

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

**CONSTRUÇÃO DE VETORES VACINAIS
UTILIZANDO O VÍRUS VACCÍNIA ANKARA
MODIFICADO RECOMBINANTE: EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS DO VÍRUS DENGUE-2, E DE
PROTEÍNAS FLUORESENTES MARCADORAS
MÚLTIPLAS**

LEANDRO CIESIELSKI VIDA

LEANDRO CIESIELSKI VIDA

**CONSTRUÇÃO DE VETORES VACINAIS
UTILIZANDO O VÍRUS VACCÍNIA ANKARA
MODIFICADO RECOMBINANTE: EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS DO VÍRUS DENGUE-2, E DE
PROTEÍNAS FLUORESENTES MARCADORAS
MÚLTIPLAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título Mestre em Microbiologia.

Orientação: Professor Dr. Flavio Guimarães da Fonseca

Laboratório de Virologia Comparada

UFMG

2010

ÍNDICE

ÍNDICE	4
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
AGRADECIMENTOS	13
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.Família Flaviviridae	17
1.1 Estrutura da partícula viral	18
1.2 Estrutura do genoma	18
1.3 Ciclo de Multiplicação	22
1.4 A proteína E.....	25
1.5 A proteína não estrutural 1 (NS1).....	26
1.5.1 Anticorpos contra NS1	28
2. Dengue.....	30
2.1 Manifestações clínicas da dengue	32
2.2 Imunidade às infecções por <i>Dengue virus</i>	34
2.3 Epidemiologia	38
2.4 Vacinas experimentais contra <i>Dengue virus</i>	41
3 A família <i>Poxviridae</i>	48
3.1 Morfologia	49
3.2 Estrutura do Genoma	50
3.3 Ciclo de multiplicação	53
4. POXVÍRUS COMO VETORES	59
4.1 Histórico	59
4.2 Utilização	59

4.3 Poxvirus como vetores vacinais	61
4.5 Modified Vaccinina Ankara	62
II. JUSTIFICATIVA.....	65
III. OBJETIVOS	69
1 Objetivo geral	70
2 Objetivos específicos	70
IV. METODOLOGIA.....	72
1. Vírus e plasmídeos de transferência.....	73
2. PCR	75
3. Eletroforese em gel de agarose	77
4. Purificação de DNA de bandas de gel de agarose	77
5. Clonagem no plasmídeo pGEM-T Easy.....	78
6. Transformação em bactérias competentes (SAMBROOK <i>et al.</i> , 2002).....	78
7. Triagem das Colônias por PCR.....	79
8. Obtenção de plasmídeo em pequena escala	79
9. Sequenciamento	79
10. Análise das sequências.....	80
11. Construção dos plasmídeos de transferência.....	80
11.1 Subclonagem do cDNA do gene para a proteína E no plasmídeo pLW44	81
11.2 Subclonagem do cDNA do gene para a proteína NS1/2a no plasmídeo pJD19	82
12. Cultivo primário de Fibroblastos de embrião de galinha	83
13. Produção de vírus recombinantes	83
14. Multiplicação Viral.....	84
15. Purificação viral (JOKLIK, 1962)	85
16. Titulação Viral.....	85

17. Western Blot.....	86
V. RESULTADOS	87
1. Edição e clonagem do inserto DEN2E	88
2. Obtenção do plasmídeo de transferência pLW44 contendo o inserto com o gene para a proteína DENV2-E.....	93
3. Geração e amplificação dos clones virais MVA DENV2-E-GFP	96
4. Clonagem do inserto DEN2NS1	99
5. Obtenção do plasmídeo de transferência pJD19 contendo o inserto codificante para a proteína DENV2-NS1/2a	105
6. Construção do vetor MVA DEN2NS1/2a.....	112
7. Construção do vetor MVA DEN2-E-NS1/2a.....	114
8. Detecção da expressão da proteína E.....	117
9. Detecção da expressão da proteína NS1	118
VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	119
VII. PERSPECTIVAS	128
VIII CRONOGRAMA FÍSICO DE EXECUÇÃO	130
IX. BIBLIOGRAFIA	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência e amplificado esperado para os iniciadores Den2E-SmaF e Den2E-SalR,.....	76
Tabela 2: Seqüência e amplificado esperado para os iniciadores DEN2NS1-smaF e DEN2NS2a-SmaR.....	82
Tabela 3: pJD19 com o inserto na orientação correta.....	109
Tabela 4: pJD19 com o inserto na orientação incorreta.....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Partícula viral do gênero <i>Flavivirus</i>	18
Figura 2 Estrutura e organização do genoma de DENV.....	21
Figura 3 - Diagrama esquemático do ciclo de multiplicação dos <i>Flavivirus</i>	24
Figura 4 Partícula de DENV e a organização da proteína E em sua superfície.....	26
Figura 5 Distribuição do <i>Aedes aegypti</i> nas Américas.....	31
Figura 6: Ciclo silvestre do Dengue virus e ciclo epidêmico.....	38
Figura 7: Representação esquemática da partícula do Vaccinia virus:.....	50
Figura 8: Representação esquemática do genoma dos poxvírus.....	52
Figura 9: Ciclo de multiplicação dos Poxvírus.....	58
Figura 10: Estrutura do plasmídeo pLW44.....	74
Figura 11: Estrutura do plasmídeo pJD19.....	75
Figura 12: Esquema dos sítios de restrição do inserto do Clone DRD3.5.....	75
Figura 13: Verificação da presença do inserto DENV2ESmaI Sall nos clones transformantes LCV através de PCR.....	88
Figura 14: Seqüência do inserto DENV2ESmaI Sall clonado no plasmídeo pGemT.....	89
Figura 15: Alinhamento das sequências de nucleotídeos da proteína E.....	91

- Figura 16:** O Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína E do clone LCV01 (pGEM-TDENV2ESmaI Sall) com a amostra ACY70780.1 (polyprotein).....92
- Figura 17:-** Verificação da digestão de pLW44 e LCV01 (pGEM-TDENV2ESmaI Sall) com as enzimas de restrição *SmaI* e *Sall*.....93
- Figura 18:-** Teste da purificação realizada do material de pLW44 e LCV01 (pGEM-TDENV2ESmaI Sall) digerido por *Sall* e *SmaI*.....94
- Figura 19:** Verificação da presença do inserto DENV2ESmaI Sall nos plasmídeos dos clones transformantes PLCV (pLW44DENV2ESmaI Sall) através da PCR.....95
- Figura 20:** Digestão dos clones positivos pLW44DENV2ESmaI Sall com as enzimas *Sall* e *SmaI*.....96
- Figura 21:** Microscopias de células infectadas por MVADEN2E.....98
- Figura 22:** Sequência de nucleotídeos gerada pelo sequenciamento do inserto de 14.13 (pGEM-TDENV2-NS1/2a SmaI) utilizando os iniciadores universais M13F e M13R.....99
- Figura 23:** Figura 14: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da proteína NS1/2a.....102
- Figura 24:** O Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína NS1/2a.....104
- Figura 25:** Verificação da digestão do plasmídeo 14.13 (pGEM-TDENV2-NS1/2a SmaI) com as enzima de restrição *SmaI*.....105
- Figura 26:** O teste da purificação realizada do material de pJD19 e 14.13 (pGEM-TDENV2-NS1/2a SmaI) digerido por *SmaI* revelou que esta foi bem sucedida.106
- Figura 27:** PCR a partir de clones bacterianos contendo o gene correspondente para a proteína NS1/2a do DENV2.....107
- Figura 28:** A Digestão dos plasmídeos clones positivos pJD19DENV2-NS1/2a SmaI com a enzima *SmaI*.108

Figura 29: Esquema pJD19 com o inserto na orientação correta.....	109
Figura 30: Esquema pJD19 com o inserto na orientação incorreta.....	110
Figura 31: Eletroforese da digestão dos clones pJD19DENV2-NS1/2aSmaI com <i>EcoRV</i> e <i>PvuII</i>	111
Figura 32: Microscopias de células infectadas pelo MVADEN2NS1/2a.....	113
Figura 33: Microscopias de células infectadas pelo MVADEN2-E-NS1/2a..	116
Figura 34: Análise da expressão de E em células infectadas com MVA e transfectadas com plasmídeos pLW44DEN2ESmaISall.	117
Figura 35: Alinhamento de aminoácidos de LCV01 e DENV2 NGC.	122

