) possuem pelo menos duas (FIGURA 10). Estes aspectos influenciam diretamente no modo pelo qual tais partículas adsorvem e penetram nas células hospedeiras (SENKEVICH et al., 2003; MOSS, 2005).

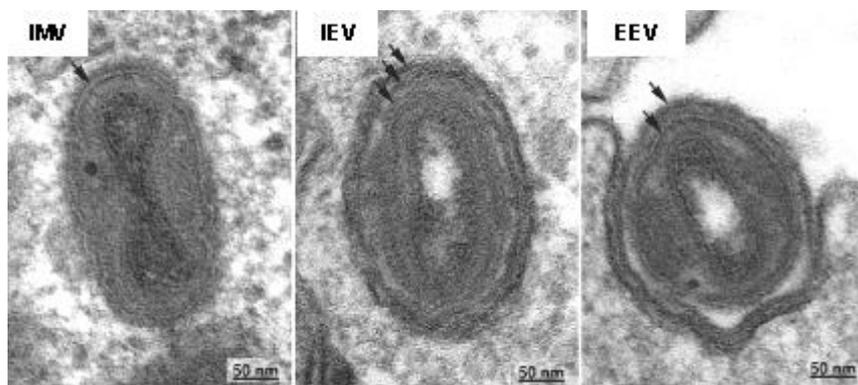


Figura 10: Eletromicrografia de transmissão de IMV (A), IEV (B) e EEV (C). As setas indicam as membranas presentes nas partículas. Fonte: MOSS, 2005 – modificado

Baseado em tais avanços, acerca da estrutura e composição das membranas dos poxvírus, uma nova nomenclatura para as partículas virais foi proposta por MOSS (2005). Os vírus maduros intracelulares (IMV) foram classificados como vírus maduros (MV), e há um consenso que tais partículas possuem uma única membrana formada por bicamada lipídica. Os vírus intracelulares envelopados (IEV), por adquirirem um envelope composto por duas membranas que circundam o MV, são chamados de vírus envelopados (WV). Por fim, as partículas EEV e CEV, por ocorrerem fora da célula, são denominadas vírus extracelulares (EV), e possuem uma membrana a menos que os WV (MOSS, 2005).

1.5 - Vetores poxvirais

1.5.1 - A utilização de vetores poxvirais como vacina e o vírus MVA

Embora a incidência de infecções causadas por *Dengue virus* esteja aumentando, como ilustrado na FIGURA 11, ainda não existe vacina disponível apesar de mais de 60 anos de esforços (GUBLER D J *et al* ,2007).

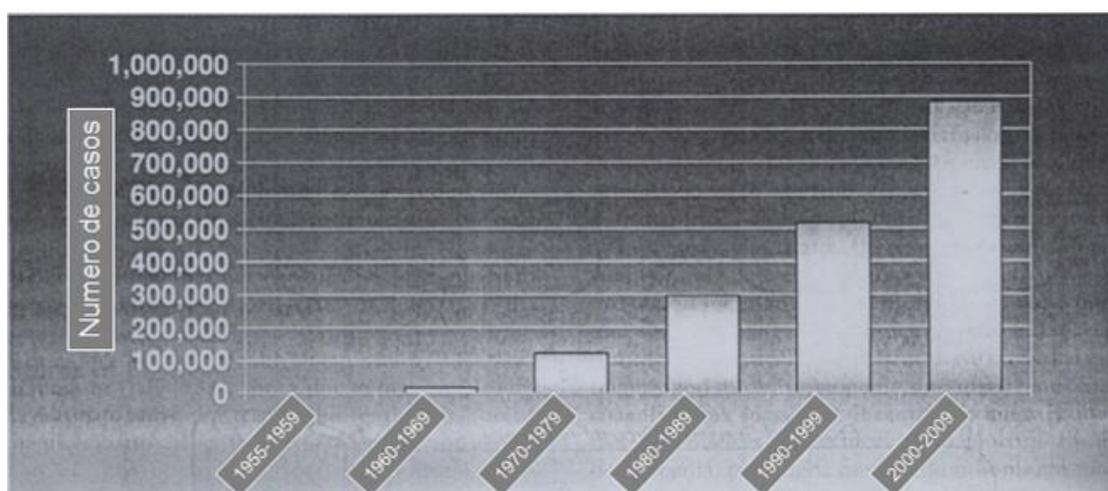


Figura 11: média anual de número de casos de DF/DHF relatados para a organização mundial de saúde desde 1955 a 2005. Fonte: Fields Virology, 2007 – modificado.

Os principais problemas associados com o desenvolvimento de uma vacina contra *Dengue virus* estão relacionados com o fato de que esta vacina deve conferir imunidade contra os quatro sorotipos simultaneamente, e devido à falta de um modelo animal que demonstre claramente os sinais clínicos associados à DF ou DHF/DSS. Uma vacina tetravalente é desejável porque o risco de uma infecção secundária desencadear DHF/DSS é muito alto (GUBLER D J *et al*, in FIELDS VIROLOGY, 2007).

Assim sendo, as atuais estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra os 4 sorotipos são apoiadas por 3 importantes fatos imunológicos e epidemiológicos. Primeiro, a infecção primária com um sorotipo deve induzir uma imunidade duradoura contra o desafio homólogo que persista por anos. Segundo, um ou mais sorotipos podem circular simultaneamente em qualquer localidade, portanto uma

vacinação monovalente, provavelmente, não será protetora. Terceiro, as infecções por *Dengue virus* são graves em indivíduos que possuem anticorpos contra este vírus devido a uma infecção prévia, ou adquiriam passivamente no nascimento, porque estas pessoas são mais propensas a desenvolver DHF/DSS, fato que é apoiado pela hipótese da intensificação da infecção dependente de anticorpos. O que é sugerido baseando-se nestes princípios é o desenvolvimento de vacinas que devam induzir a produção de anticorpos neutralizantes para os 4 sorotipos simultaneamente, visando evitar a intensificação da infecção por dengue em infecções subseqüentes. (EDELMAN, 2007).

A utilização de vetores virais para a expressão de proteínas heterólogas, em geral, induz uma forte resposta humoral e celular contra os patógenos alvo. Em vista deste potencial, diversos vetores têm sido propostos, dentre eles os poxvirus. O uso de vetores atenuados dos poxvirus aumenta ainda mais a segurança da utilização destes. Nos últimos anos, diversas vacinas utilizando estas tecnologias para fins veterinários (KIENY *et al.*, 1984; YOKOYAMA *et al.*, 1997; PASTORET e VANDERPLASSCHEN, 2003) e humanos (EGAN *et al.*, 1995; KENT *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 2000; STOBER *et al.*, 2007) têm sido desenvolvidas e testadas.

Sendo assim estudos que visam desenvolver vacinas experimentais utilizando a versatilidade de vetores poxvirais como o MVA para apresentar proteínas heterólogas poderiam ser utilizadas para expressar proteínas de sorotipos distintos de *Dengue virus* concomitantemente. O vírus MVA apesar de ter perdido aproximadamente 40 kb do seu genoma, manteve todas as características tão peculiares que fazem dos poxvirus atraentes vetores de expressão eucariota, incluindo-se sua enorme capacidade de acomodar DNA exógeno em seu genoma (até 25 Kb); controle viral preciso da expressão de proteínas codificadas por genes virais ou recombinantes; absoluta ausência de persistência viral ou integração no genoma do hospedeiro; e facilidade para a produção de vetores e vacinas recombinantes (DREXLER *et al.*, 2004).

Alguns vetores vacinais utilizando MVA já estão sendo produzidas como, por exemplo, para imunização contra coronavírus associados à síndrome respiratória

aguda asiática (SARS), *Epstein-Barr vírus*, *papiloma virus*, *Plasmodium falciparum* e melanoma. MVA é considerado também o candidato vacinal mais seguro para fornecer proteção contra infecções causadas por *Orthopoxvirus* (DREXLER *et al.*, 2004).

A possível utilização de vetores baseados no vírus MVA, particularmente em seres humanos, é freqüentemente questionada com base na existência de uma grande parte da população mundial que ainda possui resposta imune residual contra Poxvírus, adquirida durante a campanha de vacinação e erradicação da Varíola. Assim, a utilização de vetores baseados em MVA poderia ser impedida pela pré-existência de resposta contra o próprio vetor. Felizmente esse parece não ser o caso, uma vez que a utilização de vacinas recombinantes, baseadas em MVA, aplicadas em indivíduos previamente imunes contra o vetor, gerou respostas protetoras contra a proteína recombinante (WANG *et al.*, 2004; PARRINO *et al.*, 2007).

1.5.2 Engenharia genética dos Poxvírus

A engenharia genética dos poxvírus tem fornecido uma forma de estudar a biologia destes vírus para expressar proteínas exógenas. Alguns exemplos envolvidos com a expressão de proteínas incluem marcadores para genes que expressam a timidina quinase (TK), a DNA polimerase, como também deleções de genes não essenciais como TK. As técnicas empregadas permitem que ocorram alterações precisas na seqüência gênica, uma induzível regulação da expressão de genes e os alvos de mutações sensíveis á temperatura. (BERNARD MOSS, 1996).

Como os poxvirus se replicam no citoplasma e utilizam o próprio sistema de transcrição, promotores e janelas abertas de leitura são requeridos para a expressão de genes exógenos. O momento e o nível de expressão gênica são controlados pela escolha de promotores precoces, intermediários e tardios. (BERNARD MOSS, 1996).

Portanto, para a construção de poxvírus recombinantes os plasmídeos de transferência devem conter: o DNA de interesse sob controle de um promotor forte do vírus vaccínia, um gene marcador, para seleção dos vírus recombinantes, seqüências flanqueadoras homólogas ao locus onde o gene exógeno será inserido (WYATT *et al.*, 1996).

1.5.3 Proteínas imunogênicas do Dengue para geração de vacinas.

As atuais pesquisas direcionadas para produzir uma vacina contra *Dengue virus* através de vetores vacinais recombinantes envolvem a expressão de proteínas capazes de estimular a produção de anticorpos neutralizantes. Baseando-se nesta idéia, MEN e colaboradores, (2000) construíram amostras de *Vaccinia virus* WR (western reserve), para expressar as proteínas estruturais E, prM e NS1 de DENV-4 individualmente ou na forma de uma poliproteína combinada. A imunização dos camundongos com cada um desses recombinantes induziu resistência à encefalite fatal causada pelo desafio de *Dengue vírus*, indicando que cada uma destas proteínas representa um antígeno protetor independente. Estes estudos também demonstraram que embora os camundongos fossem completamente protegidos somente baixos níveis de proteína E foram detectados por radio-imunoprecipitação. Sabendo da multiplicação irrestrita da amostra WR, os pesquisadores citados acima construíram um vírus MVA recombinante que codifica uma porção incompleta da proteína de envelope E do vírus da dengue do tipo 2. Os resultados mostraram que macacos imunizados com este vírus MVA recombinante foram totalmente protegidos contra o desafio utilizando DENV homotípico. A inoculação do mesmo vetor em camundongos também gerou altos níveis de anticorpos anti-E neutralizantes.

A proteína E, contudo, pode induzir a produção de anticorpos não neutralizantes que podem estar envolvidos no fenômeno da exacerbação imune dependente de anticorpo na infecção por dengue vírus, o que deve ser um dos principais fatores para o aumento de DHF nas infecções secundárias (HALSTEAD & DEEN, 2002).

A proteína NS1, por sua vez, é altamente imunogênica e também pode induzir proteção em animais experimentais contra diferentes flavivírus. Muitos relatos têm

mostrado que esta proteína pode gerar anticorpos com atividade fixadora de complemento, os quais parecem matar as células alvo infectadas. NS1 não está presente no virion, portanto anticorpos contra esta proteína devem ser gerados sem o risco de ADE (COSTA *et al*, 2006).

1.5.4 Imunogenicidade de MVAs como vacina

MVA foi gerado através de mais de 500 passagens de *Vaccinia virus* em células de fibroblasto de embriões de galinha. Durante este processo o vírus adquiriu múltiplas deleções e mutações, acabando por perder a capacidade de se multiplicar eficientemente em células humanas e na maioria das células de mamíferos. A restrição da multiplicação de MVAs nas células hospedeiras ocorre durante o estágio tardio da morfogênese viral, resultando na acumulação de partículas virais imaturas e na formação de algumas partículas anormais. Como resultado da extrema atenuação, MVA não causa efeitos adversos mesmo quando altas doses são injetadas em primatas imunodeficientes. MVA pareceu ser também seguro em humanos, uma vez que quando utilizado na vacinação contra varíola existiu uma redução no tamanho das lesões que acometiam a pele quando comparada com a vacina comercial da época (EARL, 2004). Estas características do MVA fazem com que o vírus possa ser trabalhado em condições de Biossegurança de Nível 1, e também impedem que o vírus se espalhe para indivíduos não vacinados ou mesmo para o meio-ambiente (BERNARD MOSS, 1996).

O vírus MVA, apesar de sua restrição multiplicativa, retém a capacidade de gerar imunogenicidade elevada e duradoura, característica tão inata aos Poxvirus a ponto de torná-los uma das vacinas mais eficientes já criadas, conforme atestado pelo fim da varíola após estratégia de vacinação com poxvírus heterólogos. A forma mais direta de se demonstrar esta prerrogativa é determinar a proteção conferida pelo MVA contra infecções causadas por outros Orthopoxvírus. Apesar da estratégia acima citada ter sido supostamente testada durante a vacinação de seres humanos com MVA na década de 1970, esta foi demonstrada experimentalmente por Wyatt *et al* (2004) em experimentos de imunização com MVA seguidos de desafio letal com VV-WR (*Vaccinia virus* amostra western reserve) em modelo murino. No estudo,

animais saudáveis ou portadores de imunodeficiência combinada severa (SCID) permaneceram saudáveis mesmo após receberem dose 1000 vezes superior à dose letal do vírus replicativo VV-NYCBH (*Vaccinia virus* amostra New York Board Health), sendo que o último corresponde à vacina contra varíola atualmente licenciada para produção e utilização (Dryvax, Wyeth, EUA).

Vírus vacinais recombinantes, como o MVA, apresentam também a capacidade de mimetizar a resposta imunológica gerada durante o curso de uma infecção natural pelo agente contra o qual a vacina está sendo desenvolvida. Assim sendo, tanto a resposta imune humoral quanto a celular são geradas (FLEXNER & MOSS, 1997).

É interessante ainda destacar que o mecanismo de resistência natural contra uma exposição de baixa-dose para a amostra virulenta selvagem de *Vaccinia virus* parece ser diferente do mecanismo fornecido pela vacina. No caso da vacina, por MVA ou WR, uma vacinação prévia fornece tempo para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. E se estes já estão presentes na hora do desafio com a amostra virulenta se tornam suficientes para proteger o organismo, portanto não sendo necessário o recrutamento de células TCD8⁺. Em contraste, na ausência de uma imunização prévia, uma infecção subletal induz tanto células T quanto anticorpos, mas tipicamente a resposta de células T surge antes da resposta humoral. Portanto no desafio com uma dose subletal as células T são suficientes para iniciar a remoção do vírus antes do surgimento de qualquer anticorpo para combatê-lo (BELYAKOV *et al* 2003).

II. JUSTIFICATIVA

A dengue é hoje objeto da maior campanha de saúde pública do Brasil, encontrando-se presente nos 27 estados da Federação, distribuída por 3.794 municípios (CÂMARA *et al* 2007).

No momento os sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 circulam simultaneamente em 24 estados da Federação (SVS, 2005), contribuindo para a incidência da forma grave da doença (dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue) nas cidades onde se registram epidemias seqüenciais por pelo menos dois sorotipos distintos (EDELMAN, 2007), embora a virulência da amostra viral epidêmica possa algumas vezes ser o determinante principal das formas hemorrágicas (CÂMARA *et al*, 2007).

No período da última grande epidemia que acometeu o Brasil entre 2001-2003, foram notificados 1.564.112 casos de dengue no país, sendo 4.123 na forma hemorrágica, com 217 óbitos (SVS, 2007). Se considerarmos que estas notificações representam apenas cerca de 15% do total notificado é possível que o número de casos tenha sido da ordem de 10 milhões. Além disso, se considerarmos ainda que grande parte das infecções por vírus da dengue é assintomática, o número real de casos pode ter sido superior a 40 milhões, aproximadamente 20% da população do país. É, portanto, de considerável relevância combater esta doença em nosso meio (CÂMARA *et al*, 2007).

Um estudo de casos realizado no Rio de Janeiro, durante a última grande epidemia sugeriu que o número de casos de pessoas acometidas pela dengue estava associado ao tamanho da população que garantia a sustentação do vírus na mesma. Os índices vetórias, neste período, estavam abaixo do valor preconizado para epidemia (CÂMARA *et AL*, 2007).

A complexidade destes fatos sugere que a vacina tetravalente antidengue, ainda não existente, talvez seja a opção mais segura para o controle desta arbovirose urbana.

Entre as vantagens da utilização do sistema vacinal utilizando-se um vetor poxviral como o MVA destacam-se: (i) os métodos de construção e manipulação genéticos são relativamente simples, baseados principalmente no fenômeno de recombinação homóloga, processo que ocorre naturalmente durante a replicação dos poxvírus; (ii) o vírus é capaz de infectar uma variada gama de tipos celulares eficientemente; (iii) seu genoma suporta a inserção de enormes quantidades de DNA exógeno, podendo tolerar até 25.000 pb de DNA adicional; (iv) a expressão de proteínas recombinantes ocorre naturalmente no citoplasma, o que elimina requerimentos especiais para processamento nuclear e transporte de RNA; (v) proteínas produzidas são processadas e transportadas de maneira idêntica ao que ocorre nas células de origem do gene estudado, de forma que as proteínas resultantes são biologicamente ativas; (vi) a síntese protéica ocorre em níveis relativamente altos; (vii) a manipulação do vetor é segura, sendo que o *Vaccinia virus* é facilmente contido dentro de padrões de bio-segurança de nível 2. (MOSS, 1996; FLEXNER & MOSS, 1997; MASTRANGELO *et al.*, 2000). Como vetor vacinal, os poxvírus recombinantes apresentam vantagens do tipo: baixo-custo de produção; atividade em pequenas quantidades; estabilidade ao calor; resistência ao congelamento e dessecação; simplicidade de administração; segurança ao vacinado; e, principalmente, geração de imunidade de longa duração (MOSS, 1996; FLEXNER & MOSS, 1997; MASTRANGELO *et al.*, 2000).

Os vírus MVA pertencem à família *Poxviridae*, e possuem além de todas as vantagens apresentadas para ser utilizado como um vetor poxviral vacinal o fato de ser incapaz de se multiplicar em células de mamíferos. A impossibilidade multiplicativa deste vírus nestas células se deve a um bloqueio na montagem de novas partículas virais, embora todas as proteínas codificadas em seu genoma, inclusive eventuais recombinantes, sejam produzidas em grandes quantidades no citoplasma da célula infectada. Como resultado, vírus pode ser utilizado com vacina segura em indivíduos imuno-comprometidos incluindo-se pacientes HIV positivos, transplantados, pacientes tratados com quimio ou rádio-terápicos, portadores de cânceres hematológicos, entre outros distúrbios patológicos debilitantes (MAY *et al.*, 1975 APUD CARROL ET AL., 1997).

Entretanto, apesar do enorme potencial deste modelo, a tecnologia dos poxvírus recombinantes não é produtivamente utilizada no Brasil. A proposta deste projeto, portanto, que certamente tem aplicações na geração de potenciais vacinas contra outras endemias, é a implementação da tecnologia dos poxvírus recombinantes no país, e principalmente sua utilização na construção e teste de vacinas recombinantes multivalentes baseadas no vírus vaccínia contra infecções pelo vírus da dengue, o que torna o projeto altamente relevante e inovador.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Construir vetores vacinais recombinantes, baseados no vírus MVA, que expresse a proteínas E do vírus DEN-3.

3.2 Objetivos Específicos

- Construir plasmídeos de transferência contendo as regiões codificadoras das proteínas E do vírus DEN-3.
- Analisar os plasmídeos de transferência construídos por seqüenciamento nucleotídico dos genes clonados.
- Gerar vetores MVA recombinantes, por meio de recombinação homóloga, contendo o gene codificador da proteína E de DEN-3 em seu genoma (MVA-DEN3-E).
- Avaliar a expressão da proteína E em células infectadas pelo vírus MVA recombinantes gerados.

IV. MATERIAIS E METODOS

4.1- Células de Fibroblastos de Embrião de Galinha (CEF)

Tanto os vírus MVA parentais como aqueles recombinantes foram multiplicados e titulados em CEFs, a qual é permissiva para a multiplicação destes vetores virais. Para produção de cultivos primários de CEFs, ovos de galinha de 10 dias de postura foram obtidos e os embriões dissecados para retirada da cabeça, grandes vísceras e membros superiores e inferiores. As carcaças embrionárias foram lavadas em Meio E-MEM e homogeneizadas mecanicamente através de passagem em seringas. Em seguida, a massa celular foi homogeneizada quimicamente através de incubação em solução de Tripsina 12,5%. A proporção para o uso de tripsina foi de aproximadamente 40 embriões para cada 100 ml de solução de tripsina. Após incubação de 15 minutos, a 37°C com agitação, a suspensão celular foi filtrada em gaze estéril e o filtrado foi acrescido de aproximadamente 200 a 300 ml de meio E-MEM completo adicionado de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Esta etapa neutraliza a tripsina residual presente na suspensão celular. A suspensão de células foi então transferida para garrafas plásticas de 150 cm² e incubadas em atmosfera de CO₂ até sua confluência. As células podem então ser sub-cultivadas para outros frascos e placas de acordo com os experimentos a serem realizados.

4.2 – Vírus e Plasmídeos de Transferência

O vírus parental utilizado neste trabalho foi o *Virus Vaccinia Ankara Modificado* (MVA), gentilmente cedido pelo Dr. B Moss (Laboratory of Viral Diseases – NIAID-NIH, EUA). O Vírus semente foi cedido na forma de extrato de células infectadas com título viral igual a 4×10^9 PFU/ml e foi cultivado em nosso laboratório por três passagens para obtenção de um novo estoque-semente além de estoques-trabalho.

O pLW44 (BISHT *et al.*, 2004) cedido pelo Dr B. Moss, foi utilizado como vetor de transferência para inserção do gene recombinante no genoma do vírus MVA. O

plasmídiopLW44 (Figura 12) possui um cassete de expressão onde o gene exógeno é controlado por um promotor forte dos poxvírus (mH5). No caso, o gene codificador da proteína E de DEN3 foi obtido por RT-PCR e clonado no vetor, ficando sob controle do promotor mH5. Este cassete é flanqueado por seqüências de DNA homólogas às seqüências presentes no genoma do vírus, e servirão para dirigir a recombinação ao locus desejado. No caso do plasmídiopLW44, o gene exógeno foi inserido no sítio denominado Região de Deleção III do genoma do vírus MVA. Contíguo ao gene exógeno e dentro da região flanqueada pelas seqüências homólogas à região de Deleção III, também está presente o gene codificador da Proteína Verde Fluorescente (GFP), expressa sob controle de um promotor tardio do *Vaccinia virus*.

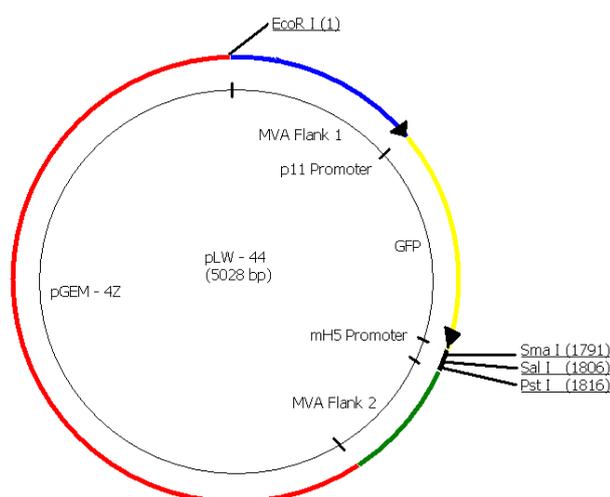


Figura 12 – PlasmídiopLW44, utilizado como vetor de transferência durante a construção de vírus recombinantes

4.3 – Geração de Vírus Recombinantes.

A construção dos vírus recombinantes foi baseada na recombinação homóloga dos vírus MVA em células infectadas na presença dos plasmídios de transferência, pLW44/DENV-3E.

Assim, monocamadas de CEF em uma placa de 6 cavidades foram infectadas com vírus MVA, m.o.i. de 1, em 500 µL de meio MEM incompleto (sem soro). Uma

cavidade da placa foi reservada para controle de células, sendo acrescentados 500 µL de meio MEM incompleto. A adsorção foi realizada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e com homogeneização constante durante 1 hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas, duas vezes, com meio Opti-MEM® I (GIBCO) e, em seguida, foi realizado a transfecção com o plasmídiopLW44/DENV-1E. Para isso, 1 mL de uma solução contendo os “complexos de lipofectamina” foi adicionado a cada cavidade da placa. Os “complexos de lipofectamina” foram preparados, misturando uma solução contendo 2 µg de pLW44/DENV-3E e 50 µL de Opti-MEM com uma segunda solução contendo 5 µL de lipofectamina e 50 µL de Opti-MEM, sendo o volume completado para 1 mL com Opti-MEM. As células cobertas pela solução com os complexos de lipofectamina foram, então, incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 5 horas. Após esse período, o meio das células foi trocado, colocando 2 mL de meio MEM com 2,5% de SFB em cada cavidade. A placa foi incubada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, permitindo a ocorrência da recombinação homóloga entre o genoma viral e o plasmídeo de transferência. Em seguida, as monocamadas de células foram raspadas, com o auxílio de raspadores, e as soluções resultantes foram centrifugadas por 2 minutos a 2.500 rpm. Os sedimentos foram suspensos em 500 µL de meio MEM incompleto e essa suspensão foi congelada e descongelada em refrigerador -70°C por três vezes, para lise das células infectadas. Finalmente, a suspensão foi armazenada a -70°C para posterior seleção dos vírus recombinantes.

4.4 Seleção dos Vírus Recombinantes

Os vírus MVA recombinantes foram selecionados por meio de sucessivos ensaios de purificação de placa.