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	Antibody dependent enhancement - intensificação dependente de anticorpos
ATI	Corpúsculos de Inclusão
C	Capsídeo
CS	<i>Conserved sequence</i> – sequência conservada
CEF	Chicken embryo fibroblast - fibroblastos embrionários de frango
CEV	Cell-associated Extracellular virus - Vírus extracelular associado à célula
CPV	<i>Cowpox virus</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DF	<i>Dengue fever</i> – febre do dengue
DHF	<i>Dengue hemorrhagic Fever</i> – Febre Hemorrágica do Dengue
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSS	<i>Dengue Shock Syndrome</i> – Síndrome do Choque do Dengue
E	Proteína do Envelope
EEV	Enveloped extracellular virus - Vírus envelopado extracelular
FcR	Receptor para a região Fc do anticorpo
FcγR	Receptor de Fcγ da IgG
HIV	human immunodeficiency virus – Vírus da Imunodeficiência humana
IEV	Intracellular enveloped virus - vírus envelopado intracelular
IFN-γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina
IMV	<i>Intracellular mature virus</i> - Vírus maduro intracelular
ITR's	<i>Inverted terminal repetitions</i> – repetições terminais invertidas
IV	<i>Immature virus</i> - vírus imaturo
JEV	<i>Japanese Encephalitis Virus</i> – Vírus da Encefalite Japonesa
Kb	Quilo bases
KD	Quilo Dalton
Kpb	Mil pares de bases
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> – multiplicidade de infecção
mRNA	<i>Messenger RNA</i> – RNA mensageiro

MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara - Vaccinia Ankara Modificado</i>
MVEV	<i>Murray Valley Encephalitis Virus - Vírus da Encefalite de Murray Valley</i>
NCR	Non coding region - região não codificadora
NGC	<i>New Guinea C</i>
NKV	Nenhum vetor conhecido
NS	<i>Non Structural - Não estrutural</i>
ORF	<i>Open reading frame - Janela aberta de leitura</i>
qsp	Quantidade suficiente para
Pr-M	Pré-membrana
RE	Retículo endoplasmático
RFP	<i>Red Fluorescent Protein - Proteína Vermelha Fluorescente</i>
RNA	Ácido ribocucleico
SFB	Soro fetal Bovino
SL	<i>stem-loop</i>
SLEV	<i>Saint Louis Encephalitis Virus - Vírus da Encefalite de Saint Louis</i>
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
TBEV	<i>Tick-borne Encephalitis virus – Vírus meningoencefalite transmitido por carrapato</i>
VV	<i>Vaccinia virus</i>
YFV	<i>Yellow Fever Virus – Vírus da Febre Amarela</i>
WHO	<i>World Health Organization – Organização Mundial da Saúde</i>
WNV	<i>West Nile Virus - Vírus do Oeste do Nillo</i>

AGRADECIMENTOS

Ao olhar para trás vejo um longo caminho, percebo agora, que a vida é uma série de ciclos que encontram seu fim para dar início a outros. Sinto neste momento o fim de mais uma destas etapas. Mas não deixo de perceber as pessoas que me acompanharam e apoiaram até este momento, o que vejo é um oceano de rostos cada um contido em um punhado de momentos, e são por estes momentos que eu tenho tanto a agradecer.

Gostaria de agradecer primeiro a minha família por todo o apoio e dedicação. A minha mãe por estar sempre ao meu lado, ao meu pai pelas lições em como encarar a vida, a minha irmã Karla por ser um exemplo de responsabilidade e de garra, a minha irmã Roberta por mostrar que viver a vida é o que realmente vale.

Agradeço também ao Dr. Flavio Guimarães da Fonseca, pela oportunidade de trabalhar em um projeto no qual acredito. Por toda a sua paciência, por se preocupar tanto como nós quando há um problema e por estar ao nosso lado para resolvê-lo. Por se desdobrar para ter tempo de discutir o andamento do trabalho. E por ser um exemplo de pessoa e de profissional.

Também tenho muito a agradecer a equipe do LVC, em especial a Tânia Mara pelos puchões de orelha e por manter o laboratório funcionando, e por torcer por nós. A Dr. Fabiana Magalhães Coelho, pelo seu apoio no desenvolvimento deste projeto, pela sua paciência e por ser um doce de pessoa. Ao professor Maurício pelas discussões durante o café, por me lembrar o quanto as coisas mudam e por insistir que o Linux é o melhor sistema operacional. A Bárbara, Lara e Dani por me aturarem no dia a dia. A Marina por ser tão alta, a Ângela por ser tão quieta, e ao Vinícios por falar pelos cotovelos.

A Dra. Erna por ter parado uma tarde para conversar comigo e me dado a grande oportunidade de trabalhar durante um ano no laboratório de Vírus, onde pude crescer não só como profissional, mas também como pessoa, isso auxiliado por vários “moradores” de lá. Agradeço aos outros dois chefes do laboratório Dr. Cláudio, por me dar a oportunidade de trabalhar em sua linha de pesquisa, e ao Dr. Paulo, por mostrar que dar caneta no JR é sempre motivo de comemoração. Ao JR pelo apoio, e por dizer “ah, você vai tomar bomba” quando na verdade estava torcendo por

mim. A Dra. Jaqueline Germano por todo o apoio no desenvolvimento deste projeto e pelo exemplo de força e determinação. Ao Eliseu e a Gisele por compartilharem o serviço. A Leandra e Marieta pela batalha dos sexos. A Ilda por ser sempre um amor, Tia Ângela por sempre dizer o que pensa, a Deza por dar risada das piadas sem graça. A todos os GTS em especial ao Bruno por ser tão esquecido.

Agradeço também a equipe de professores do Departamento de Microbiologia da UFMG. Ao Dr. Oscar por ter me dado a dica de entrar na Especialização, à Dra. Giliane pela oportunidade de trabalhar lado a lado durante seis meses de terinamento didático, à Dra. Edel pelas conversas, ao Dr. Ari pelas aulas filosóficas, à Dra. Vera pelo Forró.

Aos meus companheiros de república, Rafael pelas conversas filosóficas e pelas brigas, ao Guilherme da Veterinária pelas saídas, ao João por ser tão extressado que me deixa calmo por comparação, ao Guilherme da letras por roubar a comida, e a Tchutchuca por aturar a gente.

Agradeço aos colegas do buteco. Agradeço ao Quelé por viver em estilo sésnil e não se deixar abalar. Ao Chico por ser um lixo humano. Ao Ruiz pelo estilo ninja de viver. Ao Gabriel por sempre falar a coisa certa, na hora certa, e por tentar me amarrar a um banco usando fita crepe. Ao Doido por ter me apresentado ao mundo da dança. Ao Leo Camilo pelo companheirismo. A Flavinha, por ser dona do tamagoshi. Ao Andrezão da Bahia pela música do Titanic. A Ana P pelas conversas na cantina. Ao Marcelão pela Jaratataca do mato. Ao Danilo pelo Beijo. Ao Elisão e Pedrão por compartilharem o mesmo DNA.

Por fim gostaria de agradecer a todas as outras pessoas, cujos nomes não citei, que me acompanharam e ajudaram durante todo este processo.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.Família Flaviviridae

O nome *Flaviviridae* tem origem na palavra *flavus* que no latim significa amarelo. Esta família foi separada da família *Togaviridae* depois que Westway determinou que estes vírus diferiam nos mecanismos de replicação. Atualmente é constituída por três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* (do latim *pestis*, praga) e *Hepacivirus* (do grego hepar, hepatos, fígado). Os vírus desta família compartilham similaridades na morfologia do vírus, organização do genoma e estratégias de replicação, porém exibem propriedades biológicas diversas e não possuem reatividade sorológica cruzada (LINDENBACH *et al.*, 2007).