Para cada ensaio, foram realizadas diluições seriadas, em meio MEM incompleto, da suspensão viral que foi obtida na etapa anterior. Em seguida, 500 µL de cada diluição foi utilizado para infectar as respectivas monocamadas de CEF em uma placa de 6 cavidades, sendo uma cavidade da placa reservada para controle de célula. A adsorção foi realizada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e com

homogeneização constante durante 1 hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas com PBS 1X e foi acrescentada uma mistura contendo solução de agarose 2% e meio MEM 2X (GIBCO) suplementado com 2,5% de SFB, antibióticos, glutamina. As placas foram, então, novamente incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO₂ por 48 horas. Após esse período, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência e as placas com fluorescência verde, devido à expressão do gene para a proteína GFP, foram coletadas com o auxílio de ponteiros e transferidas para microtubos contendo 500 µL de MEM incompleto. Essa suspensão foi congelada e descongelada em refrigerador -70°C por três vezes, para lise das células infectadas e, em seguida, armazenada a -70°C para posterior uso.

4.5 Amplificação Viral

O clone do vírus MVA recombinante selecionado foi, inicialmente, amplificado por meio de passagens subseqüentes em placas de 12 e 6 cavidades e em garrafas de 25, 75 e 150 cm², de modo à se obter um título viral adequado. Essas ampliações foram realizadas da mesma forma descrita no item 4.4, com modificações apenas no que se refere ao volume final de adsorção e ao volume de meio MEM 2,5% SFB acrescentado ao final da adsorção.

4.6 Detecção da Expressão da Proteína Recombinante E

Para este estudo monocamadas de CEF em uma placa de 6 cavidades foram infectadas com o vírus *Vaccinia vírus WR* e transfectadas com o plasmídeo pLW44/DENV3-E, como descrito anteriormente, contudo nesta etapa foram infectadas e transfectadas células BSC 40. A placa foi incubada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas.

Para o segundo momento, monocamadas de CEF em uma placa de 6 cavidades foram infectadas com 500 µL do vírus MVA selvagem utilizando-se uma m.o.i. de 1. Uma cavidade da placa foi reservada para controle de células, sendo acrescentado 500 µL de meio MEM puro. A adsorção foi realizada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e com homogeneização constante durante 1 hora. Após a adsorção, as

monocamadas de células foram lavadas, duas vezes, com PBS 1X e, em seguida, foi adicionado, em cada cavidade, 2 mL de meio MEM com 2,5% de SFB. A placa foi incubada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas.

Após as 48 horas, as monocamadas de células foram raspadas, com o auxílio de raspadores de silicone, e as soluções resultantes foram centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm. Os sedimentos foram suspensos com 50 µL de tampão de amostra (240 mM Tris-HCl pH 6,8; glicerol a 40%; SDS a 0,8%; azul de bromofenol a 0,02%; 200 mM β-mercaptoetanol), resultando nos extratos protéicos. Estes foram, então, submetidos ao *Western blot* para detecção da expressão da proteína recombinante.

4.7 RT- PCR

4.7.1- Síntese do cDNA

Para produção de DNA complementar (cDNA), 7 µl de RNA extraído foram adicionados a 50 pmol do oligonucleotídeo iniciador anti-senso (da Fonseca dados não publicados) sendo incubados a 70°C, por 5 minutos. Após incubação no gelo, foram adicionados à reação: 4 µl de tampão de RT- PCR 1X (20 mM TRIS-CL pH 8,4, 50 mM KCL), 2 µl de DTT (0,01M ditioneitol) e 2 µl de dNTPs (10mM), seguindo uma incubação a 42 ° C por 5 minutos. No terceiro ciclo foi adicionado 1 µl de enzima M-MLV RT (200U/ µl) (Promega Corporation, EUA) e incubado por 50 minutos a 42°C, passando a 70°C por 15 minutos e, em seguida, o cDNA foi mantido a -20°C.

4.7.2 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção do *Dengue virus* sorotipo 3 (da Fonseca, dados não publicados) estão representados na TABELA 3. Foram utilizados 5 µl ou 10 µl de cDNA, 5 µl de Tampão 10X, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador D1 e D2, 4 µl de MgCl₂ (2,5 mM), 1 µl de dNTP's (10 mM)

(dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e 1 µl de Taq polimerase (Promega Corporation, EUA) (5U/µl) e H₂O q.s.p. 50 µl). As reações foram cobertas com óleo mineral estéril para evitar a evaporação de material.

As amplificações foram feitas em termociclador Perkin Elmer Cetus (Perkin, USA) modelo 2400 nas seguintes condições 2 minutos a 95^oC – 1 ciclo; 95^oC 1 minuto, 58^oC 30 segundos, 72^oC 2 minutos – 30 ciclos, 10 minutos a 72^oC.

TABELA 4 - Oligonucleotídeos iniciadores (Desenhados por da Fonseca FG – não publicado).

Iniciadores	Seqüência (-)
DEN3E-PstR ^x	GAT GGC CAT GCG CTG CAG TAA TCT GGC AGT GGC CTC GAA CAT C
DEN3E-SmaF ^{xx}	TCC CCC GGG ATG AGA TGT GTG GGA GTA GGA AAC AGAG

^x Iniciador anti-senso

^{xx} Iniciador senso

4.8- Eletroforese do DNA em agarose

O produto da reação de PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 2% onde foram analisados os tamanhos dos produtos amplificados por comparação com padrões de tamanhos moleculares. Aproximadamente 10 µl de cada reação foram separados em géis de agarose ultra-pura 0,8% em TBE 1X (0,04M TRIS-ACETATO, 0,001M EDTA), 80 V, acrescidos de 0,5µg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos foram visualizados após exposição do gel à luz UV em transiluminador e o gel foi fotografado.

4.9 - Transformação de bactérias (SAMBROOK & RUSSEL, 2000)

Na transformação, 5 μ l do material proveniente da ligação foram adicionados a 100 μ l de *Escherichia coli* DH5 α quimicamente competentes em gelo. Os tubos foram levemente agitados e imediatamente incubados em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida foi feito o choque térmico, incubando-se os tubos por 3 minutos a 42°C e novamente resfriando-os em banho de gelo. Em seguida, 1mL de meio LB 1X sem antibiótico foi adicionado a cada tubo que ficará incubado a 37 °C por 1 hora. A cultura bacteriana resultante foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O volume de 1 mL do sobrenadante foi removido e os 100 μ l restantes foram utilizados para suspender o sedimento. Cerca de 30 μ l e 70 μ l da suspensão bacteriana foram plaqueados em meio LB-ágar (1% bacto-triptona, 0,5% bacto-extrato de levedura, 1% de NaCl, 1% Agar) contendo ampicilina (50 μ g/mL), IPTG (0,4 M) e X-gal (50 mg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C, por 16 horas. Paralelamente, foram feitos controles do crescimento de bactérias competentes não transformadas em placas de LB-ágar na presença e ausência de ampicilina.

4.10 - Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pelo método descrito por SANGER *et al.*, (1977) em sequenciador automático capilar Mega Bace1000 (Amersham/Pharmacia, Suécia), utilizando iniciadores universais M13 e o Kit *Dy Enamic ET Dye Terminator cycle Sequencing Kit for Megabace*, obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

4.11 - Análise das sequências de DNA

Para cada fragmento foram feitas duas reações de seqüenciamento, cada uma com um dos iniciadores. As seqüências obtidas foram sobrepostas e a sequencia final editada utilizando o program CAP3 ([Sequence Assembly Program](http://pbil.unvlyon1.fr/cap3.php) (<http://pbil.unvlyon1.fr/cap3.php>)).

As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Aligment Tool, ALTSUCHL *et al*, 1990) As seqüências nucleotídicas foram analisadas pelo programa BLAST N e as seqüências inferidas de aminoácidos vão ser analisadas pelo programa BLAST X. Os valores de corte utilizados para as análises foram os seguintes: para se considerar um gene com similaridade significativa com alguma seqüência já depositada no banco de dados, este deverá apresentar um valor “score” maior que 100 e um valor de P (probabilidade) menor que 0,005, ou um valor de *e value* menor que 10^{-5} independentemente do valor do “score”.

- Clustal W “Multiple Sequence Alignment” (THOMPSON *et al.*, 1994).
- Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin.html>).

Os alinhamentos foram utilizados para verificar se a construção dos plasmídeos contendo os gene recombinante, E de DEN-3, ocorrerá de forma correta.

A análise da viabilidade da proteína gerada DEN3-E foi gerada em um ensaio *in silico* com o programa SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant - <http://blocks.fhcrc.org/sift/>) que prediz se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína baseado na homologia da seqüência e nas propriedades físicas dos aminoácidos. Depositando a seqüência de interesse, SIFT procura e escolhe por seqüências similares depositadas no banco de dados, fazendo o alinhamento destas seqüências e calcula os “scores” baseado na freqüência da presença de um determinado aminoácido em cada posição do alinhamento.

4.12 - Western blot

Para a realização do *Western blot*, os extratos protéicos foram, inicialmente, aquecidos a 100°C por 5 minutos, no intuito de desnaturar as proteínas. Essas amostras foram, então, fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% a um potencial elétrico de 60 V até sair do gel de empilhamento e depois a 120 V. Após o fracionamento, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond™-ECL™, Amersham Biosciences) por 1 hora e 30 minutos a um potencial elétrico constante de 90 V. Em seguida, foi realizado o bloqueio, deixando a membrana por 1 hora à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C em tampão de bloqueio 2,5% [2,5% (p/v) de leite desnatado em pó em TTBS 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e Tween-20 a 0,1%)]. A reação com os anticorpos primários (anticorpos policlonais contra o vírus da Dengue 1+2+3+4, ab9200, Abcam®), foi realizada durante 1 hora à temperatura ambiente e esses foram usados na concentração 1:10.000. Posteriormente, as membranas foram lavadas com tampão de bloqueio 0,5% por três vezes, 10 minutos cada. A reação com os anticorpos secundários (anticorpos policlonais anti-IgG HRP, ab6721, Abcam®) também ocorrerá durante 1 hora à temperatura ambiente, em uma concentração 1:10.000, e foi seguida de 3 lavagens com tampão de bloqueio 0,5%. Por último, as membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL™ Plus *Western blotting* Detection System (GE Healthcare) e o filme Kodak T-MAT G/RA, conforme instruções do fabricante.

Fluxograma de trabalho

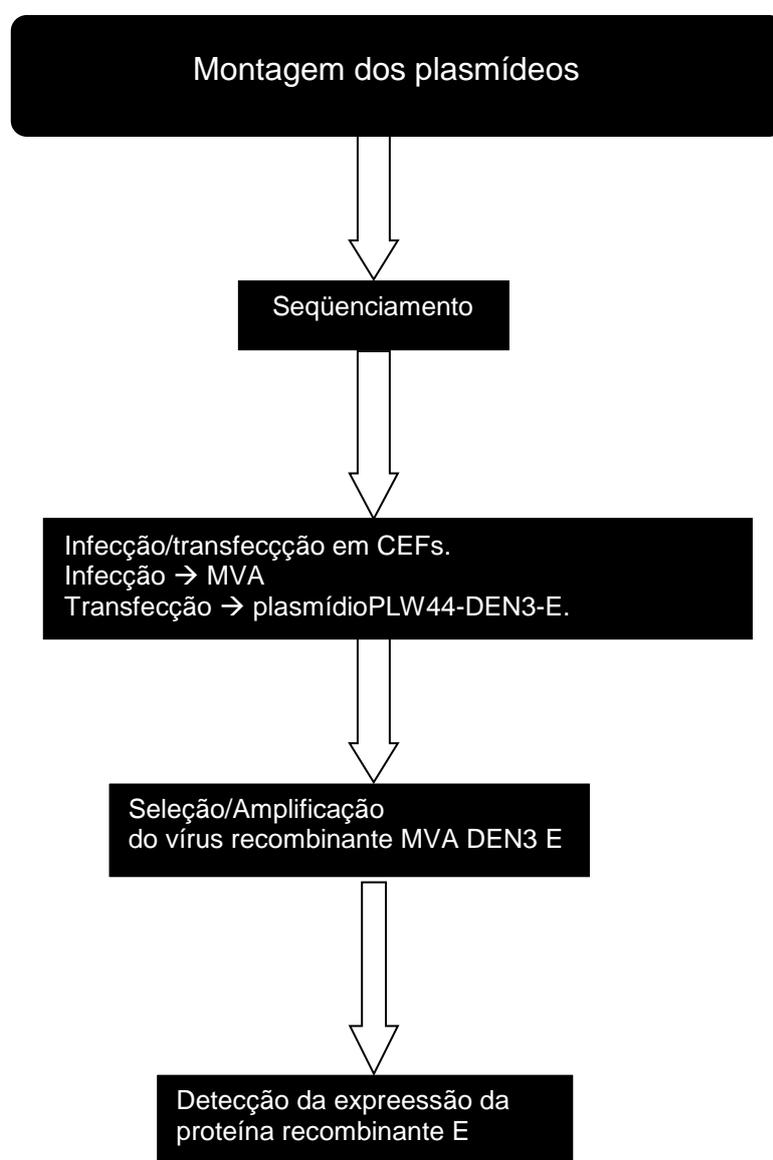


Figura 13: Representação esquemática do fluxograma de trabalho.