O gênero *Flavivirus* é composto por 53 espécies virais (GUBLER *et al.*, 2007). Destes, 27 são transmitidos por mosquitos, doze por carrapatos e quatorze são agentes zoonóticos sem nenhum vetor conhecido (NKV). Esta classificação é baseada em conceito de espécie viral que considera morfologia do vírus, organização do genoma, relação de sequências de nucleotídeos, associações a vetores e ecologia viral. Estimativas anteriores que apontavam para a existência de até 73 espécies de *Flavivirus* resultaram d classificação de subtipos e sorotipos como espécies distintas. Os vírus deste gênero apresentam elevada morbidade e mortalidade em todos os continentes, sendo que, vinte e dois (65%) dos transmitidos por mosquitos, treze (73%) dos transmitidos por carrapatos e cinco (23%) NKV causam doenças em humanos (KECK *et al.*, 2005).

Os flavivirus carreados por mosquitos evoluíram em dois grupos principais distinguidos por sua apresentação clínica em humanos e a sua ecologia (GAUNT *et al.*, 2001; KRAMER e EBEL, 2003). Os flavivirus causadores de encefalite estão no sorogrupo da encefalite japonesa e incluem o vírus da Encefalite Japonesa (*Japanese encephalitis virus* - JEV), o vírus West Nile (WNV), o vírus da encefalite de Murray Valley (*Murray Valley encephalitis virus* - MVEV), e o vírus da encefalite de Saint Louis (*Saint Louis encephalitis virus* - SLEV). Todos estes são vírus zoonóticos que possuem pássaros como o hospedeiro vertebrado natural e primariamente utilizam os mosquitos das espécies *Culex* como vetores. O outro grupo inclui os vírus da febre amarela (*Yellow fever virus* - YFV) e o *Dengue virus*

(DENV), que são vírus mais viscerotrópicos e pode causar febre hemorrágica. Estes vírus possuem um ciclo florestal em prossímios como seus vetores vertebrados e mosquitos *Aedes* sp como principais vetores. Porém os DENV estão completamente adaptados ao ambiente urbano e já não necessitam do ciclo florestal para sua manutenção (GUBLER, 2002).

1.1 Estrutura da partícula viral

Apresentando um diâmetro de 40 a 60 nm, forma esférica e um capsídeo de simetria icosaédrica, os flavivirus são relativamente pequenos. Seu nucleocapsídeo é denso e possui um diâmetro aproximado de 30 nm de diâmetro e este é envolto por uma membrana lipoproteica (LEYSSEN *et al.*, 2000).

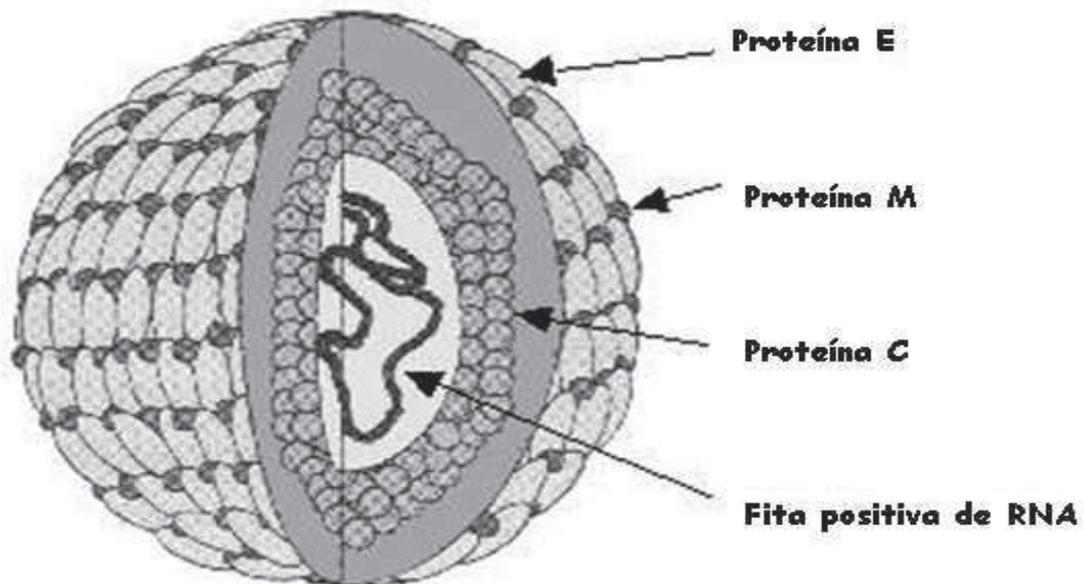


Figura 1: Partícula viral do gênero *Flavivirus*. A partícula viral é composta por três proteínas estruturais: C, a proteína do nucleocapsídeo; M, a proteína associada à membrana; e E, a proteína do envelope. **Fonte:** LINDENBACH & RICE, 2001

1.2 Estrutura do genoma

Como todos os vírus de RNA de polaridade positiva, o genoma dos vírus do gênero *Flavivirus* é infeccioso por si só, isto foi confirmado por estudos onde foram construídos clones infecciosos com DNA complementar (cDNA) (RUGGLI e RICE,

1999). O genoma dos vírus do gênero *Flavivirus* são compostos por um único RNA de polaridade positiva com aproximadamente 11 Kb com um cap do tipo I na extremidade 5' (m⁷ GppAmp). Diferentemente do RNA mensageiro (mRNA) celular, os genomas dos vírus do gênero *Flavivirus* não possuem uma cauda poliadenilada na extremidade 3' (LINDENBACH *et al.*, 2007). O genoma codifica para apenas uma ORF flanqueada por regiões não codificadoras (NCR) 3' e 5' com aproximadamente 400 a 700 e 100 nucleotídeos, respectivamente (Figura 2) (MARKOFF, 2003). A ORF codifica três proteínas estruturais: a do capsídeo (C), a pré-membrana (Pr-M) e a proteína do envelope (E) seguidas por sete proteínas não estruturais (NS). Elas apresentam-se dispostas na seguinte ordem: 5'-C-PreM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3' (Figura 2) (LINDENBACH *et al.*, 2007).

A falta da cadeia poli (A) na região NCR 3' é uma característica dos vírus da família *Flaviviridae* que a distingue de outros vírus RNA com polaridade positiva. Apesar da sequência da NCR 5' não ser bem conservada entre diferentes *Flavivirus*, estruturas secundárias comuns têm sido encontradas nesta região (Figura 2) (BRINTON e DISPOTO, 1988; THURNER *et al.*, 2004). Tais 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 NCR 5' reside provavelmente na região complementar da fita de polaridade negativa, que serve como sítio de início da síntese da fita de RNA de polaridade 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. De fato, diversas proteínas humanas, podem se ligar à NCR 3' da fita de RNA negativa. (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 sequências e estruturas conservadas têm sido encontradas entre os flavivirus (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. Nos vírus do gênero *Flavivirus* transmitidos por mosquitos, duas pequenas sequências conservadas (CS1 e CS2) 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 sequência conservada próxima da extremidade 5' do genoma na região que codifica a proteína do capsídeo (LINDENBACH *et al.*, 2007).

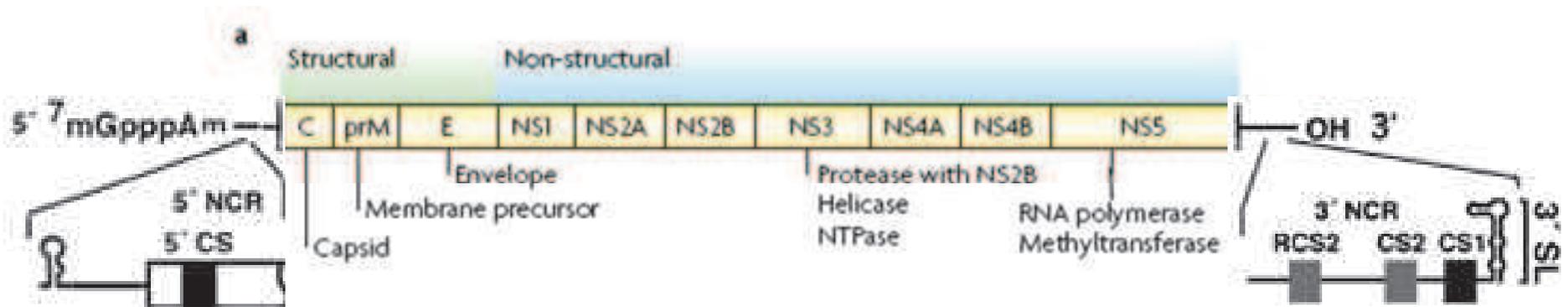


Figura 2 Estrutura e organização do genoma de DENV. Demarcadas em verde estão os genes que codificam para as estruturais e em azul para as proteínas não estruturais. Também estão descritas as duas NCR e suas respectivas estruturas. **Fonte:** adaptado de LINDENBACH *et al.*, 2007 e WHITEHEAD, 2007.

1.3 Ciclo de multiplicação

Existe pouca informação sobre os mecanismos pelos quais os vírus do gênero *Flavivirus* se ligam aos receptores celulares. Porém diversos receptores de células de mamíferos têm sido propostos, como sulfato de heparina (CHEN *et al.*, 1997; HILGARD e STOCKERT, 2000; GERMI *et al.*, 2002; LIN, Y. L. *et al.*, 2002), proteína de choque térmico 70 (Hsp70) e Hsp90 (REYES-DEL VALLE *et al.*, 2005), proteína regulada por glicose GRP78/BiP (JINDADAMRONGWECH *et al.*, 2004), moléculas associadas com CD-14 (CHEN *et al.*, 1999), o receptor de laminina de alta afinidade (THEPPARIT e SMITH, 2004). Porém entre todos os candidatos a receptores o melhor caracterizado é a DC-SIGN (*dendritic-cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*), que pode mediar a infecção dos quatro sorotipos de DENV e sua expressão em células não permissivas as torna susceptíveis a infecção (CLYDE *et al.*, 2006).

Após a adsorção, acredita-se que a penetração ocorra por endocitose mediada por receptor, embora a fusão direta com a membrana celular também tenha sido descrita. (LIM e NG, 1999) (Figura 3 - etapas 1, 2 e 3). A acidificação do ambiente do endossomo desencadeia a trimerização irreversível da proteína E, resultando na fusão do envelope viral com a membrana do endossomo. Após a fusão, o nucleocapsídeo é liberado para o citoplasma, a proteína do capsídeo e o RNA dissociam-se, iniciando a replicação do genoma (Figura 3 – etapas 4, 5 e 6) (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005).

Os genes contidos na ORF são traduzidos a partir do códon AUG (Metionina), e, em seguida, a poliproteína codificada pela ORF é clivada durante e após a tradução por proteases virais e celulares dando origem a componentes virais e replicativos. Após a tradução do mRNA genômico, tem início a replicação mediante a síntese de fitas complementares de polaridade negativa, que servem como moldes para a produção de fitas de polaridade positiva adicionais. As fitas de polaridade positiva servem diversos propósitos como: a tradução das proteínas estruturais e não estruturais, para a síntese de fitas negativas ou formação de novos vírus quando são encapsuladas. As fitas positivas de RNA são sintetizadas a partir de fitas moldes negativas por um processo semiconservativo (LINDENBACH *et al.*, 2007)(Figura 3 - tópicos 7, 8 e 9).

Estudos de ultra-estrutura indicam que a morfogênese dos vírus ocorre mediante associação com membranas intracelulares. Estudos de microscopia eletrônica de células infectadas com *Flavivirus* têm, consistentemente, demonstrado vírus morfologicamente maduros dentro do lúmen de um compartimento que se acredita ser o retículo endoplasmático. Em muitos estudos, os vírus parecem acumular desordenadamente dentro de vesículas associadas a membranas. O brotamento intermediário e o nucleocapsídeo no citoplasma não são claramente observados, sugerindo que o processo de montagem seja muito rápido. A proliferação rápida de estruturas membranosas intracelulares é sinal de infecção por vírus do gênero *Flavivirus* e o transporte vesicular pela via secretória do hospedeiro parece estar envolvido na migração das partículas virais recém formadas do retículo endoplasmático para a superfície celular, onde ocorre a exocitose. O brotamento das partículas virais da membrana plasmática tem sido observado ocasionalmente e não parece ser o principal mecanismo de liberação (FIGURA 3 - itens 10,11 e 12) (LINDENBACH *et al.*, 2007).

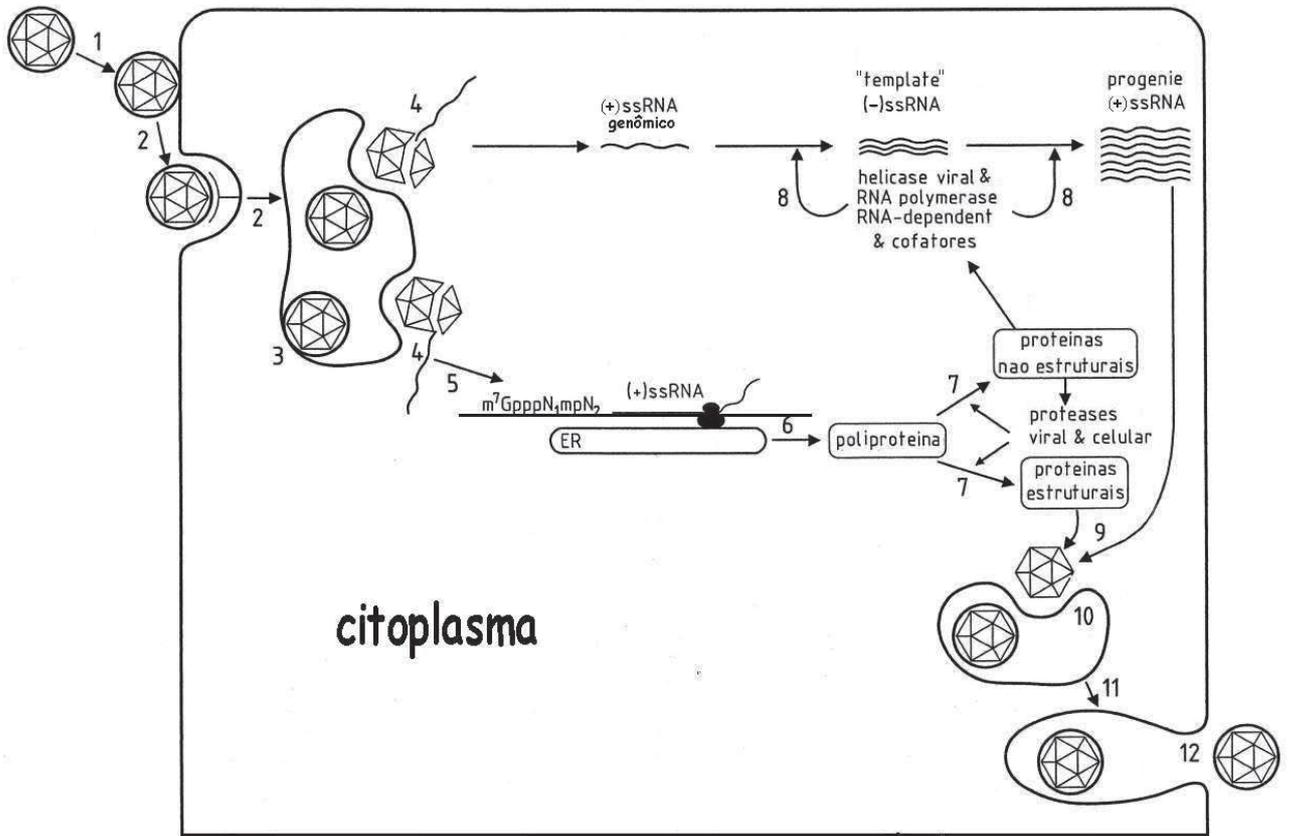


Figura 3 - Diagrama esquemático do ciclo de multiplicação dos vírus do gênero *Flavivirus*. Etapas do ciclo replicativo: (1) e (2) adsorção da partícula viral à célula hospedeira; (3) endocitose mediada por receptor e fusão do envelope viral com a membrana do endossoma (4) liberação do nucleocapsídeo viral; (5), (6) e (7) tradução e processamento da poliproteína; (8) replicação do RNA associado à membrana; (9) e (10) morfogênese do vírion em vesículas intracelulares; (11) transporte do vírion e fusão da vesícula na membrana plasmática; (12) liberação do vírion no meio extracelular. **Fonte:** adaptado de (LEYSEN *et al.*, 2000).