V RESULTADOS

5.1 Obtenção do plasmídiode clonagem pGEM-T Easy contendo o inserto codificante para a proteína DEN3-E.

Objetivando-se a obtenção do c-DNA codificando o gene da proteína E para o sorotipo 3 de *Dengue virus* foi realizado uma reação de RT-PCR a partir da amostra RNA Den3 Piauí #52 preparada pela aluna de doutorado do laboratório de vírus Leandra Barcelos Figueiredo . O c-DNA foi então purificado e ligado no plasmídiode clonagem pGEM-T Easy. Estas ligações foram utilizadas na transformação de bactérias DH-5 α , os clones obtidos desta transformação foram então analisados por teste de resistência à ampicilina e ensaio de PCR de colônia, para a confirmação da presença de inserto nos vetores. A amplificação da sequência correspondente ao gene da proteína DEN3-E foi realizada por iniciadores DEN3-E-PstR (anti-senso), e DEN3-E-SmaF (senso) que inseriram sítios de restrição para as enzimas PstI e SmaI respectivamente. O produto amplificado gerou uma banda de aproximadamente 1200 pares de bases, analisadas de acordo com um padrão de tamanho molecular *Ladder* de 1 kb. (Figura 14)

Uma vez obtida à amplificação do fragmento correspondente a DEN3-E, foi feita uma extração de DNA plasmidial para que os clones positivos pudessem ser seqüenciados a fim de se verificar a qualidade do gene correspondente a proteína E, obtida quando comparada com outras amostras depositadas no *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta análise indicou que a seqüências do inserto obtido possui alta similaridade com as seqüências de nucleotídeos (figura 15) e aminoácidos (figura 16) (*score* > 100; *P* < 0,005; e *value* <10⁻⁵) para a proteína E do DEN3. Além disso, análises *in silico* utilizando o software SIFT demonstram que não existem variações na seqüência do inserto do gene de interesse que possam comprometer a expressão da proteína a ser gerada (Figura 17).

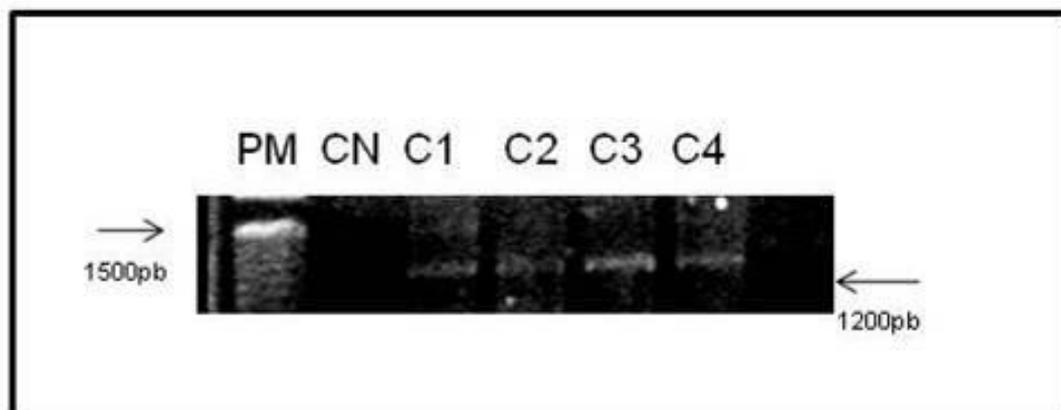


FIGURA 14: Gel de agarose mostrando fragmentos de DNA amplificados por PCR a partir de clones bacterianos contendo o gene correspondente para a proteína E do sorotipo 3 de *Dengue virus*. Os clones foram transformados com o inserto codificante para DEN3-E, selecionados por resistência à ampicilina e submetidos à PCR para averiguar a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1200pb. Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. PM: 1 – padrão de tamanho molecular de 1 kb promega; CN – controle negativo da PCR; C2, C3, C4 – amplicon gerado a partir dos clones selecionados.

#Clon3_E	ATG	AGA	TGT	GTG	GGA	GTA	GGA	AAC	AGA	GAT	TTT	GTG	GAA	GGT	CTA	TCA
#101874/BR-PE
#DE3US/BID-V2119/2002
#BR_DEN3_290-02
#D3BR/PV2/03
#Den3_E_D3BR/BR8/04
#BIDV1616
#OBT412/TUMBES
#BIDV1451
#D3BR/RT1/2003
#Den3_E_D3PY-15/02
#Clon3_E	GGA	GCT	ACG	TGG	GTT	GAC	GTG	GTG	CTC	GAG	CAC	GGA	GGG	TGT	GTG	ACT
#101874/BR-PEG
#DE3US/BID-V2119/2002G
#BR_DEN3_290-02AAG
#D3BR/PV2/03G
#Den3_E_D3BR/BR8/04G
#BIDV1616G
#OBT412/TUMBESG
#BIDV1451GC
#D3BR/RT1/2003G
#Den3_E_D3PY-15/02G
#Clon3_E	ACC	ATG	GCT	AAG	AAC	AAG	CCA	ACG	TTG	GAT	ATA	GAG	CTT	CAG	AAG	ACC
#101874/BR-PE
#DE3US/BID-V2119/2002A
#BR_DEN3_290-02
#D3BR/PV2/03
#Den3_E_D3BR/BR8/04
#BIDV1616
#OBT412/TUMBES
#BIDV1451C
#D3BR/RT1/2003
#Den3_E_D3PY-15/02
#Clon3_E	GAG	GCC	ACC	CAA	TTG	GCG	ACC	CTA	AGG	AAG	CTA	TGC	ATT	GAG	GGG	AAA
#101874/BR-PE
#DE3US/BID-V2119/2002
#BR_DEN3_290-02
#D3BR/PV2/03
#Den3_E_D3BR/BR8/04
#BIDV1616T
#OBT412/TUMBES
#BIDV1451C
#D3BR/RT1/2003
#Den3_E_D3PY-15/02
#Clon3_E	ATT	ACC	AAC	ATA	ACA	ACT	GAC	TCA	AGA	TGT	CCT	ACC	CAA	GGG	GAA	GCG
#101874/BR-PE
#DE3US/BID-V2119/2002
#BR_DEN3_290-02
#D3BR/PV2/03
#Den3_E_D3BR/BR8/04C
#BIDV1616
#OBT412/TUMBES
#BIDV1451
#D3BR/RT1/2003
#Den3_E_D3PY-15/02
#Clon3_E	GTT	TTG	CCT	GAG	GAG	CAG	GAC	CAG	AAC	TAC	GTG	TGT	AAG	CAT	ACA	TAC
#101874/BR-PE
#DE3US/BID-V2119/2002G
#BR_DEN3_290-02
#D3BR/PV2/03
#Den3_E_D3BR/BR8/04
#BIDV1616
#OBT412/TUMBES
#BIDV1451
#D3BR/RT1/2003
#Den3_E_D3PY-15/02
#Clon3_E	GTA	GAC	AGA	GGC	TGG	GGG	AAC	GGA	TGT	GGT	TTG	TTT	GGC	AAG	GGA	AGC
#101874/BR-PE
#DE3US/BID-V2119/2002

```

#BR_DEN3_290-02      ... ..
#D3BR/PV2/03        ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616           ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451           ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E            TTG GTA ACA TGT GCG AAA TTT CAA TGC CTG GAA CCA ATA GAG GGA AAA
#101874/BR-PE      ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02    ... ..
#D3BR/PV2/03        ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616           ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451           ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E            GTG GTG CAA TAT GAG AAC CTC AAA TAC ACC GTC ATC ATC ACA GTG CAC
#101874/BR-PE      ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02    ... ..
#D3BR/PV2/03        ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616           ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451           ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E            ACA GGA GAT CAA CAC CAG GTG GGA AAC GAA ACG CAG GGA GTC ACG GCT
#101874/BR-PE      ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02    ... ..
#D3BR/PV2/03        ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616           ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451           ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E            GAG ATA ACA CCT CAG GCA TCA ACC ACT GAA GCC ATC TTG CCT GAA TAT
#101874/BR-PE      ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02    ... ..
#D3BR/PV2/03        ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616           ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451           ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E            GGA ACC CTT GGG TTA GAA TGC TCA CCA CGG ACA GGT TTG GAT TTC AAT
#101874/BR-PE      ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02    ... ..
#D3BR/PV2/03        ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616           ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451           ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E            GAA ATG ATC TTG CTA ACA ATG AAG AAC AAA GCA TGG ATG GTA CAT AGA
#101874/BR-PE      ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02    ... ..
#D3BR/PV2/03        ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616           ... ..

```

```

#OBT412/TUMBES      ... ..
#BIDV1451           ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E           CAA TGG TTT TTT GAC CTA CCT CTA CCA TGG ACA TCA GGA GCT ACA ACG
#101874/BR-PE     ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02   ... ..
#D3BR/PV2/03      ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616         ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451         ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E           AAA ACA CCA ACC TGG AAC AGG AAG GAG CTT CTT GTG ACA TTT AAA AAC
#101874/BR-PE     G.. ..
#DE3US/BID-V2119/2002 G.. ..
#BR_DEN3_290-02   G.. ..
#D3BR/PV2/03      G.. ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 G.. ..
#BIDV1616         G.. ..
#OBT412/TUMBES     G.. ..
#BIDV1451         G.. ..
#D3BR/RT1/2003     G.. ..
#Den3_E_D3PY-15/02 G.. ..

#Clon3_E           GCA CAT GCG AAG AAA CAA GAA GTA GTT GTC CTT GGA TCG CAA GAG GGA
#101874/BR-PE     ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02   ... ..
#D3BR/PV2/03      ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616         ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451         ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E           GCA ATG CAT ACC GCA TTG ACA GGA GCC ACA GAA ATC CAA AAC TCA GGA
#101874/BR-PE     ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02   ... ..
#D3BR/PV2/03      ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616         ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451         ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E           GGC ACA AGT ATT TTT GCG GGG CAC TTA AAA TGT AGA CTT AAG ATG GAC
#101874/BR-PE     ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02   ... ..
#D3BR/PV2/03      ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616         ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451         ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

#Clon3_E           AAA TTG GAA CTC AAG GGG ATG AGC TAT GCA ATG TGC ACG AAT ACC TTT
#101874/BR-PE     ... ..
#DE3US/BID-V2119/2002 ... ..
#BR_DEN3_290-02   ... ..
#D3BR/PV2/03      ... ..
#Den3_E_D3BR/BR8/04 ... ..
#BIDV1616         ... ..
#OBT412/TUMBES     ... ..
#BIDV1451         ... ..
#D3BR/RT1/2003     ... ..
#Den3_E_D3PY-15/02 ... ..

```

#Clon3_E	GTG TTG AAG AAA GAA GTC TCA GAA ACG CAG CAT GGG ACA ATA CTC ATT
#101874/BR-PE	...
#DE3US/BID-V2119/2002	...
#BR_DEN3_290-02	...
#D3BR/PV2/03	...
#Den3_E_D3BR/BR8/04	...
#BIDV1616	... C ...
#OBT412/TUMBES	...
#BIDV1451	... C ...
#D3BR/RT1/2003	...
#Den3_E_D3PY-15/02	...
#Clon3_E	AAG GTC GAG TAC AAA GGG GAA GAT GCA CCT TGC AAG ATT CCT TTC TCC
#101874/BR-PE	...
#DE3US/BID-V2119/2002	...
#BR_DEN3_290-02	...
#D3BR/PV2/03	...
#Den3_E_D3BR/BR8/04	...
#BIDV1616	...
#OBT412/TUMBES	... T ...
#BIDV1451	... T ...
#D3BR/RT1/2003	... G ...
#Den3_E_D3PY-15/02	...
#Clon3_E	ACA GAG GAT GGA CAA GGG AAA GAC CAC AAT GGC AGA CTG ATT ACA GCC
#101874/BR-PE	... CT ...
#DE3US/BID-V2119/2002	... CT ...
#BR_DEN3_290-02	... CT ...
#D3BR/PV2/03	... CT ...
#Den3_E_D3BR/BR8/04	... C ...
#BIDV1616	... CT ...
#OBT412/TUMBES	... CT ...
#BIDV1451	... CT ...
#D3BR/RT1/2003	... CT ...
#Den3_E_D3PY-15/02	... CT ...
#Clon3_E	AAC CCA GTG GTG ACT AAG AAG GAC GAG CCT GTC AAT ATT GAG GCT GAA
#101874/BR-PE	... G ...
#DE3US/BID-V2119/2002	... G ...
#BR_DEN3_290-02	... G ...
#D3BR/PV2/03	... G ...
#Den3_E_D3BR/BR8/04	... G ...
#BIDV1616	... G ...
#OBT412/TUMBES	... G ...
#BIDV1451	... G ...
#D3BR/RT1/2003	... G ...
#Den3_E_D3PY-15/02	... G ... C ...
#Clon3_E	CCT CCT TTC GGG GAA AGT AAT ATA GTG ATT GGA ATT GGA GAC AAC GCC
#101874/BR-PE	... T ...
#DE3US/BID-V2119/2002	... T ...
#BR_DEN3_290-02	... T ...
#D3BR/PV2/03	... T ...
#Den3_E_D3BR/BR8/04	... T ...
#BIDV1616	... T ...
#OBT412/TUMBES	... T ...
#BIDV1451	... T ... A ...
#D3BR/RT1/2003	... T ...
#Den3_E_D3PY-15/02	... T ...
#Clon3_E	TTG AAA ATC AAC TGG TAT AAG AAA GGA AGC TCC ATT GGG AAG ATG TTC
#101874/BR-PE	... T ...
#DE3US/BID-V2119/2002	... T ...
#BR_DEN3_290-02	... T ...
#D3BR/PV2/03	... T ...
#Den3_E_D3BR/BR8/04	... T ...
#BIDV1616	... T ...
#OBT412/TUMBES	... G ... T ...
#BIDV1451	... C ... G ... T ...
#D3BR/RT1/2003	... T ...
#Den3_E_D3PY-15/02	... T ...
#Clon3_E	GAG GCC ACT GCC AGA TAA CTG CAG CGC ATG GCC A
#101874/BR-PE	... GGT GCA AG ...
#DE3US/BID-V2119/2002	... GGT GCA AG ...

```

#BR_DEN3_290-02      . . . . . GGT GCA AG. . . . .
#D3BR/PV2/03        . . . . . GGT GCA AG. . . . .
#Den3_E_D3BR/BR8/04 . . . . . GGT GCA AG. . . . .
#BIDV1616           . . . . . GGT GCA AG. . . . .
#OBT412/TUMBES     . . . . . GGT GCA AG. . . . .
#BIDV1451           . . . . . GGT GCA AG. . . . .
#D3BR/RT1/2003     . . . . . GGT GCA AG. . . . .
#Den3_E_D3PY-15/02 . . . . . GGT GCA AG. . . . .