1.4 A proteína E

A proteína de envelope (E) é uma glicoproteína ancorada a membrana com cerca de 50 kDa que recobre o envelope de vírus maduros, ela está envolvida tanto com a adsorção quanto com a fusão destes vírus à célula (GUBLER *et al.*, 2007). Devido a estas características esta proteína desempenha um papel importante na geração de anticorpos neutralizante 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 (figura 4). A maior parte dos anticorpos gerados era dependente de conformação (ROEHRIG, 2003), sendo que os gerados contra o domínio I tiveram a mais alta atividade neutralizante, seguidos pelos de II e III, respectivamente. Estudos menos extensivos de anticorpos monoclonais da E de outros flavivirus geraram resultados que corroboram 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 dos epitopos em E é descontínua, o que é consistente com a sensibilidade à desnaturação dos epitopos neutralizantes e a descoberta de que anticorpos monoclonais geralmente não reagem com peptídeos sintéticos (GUBLER *et al.*, 2007).

Os flavivirus penetram as células via endocitose, o pH baixo dos endossomos leva a mudanças conformacionais permanentes em E que resultam na formação de trímeros de E e a exposição das proteínas de fusão (BRESSANELLI *et al.*, 2004). Estes eventos de associados à fusão expõem novos sítios antigênicos que podem vir a servir como alvo para anticorpos.

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).

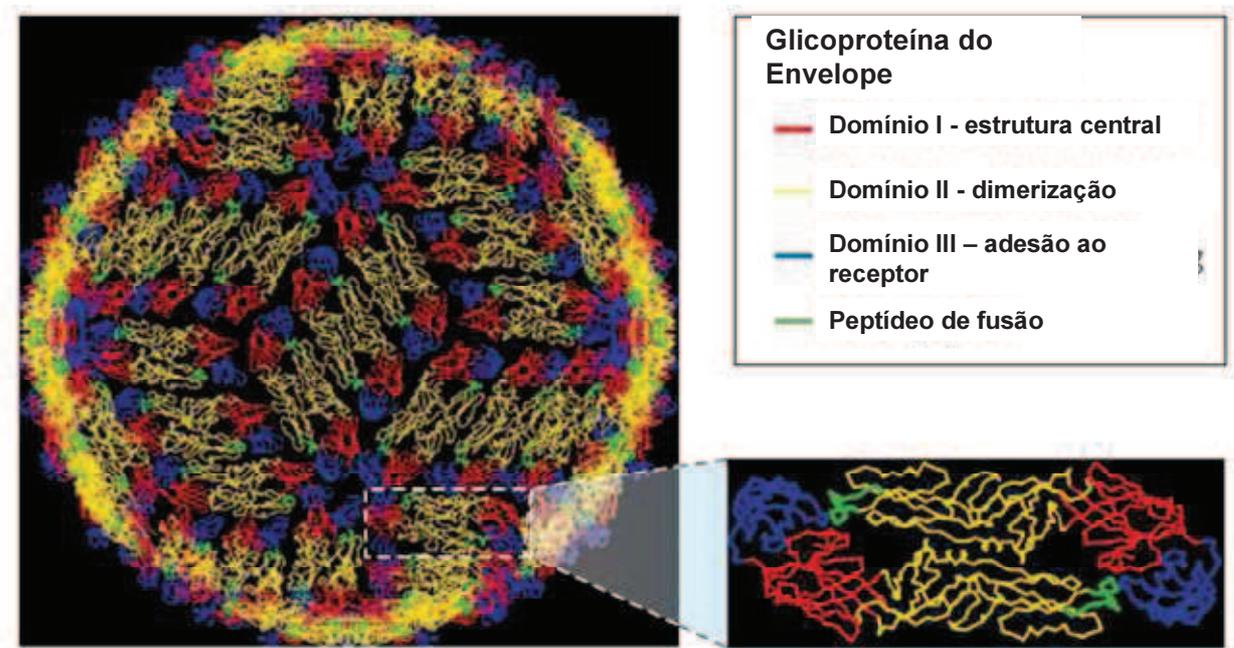


Figura 4 – Partícula de DENV e a organização da proteína E em sua superfície, em destaque a proteína E e seus respectivos domínios. **Fonte:** Adaptado de (KUHN *et al.*, 2002).

1.5 A proteína não estrutural 1 (NS1)

A glicoproteína NS1 (46 KD) é translocada para dentro de retículo endoplasmático (RE) durante a síntese e clivada da proteína E por uma peptidase sinal do hospedeiro, enquanto uma enzima desconhecida do hospedeiro, residente no RE, cliva a junção NS1/2a (FALGOUT *et al.*, 1989; FALGOUT e MARKOFF, 1995). Após este processo, a NS1 produzida é predominantemente mantida dentro das células infectadas, mas pode se deslocar para a superfície celular sendo lentamente secretada pelas células de mamíferos (LINDENBACH e RICE, 2003).

NS1 contém dois sítios de glicosilação ligados a N e 12 cisteínas conservadas que formam ligações di-sulfídicas (LEE *et al.*, 1989; MASON, 1989). Por volta de 30 minutos após a síntese NS1 forma homodímeros altamente estáveis e adquire

afinidade por membranas (WINKLER *et al.*, 1988; WINKLER *et al.*, 1989). Devido ao fato desta proteína ser predominantemente hidrofílica em conteúdo de aminoácidos e não possuir domínios transmembrana, a natureza dessa associação com a membrana permanece incerta. Uma possibilidade é que a dimerização crie uma superfície hidrofóbica que permite uma associação periférica com a membrana.

Esta glicoproteína também possui um papel importante, porém não elucidado na replicação do RNA. Isto está relacionado com a característica que NS1 possui de se concentrar em sítios de replicação de RNA (WESTAWAY *et al.*, 1997; MACKENZIE *et al.*, 1998) e no fato que mutações nos sítios de glicosilação ligados a N nesta proteína podem levar a efeitos dramáticos na replicação do RNA e produção viral (MUYLAERT *et al.*, 1996). Estudos de trans-complementação revelam que NS1 age em um estágio muito inicial da replicação do RNA (LINDENBACH e RICE, 1997; KHROMYKH *et al.*, 1999; KHROMYKH *et al.*, 2000), e que a interação entre NS1 e NS4A é necessária para que a replicase funcione (LINDENBACH e RICE, 1999).

A função das formas extracelulares de NS1 ainda não está clara. Durante o curso da infecção, uma forte resposta humoral é criada contra esta proteína, e anticorpos contra a superfície celular podem direcionar a uma lise celular mediada por anticorpos das células infectadas (LINDENBACH e RICE, 2003). Além deste fato, alguns dos anticorpos protetores NS1-específicos podem agir de forma independente do sistema complemento (CHUNG *et al.*, 2006). A ligação inespecífica de anticorpos anti-NS1 pode induzir a fosforilação da tirosina de diversas proteínas não identificadas em células infectadas com DENV-2 (JACOBS *et al.*, 2000), e tem sido proposto que NS1 pode mimetizar importantes moléculas humanas (CHANG *et al.*, 2002).

A forma secretada de NS1 foi originalmente caracterizada como o antígeno solúvel fixador de complemento presente no soro e em tecidos de animais infectados, tendo seu pico durante a fase aguda de infecção (ALCON *et al.*, 2002; MACDONALD *et al.*, 2005). Apesar de um estudo inicial sugerir que a dimerização fosse necessária para a secreção de NS1 (PRYOR e WRIGHT, 1993), um vírus Kunjin (KUNV) mutante que produz dímeros de NS1 instáveis ainda secreta NS1 (HALL *et al.*, 1999). Interessantemente este mutante se multiplica pouco e é

atenuado *in vivo*. As proteínas NS1 secretadas se agrupam em partículas hexaméricas de 11 nm que aparentam serem três dímeros mantidos unidos por interações hidrofóbicas (FLAMAND *et al.*, 1999). Estas formas de NS1 são capturadas por hepatócitos e transportadas para endossomos tardios onde se acumulam. Apesar da função desta compartimentalização não ser ainda bem clara, o pré tratamento de células de hepatoma com NS1 secretada pode aumentar o nível de uma infecção por flavivírus subsequente (ALCON-LEPODER *et al.*, 2005).

1.5.1 Anticorpos contra NS1

NS1 contém 12 resíduos de cisteína completamente conservados. As seis pontes dissulfídicas são provavelmente determinantes críticos de antigenicidade e função. Epítomos tipo específicos, subcomplexo específicos, complexo específicos e de reatividade cruzada têm sido identificados (FALCONAR e YOUNG, 1991), e um mapa de epítomos detalhado foi estabelecido (HENCHAL *et al.*, 1987). A maioria dos anticorpos gerados é dependente de conformação (FALCONAR e YOUNG, 1991).

Oligomerização é uma propriedade comum de NS1 em células infectadas *in vitro*, NS1 é detectada intracelularmente, na superfície, e secretada em quantidade abundante no meio. As formas intracelulares aparentam ser diméricas, pentaméricas ou hexaméricas (CROOKS *et al.*, 1994). Na superfície das células infectadas, monômeros estão ancorados à membrana plasmática por uma ligação glicosil-fosfatidilinositol (JACOBS *et al.*, 2000). As formas de multímeros secretadas foram originalmente denominadas antígenos solúveis fixadores de complemento e foram classicamente utilizados no diagnóstico da DF (YOUNG *et al.*, 2000). Altos níveis de NS1 circulantes no início da DF podem estar relacionados com o desenvolvimento de DHF e DSS (LIBRATY *et al.*, 2002).

NS1 gera uma resposta celular e humoral em humanos e em experimentos com animais (GREEN *et al.*, 1997; SHU *et al.*, 2000; YOUNG *et al.*, 2000; LIN, C. F. *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2005); (COSTA *et al.*, 2007). A transferência passiva de anticorpos NS1 pode conferir proteção contra DENV e YFV em modelos animais (SCHLESINGER *et al.*, 1993). NS1 tem sido avaliada como candidata a

vacina (ZHANG *et al.*, 1988; BRANDT, 1990; COSTA *et al.*, 2007) e pode induzir uma resposta imune protetora em modelo animal em desafios homólogos contra DENV ou YFV (SCHLESINGER *et al.*, 1986; SCHLESINGER *et al.*, 1987). A imunogenicidade de NS1 aparentemente depende do estado físico de NS1 na preparação para imunização, uma vez que dímeros foram superiores a monômeros na geração de imunidade (FALCONAR e YOUNG, 1991), e níveis de proteção mais altos foram observados com a forma de NS1 solúvel do que a sua forma associada à membrana. Também foi demonstrado que anticorpos anti-NS1 podem desencadear uma lise mediada por complemento de células infectadas por DENV e proteger camundongos contra desafios com DENV (SCHLESINGER *et al.*, 1987; COSTA *et al.*, 2007)

Apesar do papel demonstrado na geração de proteção, NS1 também pode desempenhar um papel na patogenicidade. Isto pode ocorrer devido à epítomos que mimetizam aqueles de moléculas de superfície de células endoteliais (LIN, C. F. *et al.*, 2002). E também devido à anticorpos contra epítomos compartilhados podem induzir dano às células do endotélio e induzir citocinas inflamatórias que podem desempenhar um papel na hemorragia associada com infecções por DENV (LIN *et al.*, 2005). Esta hipótese é corroborada por dados que apontam para concentrações mais elevadas de NS1, complexada com anticorpos, serem encontradas no sangue durante a fase aguda de DHF do que a de DF (KORAKA *et al.*, 2003).

Também é importante ressaltar que anticorpos IgM, IgA e IgG contra NS1 reagiram monotipicamente em 80%, 67% e 75% para espécimes de infecção primária, mas apenas 50%, 22% e 30% em espécimes de infecção secundária, respectivamente (SHU *et al.*, 2000); Apenas IgM foi DENV específico. Baixos níveis de reação cruzada de anticorpos IgM anti-DENVNS1 com Anti-JEVNS1 foram reportados (HUANG *et al.*, 2001). E que anticorpos anti-NS1 podem distinguir entre a resposta imune contra a vacina de vírus inativado de JEV e infecções naturais por JEV. Surpreendentemente, anticorpos anti-NS1 não foram induzidos por uma dose única da vacina contra YFV (MONATH, 2005).

2. Dengue

Os *Dengue virus* são classificados em quatro sorotipos denominados *Dengue virus* 1, 2, 3 e 4. Os sorotipos são genética e antigenicamente distintos, embora sejam epidemiologicamente similares. A infecção por um deles fornece imunidade protetora e duradoura contra o sorotipo infectante, podendo ocorrer uma imunidade de curta duração contra os outros três sorotipos (WANG *et al.*, 2000).

A febre do dengue possuía uma distribuição global já no fim do século XVIII, sendo que epidemias de DF eram comuns durante o os séculos XVIII e XIX nas Américas, no Caribe, na Ásia, Austrália e no Pacífico (GUBLER, 1997). A transmissão do DENV pelo *A. aegypti* foi primeiro descrita por Bancroft em 1906, no mesmo ano, Ashburn e Craig encontraram um agente filtrável em sangue de humanos. Em 1926 e 1931, respectivamente, Siler e Simmons estudaram a transmissão do vírus em voluntários e estabeleceram o período de incubação do vírus no mosquito. O vírus foi isolado por Sabin e Schlesinger em 1944 e a existência de mais de um sorotipo foi estabelecida posteriormente através de estudos em humanos por proteção cruzada (LINDENBACH *et al.*, 2007).

As mudanças ecológicas no Sudeste Asiático, durante e após a Segunda Guerra Mundial, geraram as condições ideais para que o *A. aegypti* se proliferasse, desta forma, dando início uma pandemia de Dengue. O aumento da transmissão epidêmica levou à circulação de vários sorotipos do vírus e ocorreram casos de Febre Hemorrágica do Dengue (DHF) em algumas cidades do Sudeste Asiático. A primeira epidemia descrita da DHF ocorreu em Manila, Filipinas, de 1953 a 1954. Posteriormente houve disseminação pelo sudeste da Ásia, até meados de 1970, e a DHF tornou-se a principal causa de morte e hospitalização de crianças naquela região. Na Ásia, epidemias de DHF permitiram a expansão do *Dengue virus* para a Índia, Sri Lanka, Maldivas, Paquistão e leste da China. Algumas ilhas do Pacífico Sul e Central tiveram relatos de epidemias com ocorrência de DHF (GUBLER, 1998b).

Durante as décadas de 50 e 60, através das medidas do programa de erradicação do vetor principal, coordenadas pela Organização Pan Americana de Saúde, a maioria dos países da América Central e do Sul erradicaram o *Aedes aegypti*. No entanto, com o término do programa de erradicação no início dos anos

70, o *Aedes aegypti* reinfestou muitos destes países e, já no final dessa década, havia recolonizado a região (Figura 4) (RIGAU-PEREZ *et al.*, 1998; GUBLER, 2002).

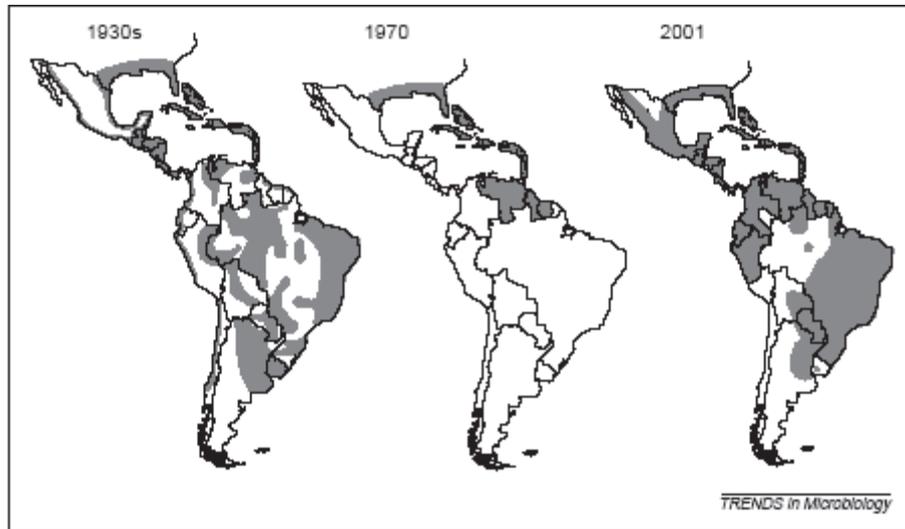


Figura 5 Distribuição do *Aedes aegypti* nas Américas em: 1930, 1970 e 2001. Fonte: (GUBLER, 2002).