```

Figura15. Alinhamento da seqüência genômica de E de dengue 3 clonada em pGEM-T Easy comparada com 10 seqüências depositadas no Gene Bank. As bases inalteradas estão representadas por pontos, as bases alteradas por letras.

```

#Clon3_E      MRCVGVGNRD FVEGLSGAIW VDVVLEHGGC VITMAKNKPT LDIELQKTEA TQLATLRKLC IEGKITNITT DSRCP
#Den3_E_D3BR/ER8/04 .....
#101874/BR-PE .....
#DE3US/BID-V2119/2002 .....
#BR_DEN3_290-02 .....
#D3BR/PV2/03 .....
#BIDV1616 .....
#OBT412/TUMBES .....
#D3BR/RT1/2003 .....
#BIDV1451 .....
#Den3_E_D3PY-15/02 .....

#Clon3_E      TQGEAVLP EE QDQNYVCKRH YVDRGWGNGC GLFGKSLTV CAKQCLEPI EGRVQYENL KYTVIITVHT GDQHQ
#Den3_E_D3BR/ER8/04 .....
#101874/BR-PE .....
#DE3US/BID-V2119/2002 .....S.....
#BR_DEN3_290-02 .....
#D3BR/PV2/03 .....
#BIDV1616 .....
#OBT412/TUMBES .....
#D3BR/RT1/2003 .....
#BIDV1451 .....
#Den3_E_D3PY-15/02 .....

#Clon3_E      VGNETQGVTA EITPQASTIE AILPEYGTLG LECSPRTGLD FNEMILLTMK NKAMGVHRQW PFDLPLPWTG GATIK
#Den3_E_D3BR/ER8/04 .....E.....
#101874/BR-PE .....E.....
#DE3US/BID-V2119/2002 .....E.....
#BR_DEN3_290-02 .....E.....
#D3BR/PV2/03 .....L.....E.....
#BIDV1616 .....E.....
#OBT412/TUMBES .....E.....
#D3BR/RT1/2003 .....E.....
#BIDV1451 .....E.....
#Den3_E_D3PY-15/02 .....E.....

#Clon3_E      TPTWNRKELL VTFKNAHAKH QEVVVLGSQE GAMHTALTGA TEIQNSGGTS IFAGHLKRLK FMDKLELKGK SYAMC
#Den3_E_D3BR/ER8/04 .....
#101874/BR-PE .....
#DE3US/BID-V2119/2002 .....
#BR_DEN3_290-02 .....
#D3BR/PV2/03 .....
#BIDV1616 .....
#OBT412/TUMBES .....
#D3BR/RT1/2003 .....S.....
#BIDV1451 .....
#Den3_E_D3PY-15/02 .....

#Clon3_E      TNIFVLKREV SETQHGTEILI KVEYKGEDAP CRIPFSTEDG QGRDNGRLI TANFVVIRED EPVNIEAEPF FGESH
#Den3_E_D3BR/ER8/04 .....A.....A.....E.....
#101874/BR-PE .....A.....A.....E.....
#DE3US/BID-V2119/2002 .....A.....A.....E.....
#BR_DEN3_290-02 .....A.....A.....E.....
#D3BR/PV2/03 .....A.....A.....E.....
#BIDV1616 .....A.....A.....E.....
#OBT412/TUMBES .....V.....A.....E.....
#D3BR/RT1/2003 .....R.....A.....E.....
#BIDV1451 .....V.....A.....E.....
#Den3_E_D3PY-15/02 .....A.....A.....E.....

#Clon3_E      IVIGIGDNAL KINWYKKGSS IGRMFEATAR *LQKMA
#Den3_E_D3BR/ER8/04 .....GAR...344...360
#101874/BR-PE .....GAR...
#DE3US/BID-V2119/2002 .....GAR...
#BR_DEN3_290-02 .....GAR...
#D3BR/PV2/03 .....GAR...
#BIDV1616 .....GAR...
#OBT412/TUMBES .....GAR...
#D3BR/RT1/2003 .....GAR...
#BIDV1451 .....GAR...
#Den3_E_D3PY-15/02 .....GAR...

```

225

Figura 16. Alinhamento da seqüência primária de E de dengue 3 obtidas das amostras depositadas no gen bank (Den3_E_D3BR/BR8/04, 101874/BR-PE, DE3US/BID-V2119/2002, BR_DEN3_290-02, D3BR/PV2/03, BIDV1616, OBT412/TUMBES, D3BR/RT1/2003, BIDV1451, Den3_E_D3PY-15/02) com a seqüência de E clonada no vetor pGEM-T Easy (clone 3). Os aminoácidos inalterados estão representadas por pontos, os aminoácidos alterados do clone 3 em relação aos demais estão destacados dentro de retângulos e são encontrados nas posições 225,344, e 360 da seqüência primária da proteína E.

Aminoácidos não tolerados	Posição	Seq Rep	Aminoácidos tolerados
wf y h m c r i e q g k v p n a L	223T	1.00	D T S
y w v s r q p n m l k i h g f e d c a	224T	1.00	T
wf c m i y v h l p d g e n a t r	225K	1.00	K Q S
w m f i y c h l v r e p k	226T	1.00	d n s a T G Q
w c f m v i h l r v n t g k a a d	227P	1.00	P S E
w d f c y m h n g p s	343K	1.00	i e l t q A K R V
w f m y c r l q p k	344D	1.00	g e v I a n D H s T
w c y f m p d g n s i t	345H	1.00	e l a r H k V Q
w c y h q r e t k p s a f m v d	346N	1.00	g i L N
y w v t s r q p n m l k i h f e d c a	347G	1.00	G
y w v t s q p n m l k i h g f e d c a	348R	1.00	R
d h g n e c w s r k y p q t a f m i	349L	1.00	V L
h w q d n p e r c g k s y t m a f l V	350I	1.00	I
y w v s r q p n m l k i h g f e d c a	351T	1.00	T
w h y f n d r q m e k c p l i t s g	352A	1.00	V A
y w v t s r q p m l k i h g f e d c a	353N	1.00	N
y w v t s r q n m l k i h g f e d c a	354P	1.00	P
h q w d p n e r c k g s y a t m f l	355V	1.00	V I
y w t s r q p n m l k i h g f e d c a	356V	1.00	V
y w v s r q p n m l k i h g f e d c a	357T	1.00	T
c w m f i y l v h r g t n s p a q	358K	1.00	K E D
y w v t s r q p n m l i h g f e d c a	359K	1.00	K
c w m f i y l v h r g t n s p a k q	360D	1.00	D E

Figura 17. Análise da viabilidade da proteína DEN3-E do clone 3. As alterações encontradas na seqüência primária da proteína não representaram alterações na sua viabilidade funcional quando analisadas por SIFT. Figura: Aminoácidos que não seriam tolerados estão situados a esquerda da figura. Ao centro se encontra a posição dos aminoácidos na seqüência primaria de E, ao lado “seq rep” é a fração de seqüência no banco de dados que contém um dos aminoácidos. Uma baixa fração indica que o aminoácido é pouco relacionado aqueles encontrados no banco de dados e tem pouca informação. À direita estão localizados os aminoácidos que são tolerados na posição indicada e que não inviabilizam a funcionalidade da proteína. Em maiúsculo estão representados os aminoácidos encontrados na seqüência e em minúsculo os aminoácidos que não foram encontrados. Os aminoácidos verificados alterados estão destacados por um retângulo.

5.2 Obtenção do plasmídio de transferência pLW44 contendo o inserto codificante para a proteína DEN3-E.

Para a obtenção do inserto no vetor pLW44 o clone 3 (pGEM-T DEN3-E) foi digerido com as enzimas SmaI e PstI e os fragmentos gerados foram analisados em gel de agarose (Figura 18). O fragmento correspondente a proteína E foi recortado do gel de agarose, purificado e ligado no vetor de transferência pLW44.

Os produtos das ligações de pLW44-DEN3-E foram utilizados na transformação de bactérias DH-5 α . Os clones obtidos foram então selecionados quanto à resistência à ampicilina e submetidos a ensaios de PCR e digestão (Figuras 18). A transformação de bactérias DH-5 α gerou 15 clones, dos quais 11, quando submetidos a reação de PCR de colônia geraram amplicons com aproximadamente 1200 pb correspondente ao inserto codificante para a proteína E de DEN-3. Análises de digestão dos vetores pLW44 com as enzimas SmaI e PstI revelou resultados similares corroborando os resultados da PCR (Figura 19).

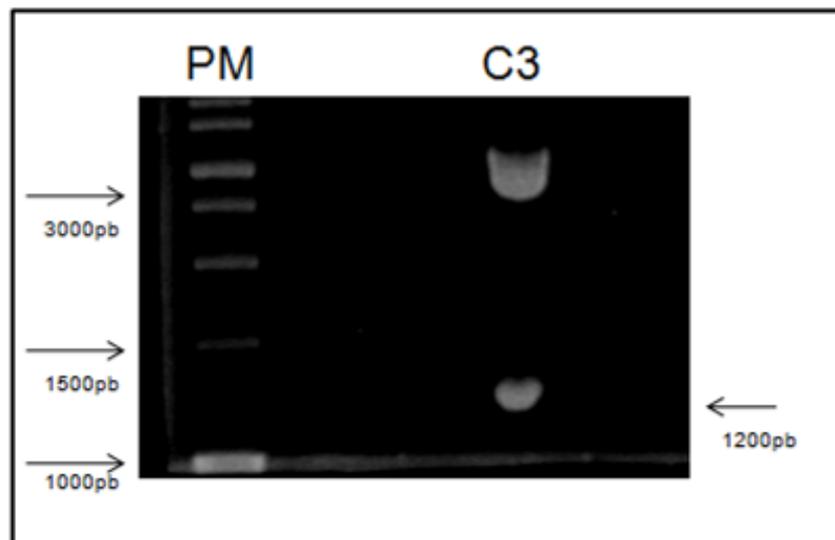


Figura 18. Análise da digestão do inserto clonado em pGEM-t Easy (clone 3). Vetor digerido e resolvido em gel de agarose 0,8%. PM: – Padrão de tamanho molecular 1kb, C3 – clone 3 que liberou um inserto esperado.

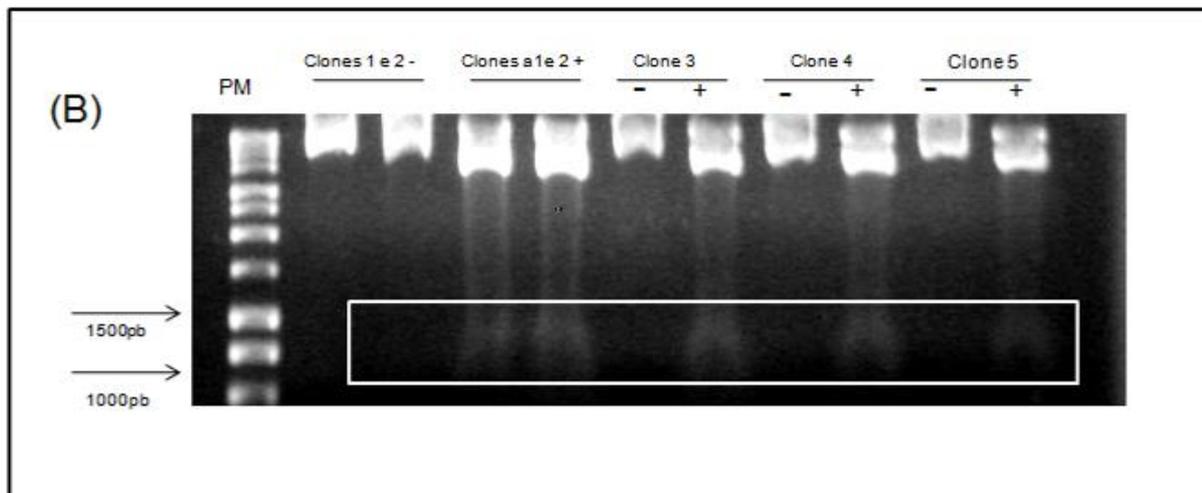
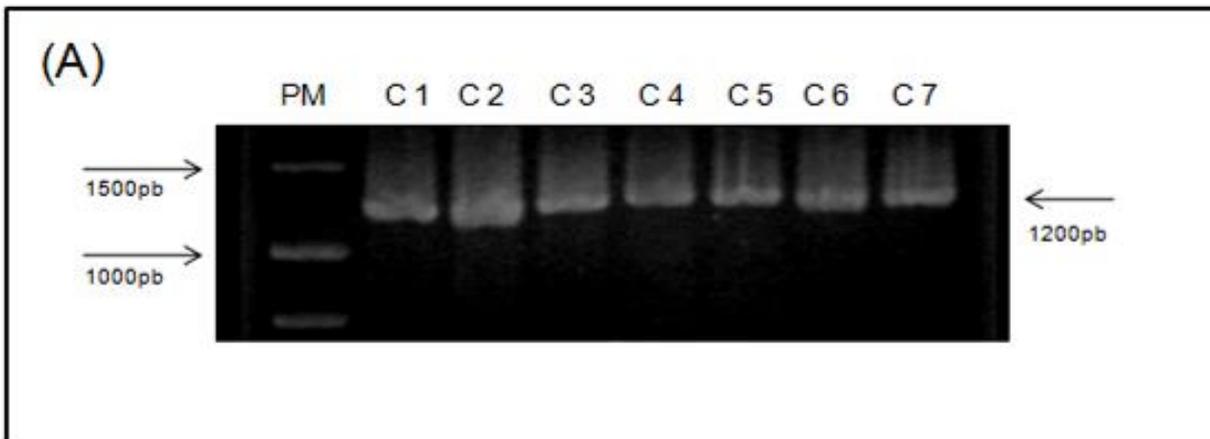


Figura 19. Análise da presença de insertos em clones transformados com pLW44/ DEN3-E. Os clones de bactérias DH-5 α foram analisados por digestão de DNA e por PCR de colônias. (A) PCR de colônia (iniciadores DEN3-E-PstI_R_ e DEN3-E-SmaI F): amplificação de E em 7 clones. PM – padrão de tamanho molecular de 1kb; C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7 - PCR de 7 colônias. (B) Vetores de 5 clones positivos na PCR digeridos + ou não – com SmaI e PstI e resolvidos em gel de agarose 0,8%. Os insertos estão destacados na área do retângulo branco. Canaletas: 2,3,6,8 e 10 – vetores não digeridos; 4,5,7,9,11 – digeridos com SmaI e PstI, 1 padrão de tamanho molecular 1kb.

5.3 Avaliação da construção pLW44-DEN3-E.

Uma vez que dispúnhamos do vetor de transferência pLW44 contendo o inserto codificante para a proteína E de DEN3, partimos para a avaliação se o produto protéico desta construção seria detectável por reação por anticorpo anti-DEN-E. Para tanto, células BSC-40 foram infectadas por *Vaccinia virus* WR e então transfectadas com o vetor pLW44DEN3-E. A infecção concomitante por *Vaccinia* vírus WR é necessária para a disponibilização de fatores transcricionais virais que promovem a expressão do vetor. Após 48 horas de transfecção, a monocamada de células foi submetida à extração de proteínas totais, seguida de SDS-PAGE e Western blot com anticorpo anti-DEN-E. A figura 20 A demonstra que os vetores pLW44DEN3-E derivados dos clones C1 – C6 expressaram uma proteína de aproximadamente 53 KDa que corresponde a massa molecular para a proteína DEN3-E.

De modo a avaliar a funcionalidade da construção de pLW44-DEN3-E em células infectadas pelo MVA, células CEFs foram infectadas por este vírus e então transfectadas com o vetor. Após 48 horas de transfecção, a monocamada de células foi submetida à lise mecânica em embolo de seringa, seguida de SDS-PAGE e Western blot com anticorpo anti-DEN-E. A figura 20 B demonstra que as construções C1 e C6 de pLW44DEN3-E são funcionais durante a infecção do MVA, como evidenciado pela expressão da proteína de 53 KDa, DEN3-E (FIG 20 B).

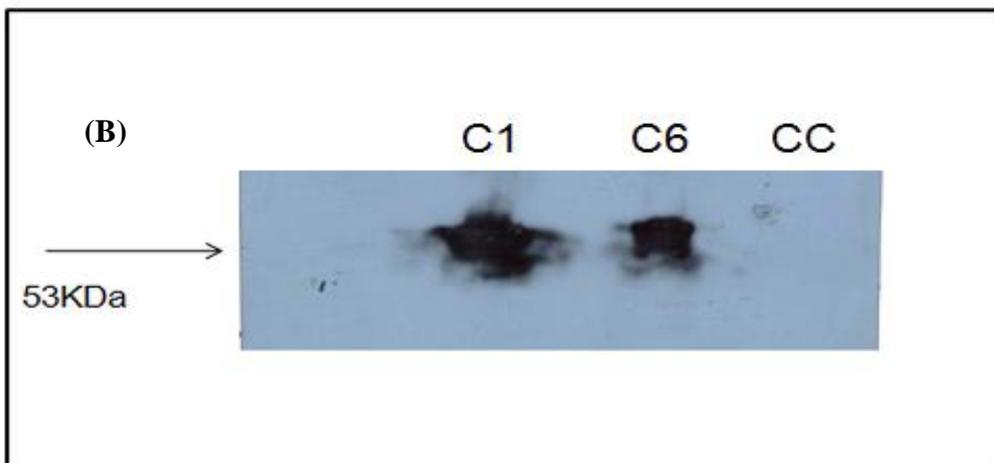
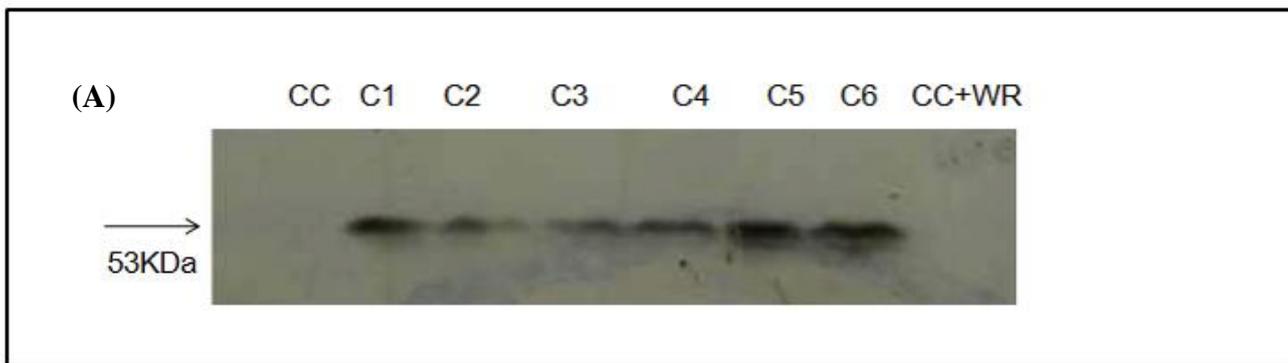


Figura 20. Análise da expressão de DEN3 E em células infectadas com *Vaccinia WR* , ou MVA e transfectadas com pLW44. FIG 20 A - Células BSC 40 foram infectadas com o *Vaccinia* vírus WR na M.O.I de 1 por uma hora e posteriormente transfectadas com pLW44 DEN3-E. Após um período de incubação de 48 horas em estufa à 37°C as células foram processadas para a extração de proteínas totais. A seguir, as alíquotas foram processadas em gel de poliacrilamida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi incubada com anticorpos anti-E e anticorpo secundário marcado com peroxidase. CC: Controle de célula, C1, C2, C3, C4, C5, C6, clones virais que expressaram a proteína, CC+WR controle de célula infectado apenas com WR. FIG 20 B - Células de fibroblasto de embrião de galinha foram infectadas com o vírus MVA na M.O.I de 1, por uma hora e posteriormente transfectadas com pLW44 DEN3-E. Após um período de incubação de 48 horas em estufa à 37°C as células foram processadas como descrito acima (FIG 20 A). C1 e C6 Clones virais ; CC: Controle de célula.

5.4 Geração e amplificação dos clones virais MVA DEN3-E-GFP

De modo a construirmos um MVA recombinante capaz de expressar a proteína DEN3-E e a proteína fluorescente verde (MVA DEN3-E-GFP), células CEFs foram infectadas por MVA e então transfectadas com o vetor pLW44DEN3-E. O GFP permite o monitoramento e seleção de clones recombinantes de MVA através da fluorescência verde em focos de infecção viral. Após a transfecção a monocamada de células foi raspada, congelada e descongelada, sonicada para a liberação de partículas intracelulares e sua individualização. Este material foi diluído seriadamente e utilizado para infectar monocamadas de CEFs para a seleção dos clones virais recombinantes. Após o período de adsorção foi acrescentado o meio semi-sólido (agarose 2%) que impede a disseminação de formas envelopadas virais pelo sobrenadante do cultivo garantindo a individualidade dos focos de infecção. Posteriormente, foram coletadas amostras de clones virais derivados de focos de infecção individualizados visualizados pela emissão de fluorescência verde (Figura 21).

Uma vez obtidos os clones estes foram amplificados através de passagens sucessivas em cultivos crescentes de CEFs.

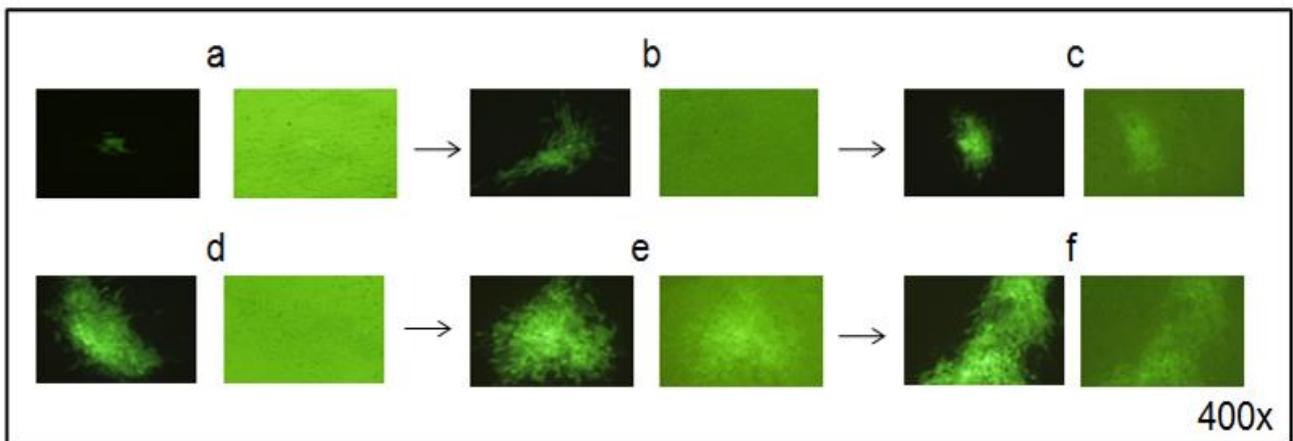


Figura 21. Seleção dos recombinates MVADEN3-E. Os vírus foram selecionados através de microscopia óptica sob luz ultravioleta. Foram realizadas 6 passagens em células de fibroblasto de embrião de galinha, utilizando-se placas de 6 wells, até que os clones atingissem um foco adequado para sua amplificação. Na figura a seleção começa no canto superior esquerdo (a) e segue até (f). A as figuras estão representadas sob a visualização do microscópio de fluorescência a esquerda e sua observação ao microscópio óptico a direita.

VI DISCUSSÃO

Nos últimos 20 anos, a dramática emergência e re-emergência de epidemias causadas por vírus transmitidos por artrópodes vêm alertando a comunidade científica. As razões para essa emergência de arboviroses estão, sem dúvida, relacionadas às mudanças demográficas e sociais tais como: urbanização, superpopulação, número crescente de viagens regionais e internacionais, entre outros fatores. Dentre essas arboviroses, o DENV é atualmente, o mais importante agente causador de doenças humanas (GUBLER, 2002). Mais de 2,5 bilhões de pessoas estão sob risco de infecção pelo DENV. É estimado que cerca de 50 a 100 milhões de casos de DF, 500 mil casos de DHF e mais de 20 mil mortes ocorram a cada ano em todo o mundo. Mais de 100 países nas regiões tropicais possuem infecções endêmicas do DENV e a DHF já foi relatada em mais de 60 desses países (Mackenzie *et al.*, 2004; GUBLER *et al.*, 2007). No Brasil epidemias cada vez maiores ocorrem todos os anos em quase toda a sua extensão. Três sorotipos circulam simultaneamente em 24 dos 27 estados da Federação, contribuindo para a incidência das formas graves da doença, que vem aumentando consideravelmente no país (Câmara *et al.*, 2007).

Durante a última grande epidemia no Rio de Janeiro um estudo sugeriu que o número de casos de pessoas acometidas pela dengue estava associado ao tamanho da população que garantia a sustentação do vírus na mesma. Os índices vetoriais, neste período, estavam abaixo do valor preconizado para epidemia (CÂMARA *et al.*, 2007). Tais estudos indicam que medidas do controle do vetor desta arbovirose dentro dos parâmetros atuais pode não ser suficiente para a prevenção de epidemias. Este fato, aliado à ineficiência dos órgãos públicos em outras regiões no combate ao mosquito, tornam uma vacina tetravalente antidengue, ainda indisponível, a opção mais eficaz no controle desta arbovirose urbana.