Nos últimos 20 anos, houve uma dramática ressurgência de epidemias de Febre do Dengue (DF) nos trópicos, associada à expansão do vetor e dos vírus. Nas últimas duas décadas, o *Dengue virus* aumentou progressivamente a circulação nas Américas, encontrando-se hiperendêmico e com alta morbidade, incapacitando temporariamente centenas de milhares de pessoas. Também começam a surgir, com frequência, casos de DHF e da Síndrome do Choque da Dengue (DSS), muitos dos quais são fatais (FIGUEIREDO *et al.*, 1992).

Em 1998, 1-2 milhões de casos de DF e DHF foram relatados pela WHO (1999), incluindo 3.442 óbitos (GUZMAN e KOURI, 2002). O aumento das formas graves de Dengue nas áreas tropicais da América que vêm ocorrendo desde as décadas de 80 e 90 é semelhante ao já ocorrido no Sudeste Asiático nos anos 60 e 70 (GIBBONS & VAUGHN, 2002). Durante o ano de 2002, os países da América Latina relataram mais de 1 milhão de casos de DF com mais de 17.000 casos de DHF, incluindo 225 óbitos (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

2.1 Manifestações Clínicas da Dengue

A infecção pelo DENV causa um espectro de doenças variando de uma síndrome viral inaparente ou branda a febre do dengue (DF) clássica e febre hemorrágica do dengue (DHF) e síndrome do choque do dengue (DSS) (GUZMAN, 2000; ENDY, 2002). Todos os quatro sorotipos causam uma enfermidade similar, mas a doença hemorrágica esta mais comumente associada às infecções pelos DENV-2 e DENV-3 (GUBLER, 1998b). Apesar da DF clássica ser reconhecida a mais de 200 anos, a DHF e DSS só foram reconhecidas como síndromes clínicas muito mais tarde, sendo os primeiros relatos realizados em meados de 1950. A extensão de extravasamento vascular e manifestações hemorrágicas diferenciam estas síndromes clínicas. Apresentações clínicas atípicas podem incluir doença hemorrágica fulminante com falência dos órgãos e encefalopatia (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

2.1.1 Febre clássica do dengue

Em geral, a maioria das infecções por DENV são assintomáticas ou brandas (BURKE *et al.*, 1988; ENDY, 2002), porém condições podem ocasionalmente favorecer uma apresentação mais sintomática da doença na população, como observado no Taiti em 1971. A maior parte das infecções sintomáticas se apresenta sobre a forma de DF clássica, com um período de incubação que pode variar de 3 a 14 dias, mas geralmente é de 4 a 7 dias (WHITEHEAD *et al.*, 2007). A DF apresenta um início súbito de febre acompanhada por dor de cabeça, dor atrás dos olhos, dor generalizada nos músculos e nas articulações, rubor da face, anorexia, dor abdominal e náusea. Acredita-se que, após a inoculação na pele pela picada do mosquito, o vírus replica-se em células dendríticas locais e, seguida pela entrada do vírus na corrente sanguínea, ocorre uma subsequente infecção sistêmica de macrófagos e linfócitos. Apesar dos DENVs variarem muito em sua habilidade de produzirem viremia em paciente de todas as idades, viremia de altos títulos, com aproximadamente 10^5 a 10^6 partículas infecciosas por mL, ocorre durante o período febril disseminando para outras áreas como fígado (JESSIE *et al.*, 2004). Erupções cutâneas também são comuns na DF, com alguns estudos relatando uma incidência maior de oitenta por cento, estas podem possuir aspecto passageiro e polimórfico

(SILER *et al.*, 1926; SABIN, 1952; LAI, 2004). Elas são mais comumente observadas no tronco, na parte interna dos braços e das coxas, e nas superfícies plantares e palmares, sendo que um prurido intenso e descamação podem ocorrer. A DF é tipicamente mais branda em crianças mais jovens do que em crianças mais velhas e em adultos (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Leucopenia, trombocitopenia e elevação de transaminases do soro são comumente relatadas nas infecções sintomáticas do DENV (KUO, 1992; KALAYANAROOJ, 1997; SOUZA, 2004), e juntamente com as erupções cutâneas, foram observadas em pessoas vacinadas com candidatos a vacina utilizando vírus aceitavelmente atenuados. O prognóstico esperado para DF é uma recuperação total, porém algumas infecções por dengue, que resultaram em uma doença severa atípica, têm sido fatais (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

2.1.2 Febre hemorrágica do dengue e Síndrome do Choque do dengue

As formas mais graves da dengue são caracterizadas por febre, trombocitopenia, manifestações hemorrágicas e evidencia de aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de fluido intravascular para os espaços intersticiais (NIMMANNITYA, 1987; GUBLER, 1998b; CARLOS, 2005), Também é importante ressaltar que a viremia em DHF e DSS é de dez a cem vezes maior do que na DF (MURGUE *et al.*, 2000; VAUGHN, 2000). A DHF e DSS são doenças primariamente encontradas em crianças com menos de quinze anos em áreas hiperendêmicas nas quais diversos sorotipos de DENV estão circulando. As manifestações hemorrágicas da DHF incluem: fragilidade dos capilares, petéquias, equimoses, aparecimento de “descolorações” vermelhas ou arroxeadas na pele; sangramento nas mucosas, trato gastrointestinal e de outros locais; vômito de sangue e melena (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

O curso clínico da DHF lembra a DF clássica em sua apresentação abrupta de febre alta e outros sintomas e sinais inespecíficos. No entanto, por volta do período em que ocorreria a defervescência nos casos de DF, a condição do paciente repentinamente deteriora nos casos de DHF, com o surgimento de manifestações hemorrágicas com ou sem sintomas da diminuição do volume sanguíneo devido a extravasamento do plasma. O aumento da permeabilidade vascular permite a perda de plasma para os espaços intersticiais resultando em efusão pleural, porém este

sintoma nem sempre é acompanhado por manifestações hemorrágicas. O acúmulo de fluido na cavidade peritoneal também é comum, com uma incidência de mais de cinquenta por cento sendo relatada em pacientes com DHF examinados por procedimentos de ultra-som (PRAMULIJO e HARUN, 1991; VENKATA SAI *et al.*, 2005). O choque hipovolêmico se estabelece quando ocorre extravasamento suficiente de plasma para os espaços intersticiais. O curso do choque é curto, mas o paciente nessa situação está em risco de vida, e geralmente sucumbe ou se recupera em um período de vinte e quatro horas. Há também relatos de falência fulminante do fígado e manifestações neurológicas em paciente com dengue (KHO *et al.*, 1981; NIMMANNITYA *et al.*, 1987; PATEY *et al.*, 1993; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). A hepatomegalia é evidente em uma grande proporção de crianças com DHF na Tailândia, onde noventa e oito por cento das crianças com DHF possuíam um aumento do fígado (WICHMANN, 2004). Exames histológicos do fígado revelaram acentuado acúmulo de gordura no fígado (esteatose), hepatite com necrose e da presença do corpúsculo de Councilman (glóbulo eosinofílico observado no fígado de indivíduos com febres hemorrágicas virais, em especial a febre amarela, e é resultado da necrose de somente uma célula do fígado) em alguns destes casos.

A patogênese da DHF e da DSS é complexa e ainda não completamente entendida. Acredita-se que as alterações em coagulação e permeabilidade vascular observadas surgem de uma combinação de replicação viral aumentada; aumento da morte celular por infecção, células imunes citotóxicas e anticorpos; ativação do sistema complemento; e aumento da liberação de mediadores inflamatórios por células infectadas ou células do sistema imune (WHITEHEAD *et al.*, 2007). O papel do sistema imune em DHF e DSS é discutido abaixo.