O vírus MVA, se apresenta como um forte candidato para a produção de vacinas, uma vez que retém a capacidade de gerar imunogenicidade elevada e duradoura, característica tão inata aos Poxvirus a ponto de torná-los uma das vacinas mais

eficientes já criadas, conforme atestado pelo fim da varíola após estratégia de vacinação com poxvírus heterólogos (Wyatt *et al* 2004). Uma importante característica é a sua capacidade de mimetizar a resposta imunológica gerada durante o curso de uma infecção natural pelo agente contra o qual a vacina está sendo desenvolvida. Assim sendo, tanto a resposta imune humoral, quanto à celular são geradas (FLEXNER & MOSS, 1997). A proteção conferida pelo MVA contra infecções causadas por outros orthopoxvírus já foi comprovada em campo durante a década de 1970, quando esse foi amplamente utilizado na campanha de vacinação contra a varíola, (BELYAKOV *et al.*, 2003; EARL *et al.*, 2004; McCURDY *et al.*, 2004) O MVA é um amostra viral derivada da amostra *Vaccinia virus* Ankara (CVA), atenuada através de passagens sucessivas em CEFs, o que ocasionou grandes deleções em seu genoma. (McFADDEN, 2005) (Figura 22).

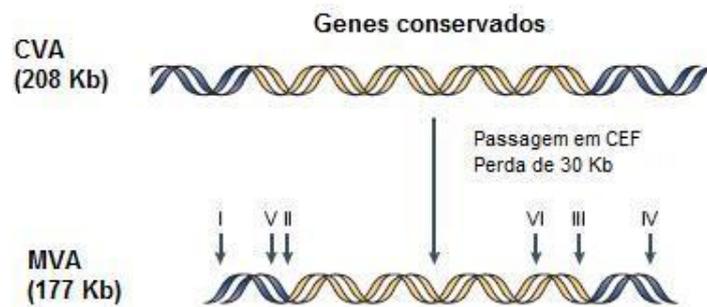


Figura 22 – Origem da amostra MVA. A amostra MVA é derivada do vírus corioalantóide Vaccinia Ankara (CVA) após diversas passagens em CEF, o que resultou na perda de 30 Kb localizadas em 6 regiões principais (I a VI) e na capacidade de multiplicar na maioria das células de mamíferos. Fonte: McFADDEN, 2005.

Dessa forma, objetivamos neste trabalho construir vetores vacinais recombinantes, baseados no vírus MVA, que expressem a proteína E do DEN-3. Esses, por sua vez, poderão ser utilizados para a geração de vacinas tetravalentes contra o DENV. Optamos por produzir um MVA recombinante capaz de expressar a proteína exógena DEN3-E truncada, sem parte de sua extremidade C terminal, deixando a proteína expressa com aproximadamente 80% de sua seqüência primária completa. Testes de rádio-imunoprecipitação demonstraram que os vetores vacinais MVA construídos com 80% da proteína E induziam altos títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos enquanto que testes realizados com a proteína completa induziram uma resposta humoral mais fraca. Macacos que receberam três doses das vacinas MVA homólogas para *Dengue virus* sorotipo 2 que expressavam a proteína E truncada, foram completamente protegidos quando desafiados (MEN *et al.*,2000).

De modo a obtermos o gene codificador para a proteína E de DEN3 foram então utilizados iniciadores DEN3-E-PstR (anti-senso), e DEN3-E-SmaF (senso) que inseriram sítios de restrição para as enzimas PstI e SmaI específicos para a realização de RT-PCR que foi realizado a partir de uma amostra de RNA extraída de soro de um paciente infectado por Den3 no Piauí. Uma vez obtido a amplificação do fragmento que possuía ~ 1200 pares de base (80% do genoma de E) estes amplicon foi recortado do gel de agarose, purificado e ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy. Estas ligações foram utilizadas na transformação de bactérias DH-5 α e os clones obtidos desta transformação foram então analisados por PCR, e em seguida foi feita uma extração do DNA dos clones positivos para que pudessem ser seqüenciados. A análise do seqüenciamento do inserto correspondente a DEN3-E apontou a ocorrência de algumas transições e transversões de nucleotídios. A figura 16 mostra que 3 alterações resultaram em mudanças na seqüência primária da proteína, porém estas alterações são toleráveis, como observado através de averiguação da viabilidade dos aminoácidos alterados no programa SIFT (FIG 17).

A próxima etapa consistiu na clonagem de Den3 E 80% no plasmídio pLW44, o vetor de transferência, essencial para a geração do MVA recombinante. Este plasmídio possui sítio de clonagem a jusante do promotor viral precoce/tardio mH5, permitindo a expressão do gene de interesse durante todo o ciclo infectivo viral. Nesta

construção, o cassete de expressão é flanqueado por seqüências de DNA homólogas às seqüências presentes no genoma do vírus permitindo sua recombinação no locus desejado (Região de Deleção III do genoma do vírus MVA). Além disso, este cassete também possui em sua seqüência o gene codificador para a Proteína Verde Fluorescente (GFP), o que nos permite selecionar o MVA-DEN3-E através da emissão de fluorescência verde (expressão do gene repórter – GFP) em células infectadas.

De modo a verificar a funcionalidade das construções pLW44-DEN3-E durante as infecções pelo *Vaccinia vírus* WR e MVA, células infectadas por estes vírus foram transfectadas e analisadas quanto a expressão de DEN3-E através de *Western blot*. Os resultados apresentados na figura 20 demonstram que as construções foram capazes de expressar a proteína DEN3-E configurando-se como candidatas para a geração de MVAs recombinantes.

Os vetores vacinais MVA-DEN3-E foram então construídos através do processo de recombinação homóloga em células de fibroblasto embrião de galinha infectadas na presença de plasmídeos de transferência pLW-44-DEN3-E. Os clones recombinantes obtidos foram então selecionados quanto à expressão de GFP sob microscopia de fluorescência. Esta estratégia permite não só a diferenciação dos vírus recombinantes de eventuais vírus selvagens, como também a visualização inequívoca de focos de infecção, dado que o MVA é incapaz de formar placas de lise em cultivos celulares (Earl e Moss, 1991).

Durante a etapa de amplificação viral enfrentamos dificuldades técnicas que inviabilizaram a geração de um estoque de MVA-DEN3-E purificado. Tal dificuldade se caracteriza pelo surgimento de mutantes incapazes de expressar GFP durante as etapas de amplificação em grandes quantidades de células ($> 5 \times 10^6$). O surgimento de mutantes é comum em passagens sucessivas em cultivo de célula sendo um fenômeno que ocorre devido à seleção de variantes virais mais adaptados, como por exemplo, a própria geração do MVA a partir de CVA (McFADDEN, 2005). Além disso, a passagem sucessiva de vírus em alta multiplicidade (MOI) aumenta a probabilidade da coinfeção de uma mesma célula por mais de uma partícula viral, favorecendo o surgimento de partículas defectivas interferentes (DI) (CONDIT,

2007). De modo a contornar este problema em nossos próximos experimentos refaremos as etapas de seleção e amplificação desde o início em diluições maiores.

VII – CONCLUSÃO

- As análises *in silico* do plasmídiopGEM-T Easy DEN3-E mostraram que alterações nas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos sofridas no inserto do clone analisado, eram toleráveis segundo o programa SIFT.
- A confirmação da expressão da proteína E truncada no plasmídeo de transferência pLW44-DEN3-E nos permitiu por meio de recombinação homóloga gerar o vírus MVA-DEN3-E.

VIII – Referências Bibliográficas

- ANDERSON, R., S. WANG, *et al.* Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol*, v. 71, n 6, Jun, p.4226-32. 1997.
- AVIRUTNAN, P., N. MALASIT, *et al.* Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*, v.161, n.11, Dec 1, p.6338-46. 1998.
- AVIRUTNAN, P., PUNYADEE, N., NOISAKRAN, S., KOMOLTR, I C., THIEMMECA, S., AUETHAVORNANAN, K., JAIRUNGSRI, A., KANLAYA, R., TANGTHAWORNCHAIKUL, N., PUTTIKHUNT, C., PATTANAKITSAKUL, S.N., YENCHITSOMANUS, P.T., MONGKOLSAPAYA, J., KASINRERK, W., SITTISOMBUT, N., HUSMANN, M., BLETTNER, M., VASANAWATHANA, S., BHAKDI, S., MALASIT, P. (2006). Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis*. Apr 15;193(8):1078-88.
- BELYAKOV, I.M., EARL, P., DZUTSEV, A., KUZNETSOV, V.A., LEMON, M., WYATT, L.S., SNYDER, J.T., AHLERS, J.D., FRANCHINI, G., MOSS, B., BERZOFSKY, J.A. (2003). Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 5;100(16):9458-63. Epub Jul 17.
- BISHT, H., ROBERTS A., VOGEL, L., BUKREYEV, A., COLLINS, P.L., MURPHY, B.R., SUBBARAO K., MOSS B. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:6641-6646.
- BLANEY, J. E. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am. J. Trop. Med.* v.71, p.811-821. 2004.

- BLANEY, J. E., C. T. HANSON, *et al.* Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. BMC Infect. Dis., v.4, p.39. 2004.
- BLANEY, J. E., J. M. MATRO, *et al.* Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. J. Virol., v.79, p.5516-5528. 2005.
- BULLER, R. M. & PALUMBO, G.J. (1991). Poxvirus pathogenesis. Microbiol Rev 55, 80-122.
- BUTRAPET, S. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5[prime] noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. J. Virol., v.74, p.3011-3019. 2000.
- CÂMARA, F.P., THEOPHILO, R.L., DOS SANTOS G.T., PEREIRA, S.R., CÂMARA, D.C., DE MATOS, R.R. (2007). Rev Soc Bras Med Trop. 2007 Mar-Apr;40(2):192-6.[Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study]
- CARR, J.M., H. HOCKING, *et al.* Supernatants from dengue virus type-2 infected macrophages induce permeability changes in endothelial cell monolayers. J Med Virol, v.69, n.4, Apr, p.521-8. 2003.
- CARROLL, M.W., OVERWIJKT, W.W., CHAMBERLAIN, R.S., ROSENBER, S.A., MOSS, B. E., RESTIFO, N.P. (1997). Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a Murine tumor model. Vaccine 15:387-394

- CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. AND RICE, C.M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649-688.
- CONDIT, R. C. KNIPE, DAVID M.; HOWLEY, PETER M. (2007). Principles of Virology in *FIELDS, Fields Virology, 5th edn* (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins). 25-57.
- COSTA, S.M., FREIRE, M.S., ALVES, A.M. (2005) DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine*. 2006 May 22;24(21):4562-4. Epub Aug 19.
- COSTA, S. M., M. V. PAES, *et al.* Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine*, v24, n.2, Jan 12, p.195-205.2006
- CRILL, W. D. E J. T. ROEHRIG. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.*, v.75, p.7769-7773. 2001.
- DAIAN, D. S.O. Construção de um vetor viral baseado no vírus vaccinia de Ankara Modificado (MVA) expressando a proteína verde fluorescente (GFP). Monografia de conclusão de curso 2008.
- DREXLER, I., STAIB, C. E., SUTTER, G. (2004). Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Current Opinion in Biotechnology*, 15:506–512.
- EARL, P.L., AMERICO, J.L., WYATT, L.S., ELLER, L.A., WHITBECK, J.C., COHEN, G.H., EISENBERG, R.J., HARTMANN, C.J., JACKSON, D.L., KULESH, D.A., MARTINEZ, M.J., MILLER, D.M., MUCKER, E.M., SHAMBLIN, J.D., ZWIERS, S.H., HUGGINS, J.W., JAHRLING, P.B., MOSS, B. (2004). Immunogenicity of a

highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*. Mar 11;428(6979):182-5.

EDELMAN, R. Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.69, p.48-60. 2003

EDELMAN, R. (2005). *J. Infect Dis.* Dengue and dengue vaccines. Mar 1;191(5):650-3. Epub Jan 27.

EDELMAN, R. (2007). Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis.* Jul 15;45 Suppl 1:S56-60.

ESPOSITO, J.J. & KNIGHT, J.C. (1985). Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology* 143 (1) 230-251.

ESPY, M.J., COCKERILL, F.R., MEYER, R.F., BOWEN, M.D., POAND, G.A., HADFIELD, T.L., SMITH, T.F. (2002). Detection of Smallpox Virus DNA by LyghtCycler PCR. *J Clin Microbiol* (2) 1985-1988.

FENNER, F., WITTEK, R. & DUMBELL, K.R. (1989). *The Orthopoxvirus*. 1^a ed. Academic Press. San Diego, California, 432p.

FLEXNER, C. & MOSS, B. (1997). Vaccinia virus as a live vector for expression of immunogens In Levine M. M., Woodrow G. C., Kaper J. B., Cobon, G. S. (Ed), *New Generation Vaccines*. Marcel Dekker, Inc. New York, NY.

FREIER, J.E. AND ROSEN L. (1988). Vertical transmission of dengue viruses by *Aedes mediovittatus*. *Am J Trop Med Hyg* 39: 218-222,

GREEN S, KURANE I, PINCUS S, ET AL. Recognition of dengue virus NS1-NS2A proteins by human CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte clones. *Virology* 1997;234:383-386.

- GREEN, S, ROTHMAN A. (2006). Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*. Oct;19(5):429-36.
- GRISTSUN & GOULD. (2007). Direct repeats in the flavivirus 3' untranslated region; a strategy for survival in the environment? *Virology*. Feb 20;358(2):258-65.
- GUBLER, D.J., KUNO G., MARKOFF, L. FLAVIVIRUSES. IN: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (Ed.). (2007). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.1155-1252.
- GUBLER D.J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496.
- GUBLER D.J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*.;33:330-42.
- GUBLER, D. J.. (1988). Dengue, In: *Epidemiology of arthropod-borne viral diseases* (T. P. Monath, ed.) p. 223-260. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.,.
- GUBLER, D. J., G. KUNO, *et al.* Flaviviruses. In: (Ed.). Fields Virology, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007
- GUIRAKHOO, F. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J. Virol.*, v.75, p.7290-7304. 2001.
- GUIRAKHOO, F. Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology*, v.298, p.146-159. 2002.
- GUIRAKHOO, F. Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of

yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. Hum. Vaccin., v.2, p.60-67. 2006.

GUZMAN M.G. AND KOURI G. (1996). Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 621-627.

Guzman, M. G. e G. Kouri. Dengue: an update. Lancet Infect Dis, v.2, n.1, p.33-42. 2002.

GUZMAN, M. G. Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in *Macaca fascicularis* immunized with recombinant dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.69, p.129-134. 2003

HALSTEAD S.B., DEEN J. (2002). The future of dengue vaccines. *Lancet*. Oct 19;360(9341):1243-5.

HALSTEAD S.B., HEINZ F.X., BARRETT A.D., ROEHRIG J.T. (2003). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27

HALSTEAD S.B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476-481.

HALSTEAD S.B. Dengue. (2002). *Curr Opin Infect Dis*. Oct;15(5):471-6.

HENCHAL E.A. AND PUTNAK J.R. (1990). The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 3: 376-396.

HUGHES, A.L., & FRIEDMAN, R. (2005) Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Mol Phylogenet Evol.* 35 (1) 186-195. *Immunol cell biol.* 2007 jan;85(1):43-5. epub 2006 nov 28. *J virol* 2004, 78:3965-3976.

- JOHANSSON M., BROOKS A.J, JANS D.A. AND VASUDEVAN S.G. (2001). A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J Gen Virol* 82: 735-745.
- JESSIE, K., M. Y. FONG, *et al.* Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Infect. Dis.*, v.189, p.1411-1418. 2004
- KANESA-THASAN, N. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine*, v.19, p.3179-3188. 2001
- KITCHENER, S. Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. *Vaccine*, v.24, p.1238-1241. 2006.
- LEI H.Y., YEH T.M., LIU H.S., LIN Y.S., CHEN S.H., LIU C.C. (2001) Immunopathogenesis of dengue virus infection. *Biomed Sci. Sep*;8(5):377-88.
- LEITMEYER, K.C.; D. W. VAUGHN, *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*, v.73, n.6, Jun, p.4738-47. 1999.
- LEVINE, M.M., SZTEIN M.B. (2004). Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat Immunol.*; 5:460-4
- LIBRATY, D.H., P. R. YOUNG, *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, v.186, n.8, Oct 15, p.1165-8.2002.
- LIN, C.F.; LEI, H.Y.; SHIAU, A. L.; H. S.; YEH, T.M.; CHEN, S.H.; LIU, C.C.; CHIU, S. C.; LIN, Y. S. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue

virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol*, v.169, n.2, Jul 15, p.657-64. 2002.

LINDENBACH, B. D. & RICE, C.M. (2001). Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.931-960.

LINDENBACH, B.D., THIEL J.H., RICE C.M. FLAVIVIRIDAE: THE VIRUSES AND THEIR REPLICATION. IN: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (2007) (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.1100-1154.

MACKENZIE, J. M., M. K. JONES, *et al.* Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in a viral RNA replication. *Virology*, v.220, n.1, Jun 1, p.232-40. 1996.

MACKENZIE, J.S., D.J. GUBLER, *et al.* Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*, v.10, n.12 Suppl, Dec, p.S98-109. 2004.

MASTRANGELO, M. J., EISENLOHR, L. C., GOMELLA, L. & LATTIME, E. C. (2000). Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. *J. Clin. Invest*, 105:1031-4.

MCBRIDE, W.J. AND BIELEFELDT-OHMANN, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2: 1041-1050.

MCFADDEN, G. (2005). Poxvirus Tropism. *Nature Reviews*, 201-213.

MEN, R., WYATT, L., TOKIMATSU, I., ARAKAKI, S., SHAMEEN, G., ELKINS, R., CHANOCK, R., MOSS, B. & LAI, C. J. (2000). Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine*, 18:3113-22.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2005). Guia de Vigilância Epidemiológica, 6a edição, Secretaria de Vigilância Sanitária. Brasília.
- MODIS, Y., S. OGATA, *et al.* Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. J Virol, v.79, n.2, p.1223-31. 2005.
- MONGKOLSAPAYA, J., W. DEJNIRATTISAI, *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*, v.9, n.7, Jul, p.921-7. 2003.
- MOOS, B. (2001) Poxviridae: The viruses and their replication in *FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. & GRIFFIN, D.E. Fields virology, 4th edn (Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins). 2849-2883.*
- MOSS, B. (2005) Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* 344, 48-54.
- MOSS, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination and, safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11341-11348.
- MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R.J. & ROSSMANN, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle *Nature Reviews Microbiology* 3, 13-22.
- OISH, K., S. INOUE, *et al.* Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J Med Virol*, v.71, n.2, Oct, p 259-64. 2003.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. (2005). Number of reported cases of dengue & dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Available at: <http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2005.htm>. Accessed 12 July 2007.

- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. (1990). Dengue hemorrhagic fever in Venezuela. *Epidemiol Bull.*;11:7-9.
- PANG, T., CARDOSA, M.J., GUZMAN, M.G. (2007). Cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol.* Jan;85(1):43-5.
- PARRINO J, MCCURDY LH, LARKIN BD, GORDON IJ, RUCKER SE, ENAMA ME, KOUP RA, ROEDERER M, BAILER RT, MOODIEZ , GU L, YAN L, GRAHAM BS. (2007). Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax challenge in vaccinia-naive and vaccinia-immune individuals. *Vaccine*, 25: 1513–1525.
- PUTNAK, R. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J. Infect. Dis.*, v.174, p.1176-1184. 1996a.
- PUTNAK, R. Immunogenic and protective response in mice immunized with a purified, inactivated, Dengue-2 virus vaccine prototype made in fetal rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.55, p.504-510. 1996b.
- PUTNAK, R. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine*, v.23, p.4442-4452. 2005.
- PUTNAK, R., D. A. BARVIR, *et al.* Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis*, v.174, n.6, p.1176-84. 1996.
- PUTNAK, R., K. CASSIDY, *et al.* Immunogenic and protective response in mice immunized with a purified, inactivated, Dengue-2 virus vaccine prototype made in fetal rhesus lung cells. *Am J Trop Med Hyg*, v.55, n.5, p.504-10. 1996.

- RAVIPRAKASH, K. Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. *Virology*, v.315, p.345-352. 2003.
- RAVIPRAKASH,¹HOLMAN,⁴ KARLA BLOCK,¹ JAN WORARATANADHARM,⁴ LAN CHEN,¹ CURTIS HAYES,¹ JOHN Y. DONG,^{3,4} AND KEVIN PORTER^{1,2A} KANAKATTE,^{2*} DANHER WANG,⁴ DAN EWING,¹ DAVID H. Tetravalent Dengue Vaccine Based on a Complex Adenovirus Vector Provides Significant Protection in Rhesus Monkeys against All Four Serotypes of Dengue Virus_In: Dengue and dengue hemorrhagic fever (D. J. Gubler and G. Kuno, ed.) p 45-60. CAB International, London, United Kingdom. Received 21 December 2007/Accepted 3 May 2008
- ROEHRIG, J. T. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res*, v.59, p.141-75. 2003.
- ROTHMAN, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*, 113, n.7, Apr, p.946-51.2004
- ROTHMAN, A. L. & ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology*, v.257, n.1, Apr 25, p. 1-6. 1999.
- SABCHAREON A, LANG J, CHANTHAVANICH P, YOKSAN S, FORRAT R, ATTANATH P, SIRIVICHAYAKUL C, PENGSAK K, POJJAROEN-ANANT C, CHAMBONNEAU L, SALUZZO JF, BHAMARAPRAVATI N. (2004). Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr. Infect Dis J*.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. (2000). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- SANCHEZ, V. Innate and adaptive cellular immunity in flavivirus-naive human recipients of a live-attenuated dengue serotype 3 vaccine produced in Vero cells (VDV3). *Vaccine*, v.24, p.4914-4926. 2006.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 74, p. 5463-5467.

SECRETARIA DE VIGILANCIA SANITÁRIA. (2007). Balanço dengue janeiro a julho de 2007 no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_060907.pdf. Acessado em 16 de setembro de 2007.

SENKEVICH, T.G., WARD, B.M. & MOSS, B. (2003) Vaccinia Virus Entry into Cells Is Dependent on a Virion Surface Protein Encoded by the A28 Gene. *Journal of Virology*, 2357-2366.

SIMMONS, M., K. R. PORTER, *et al.* Characterization of antibody responses to combinations of a dengue virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in rhesus macaques. *J. Virol.*, v.80, p.9577-9585. 2006

SMITH, G.L., VANDERPLASSCHEN, A. & LAW, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped Vaccinia virus. *Journal of General Virology* 83, 2915-2931. *Vaccine*. 2005 Jan 4;23(7):849-56. *Virology*. 2007 Feb 20;358(2):258-65. Epub 2006 Oct 24.

WARKE, R. V., K. XHAJA, *et al.* Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol*, v.77, n.21, Nov, p.11822-32. 2003.

WANG, Z., LA ROSA, C., MAAS, R., LY, H., BREWER, J., MEKHOUBAD, S., DAFTARIAN, P., LONGMATE, J., BRITT, W.J., DIAMOND, D.J. (2004). Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus. *J Virol*. Apr;78(8):3965-76.

WANG, E., NI, H., XU, R., BARRETT, A. D., WATOWICH, S. J., GUBLER, D. J., AND WEAVER, S. C. (2000). Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 74 7, 3227-34.

- WELSH, R.M. & ROTHMAN, A. L. Dengue immune response: low affinity, high febrility. *Nat Med*, v.9, n.7, Jul, p.820-2. 2003.
- WHITEHEAD, S. S. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3[prime] untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J. Virol.*, v.77, p.1653-1657. 2003a.
- WHITEHEAD, S. S. Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys. *Vaccine*, v.21, p.4307-4316. 2003b.
- WHITEHEAD, S. S., J. E. BLANEY, *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Micro*, v.5, n.7, p.518-528. 2007
- WYATT LS, EARL PL, ELLER LA, E MOSS B. (2004). Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101:4590–4595.
- WYATT, L., SHORS, S. T., MURPHY, B. R. & MOSS, B. (1996). Development of a replication deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine*, 14:1451-8
- WU, S. J., G. GROUARD-VOGEL, *et al.* Human skin Langerhns cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med*, v.6, n.7, Jul, p.816-20. 2000.
- YOUNG PR, HILDITCH PA, BLETCHLY C, HALLORAN W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol* 2000;38:1053-1057.

IX – Produções Bibliográficas

- **Apresentações de trabalho**

- **1.**
 - DINIZ, T. C. ; MAIA, M. Q. ; Pinho, T.M.G ; Kroon, E.G. ; Fonseca, F.G.. . Construção de um vírus ankara modificado (MVA) recombinante expressando as proteínas E e NS1 do vírus da Dengue. 2008.
- **2.**
 - DINIZ, T. C. ; GUEDES, M. I. M. ; Mota, B.E.F ; Santos, J.R ; Trindade, G.S ; Bonjardim, C. A ; Peregrino, P. C., ; Lobato, Z.I.P. ; Kroon, E.G. . III Fórum de Microbiologia, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.
- **3.**
 - DINIZ, T. C. ; GUEDES, M. I. M. ; Mota, B.E.F ; Santos, J.R ; Trindade, G.S ; Bonjardim, C. A ; Peregrino, P. C., ; Lobato, Z.I.P. ; Kroon, E.G. . TESTE DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VACCINIA VIRUS. 2007.

X – Participação em eventos

1. 54 Congresso Brasileiro de Genética. CONSTRUÇÃO DE UM VÍRUS VACCÍNIA ANKARA MODIFICADO (MVA) RECOMBINANTE EXPRESSANDO AS PROTEÍNAS E E NS1 DO VÍRUS DENGUE 3. 2008
2. I Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFMG. 2008.
3. 2 Festival De Verão da UFMG. 2008. (Oficina).
4. Curso de Tópicos em Biologia Marinha. 2008.
5. IV Fórum de Microbiologia do instituto de ciências biológicas da UFMG. 2008.
6. V Congresso Brasileiro de Biossegurança e V Simpósio Latino Americano de Produtos Transgênicos. 2007.
7. XVIII Encontro Nacional de Virologia. TESTE DE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VACCINIA VIRUS. 2007. (Congresso).
8. III Fórum de Microbiologia, promovido pelo programa de pós-graduação da Universidade Federal de Minas Gerais. TESTE DE ELISA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O Vaccinia virus. 2007. (Outra).

XI - Organização de Eventos

ANBIO ; DINIZ, T. C. . V Congresso Brasileiro de Biossegurança e V Simpósio Latino Americano de Produtos Transgênicos. 2007. (Congresso).