2.2 Imunidade às infecções por DENV

A resposta imune adaptativa para a infecção por DENV contribui para a cura da infecção e possui um grande papel na proteção contra re-infecção. De forma contrária, também se acredita que ela também desempenhe um papel crucial na gravidade da doença observada em pacientes com DHF e DSS. Portanto a imunização contra o DENV precisa abordar ambos os problemas de imunidade protetora quanto o papel patogênico proposto para os anticorpos em pacientes com

DHF ou DSS. Está claro que a presença de anticorpos neutralizantes direcionados contra a proteína do envelope viral (E) é o principal mediador da imunidade protetora contra a infecção por DENV, e, desta forma, a indução de níveis protetores destes anticorpos é um grande objetivo da imunização.

Tanto vacinas atenuadas como vacinas não vivas, prontamente induzem anticorpos neutralizantes e imunidade protetora. Barreiras para uma imunização bem sucedida, como a incapacidade de gerar imunidade protetora de longo prazo, que existem para os vírus da hepatite C e do vírus da imunodeficiência humana (HIV), não estão presentes em DENV. Uma resposta mediada por anticorpos neutralizantes robusta é gerada após a infecção por DENV e acredita-se que gerem proteção vitalícia contra re-infecção pelo mesmo sorotipo de DENV e uma resposta de curto prazo de apenas alguns meses contra os sorotipos heterólogos (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Este curto período de proteção cruzada tem sido associado à presença de anticorpos neutralizantes de reação cruzada que declinam rapidamente após a infecção (INNIS, 1997), no entanto, o mediador específico desta proteção ainda não foi identificado. O papel da imunidade celular específica contra a re-infecção é aparentemente pequeno (CALVERT *et al.*, 2006), apesar disto, a imunidade mediada por células T contra DENV, por analogia à WNV, é passível de significativa contribuição na eliminação do vírus, e pesquisa adicional é necessária para determinar o papel da resposta imune mediada por células T contra DENV.

Em áreas endêmicas, doenças causadas por DENV em crianças com menos de seis meses são incomuns, isto indica que anticorpos maternos transmitidos de forma passiva podem proteger os infantes (PENGSA, 2006). O título de anticorpos neutralizantes no soro das mães demonstrou estar correlacionado com a idade em que os infantes começavam a apresentar a doença, e que infantes com um título de anticorpos maior que 1:10 são resistentes a doença causada pelo DENV (KLIKIS *et al.*, 1988). A resistência mediada por anticorpos contra a infecção por DENV também foi demonstrada experimentalmente através da transferência passiva de anticorpos monoclonais em camundongos (KAUFMAN *et al.*, 1987; KAUFMAN, 1989). Anticorpos monoclonais contra a proteína viral E se revelaram protetores e foram primariamente associados com alta atividade neutralizante, mas anticorpos monoclonais protetores que não eram neutralizantes também foram identificados.

Anticorpos neutralizantes para o domínios II e III da proteína E bloqueiam primariamente a fusão de membrana e adesão viral, respectivamente (ROEHRIG *et al.*, 1998; BURKE e MONATH, 2001; CRILL e ROEHRIG, 2001).

Outra característica da imunidade para DENV, que é de interesse considerável no desenvolvimento de vacinas, é a capacidade que uma segunda administração de uma vacina (viva, tetravalente e atenuada) contra DENV tem de infectar macacos nos quais anticorpos neutralizantes contra a primeira dose da vacina foram gerados (BLANEY *et al.*, 2005). Quando a segunda dose da vacina é aplicada um mês após a primeira dose, o efeito de “boosting” não é observado. No entanto, um “boost” robusto pode ser obtido quando a segunda dose é aplicada após um intervalo mais longo de aproximadamente quatro meses. Aparentemente, os fatores imunológicos que resultam em imunidade heterotípica de curto prazo são efetivos em prevenir a infecção da segunda após um mês, mas não após quatro. A capacidade de reinfectar após quatro meses na presença de anticorpos neutralizantes é surpreendente, e talvez esteja relacionada com a capacidade do DENV de infectar utilizando o receptor de Fc γ da IgG (Fc γ R), este permite que, na presença de anticorpos neutralizantes, o vírus infecte um número suficiente de células para induzir vigorosa resposta imune secundária. É possível que o aumento do título de anticorpos contra os quatro sorotipos seja resultado da infecção por apenas um sorotipo que consegue romper as barreiras imunes e induz um aumento heterotípico de anticorpos neutralizantes contra todos os sorotipos (EDELMAN, 2003; SUN, 2003; BLANEY *et al.*, 2005).

A resposta imune contra DENV não só medeia a proteção contra a doença, como também serve como um importante fator na patogênese da DHF e da DSS, apesar de outros fatores como a virulência de diferentes linhagens virais e fatores genéticos do hospedeiro também poderem desempenhar um papel (STEPHENS, 2002; FERNANDEZ-MESTRE *et al.*, 2004; SAKUNTABHAI, 2005). Os mecanismos exatos que medeiam um aumento da doença não são completamente definidos, no entanto, foi estabelecida uma forte associação entre doença grave e humanos sofrendo de uma segunda infecção heterotípica (VAUGHN, 2000). Acredita-se que o aumento da gravidade da doença que é observado após uma segunda infecção por um sorotipo diferente de DENV seja mediado primariamente por anticorpos

heterotípicos não neutralizantes preexistentes que acentuam o acesso de DENV a células que contêm FcγR. Tais células seriam infectadas de forma ineficiente na ausência de anticorpos. Isto resulta em um aumento tanto no número de células que carregam FcγR infectadas, quanto na quantidade total de vírus produzidos. Este aumento na replicação viral contribuiria para o aumento do título viral observado no sangue de pacientes com DHF e DSS (MURGUE *et al.*, 2000; VAUGHN, 2000). Este fenômeno recebeu o nome “intensificação dependente de anticorpos” (ADE) (HALSTEAD, 1988). A ativação imune e extensivo dano aos tecidos causado pelo aumento da replicação viral, ativação do sistema complemento e apoptose presumivelmente mediam os eventos patológicos da DHF e DSS (KURANE e ENNIS, 1997).

Um papel para ADE no desenvolvimento de DHS e DSS que é independente da resposta imune celular é sugerido pelo fato de que crianças com idades de 6 a 12 meses em áreas endêmicas serem mais susceptíveis a DHF e DSS (NGUYEN, 2004). Acredita-se que isto esteja relacionado com a diminuição do título de anticorpos maternos contra DENV abaixo do nível protetor, o que ocorre por volta do sexto mês, as crianças, de fato, ficam com um risco aumentado para desenvolverem DHF e DSS por uma curta janela de tempo, apesar do fato de nunca terem sido infectados por DENV em não possuírem uma resposta imune celular específica. Após a degradação completa dos anticorpos maternos, os infantes perdem esta susceptibilidade à DHF e DSS. Estes fatos sugerem que anticorpos preexistentes mesmo na ausência de resposta imune celular específica são suficientes para promoverem a replicação viral aumentada observada nos casos de DHF e DSS, através do efeito ADE (KLIKIS *et al.*, 1989; STEPHENSON, 2005; AVIRUTNAN, 2006; GREEN e ROTHMAN, 2006). ADE e a imunopatogênese de DHF são característica dos DENV que terão de ser tomadas em consideração durante o desenvolvimento de um programa de vacinas. Porém este obstáculo pode ser superado pela utilização de vacinas que induzam resposta de anticorpos neutralizantes para todos os sorotipos, desta forma, impedindo os eventos que levam a escada para as formas mais severas da doença.

2.3 Epidemiologia

Os DENV são mantidos em ciclos florestais envolvendo primatas e mosquitos do gênero *Aedes* (Figura 5), porém os DENV são os únicos arbovírus que conseguiram se adaptar aos humanos e seu ambiente doméstico que não necessitam mais de seu ciclo de floresta para sua manutenção (GUBLER, 2002). Sendo assim, o principal ciclo de transmissão envolve mosquitos e humanos em grandes centros urbanos nos trópicos. O *Aedes aegypti* é o principal vetor do vírus, mas outros mosquitos como *A. albopictus* e *A. polynesiensis* também estão envolvidos com a transmissão da doença. A doença se distribui principalmente na região tropical do globo, porém as áreas subtropicais e temperadas são susceptíveis à introdução e propagação do vírus durante o período do verão (GUBLER *et al.*, 2007).

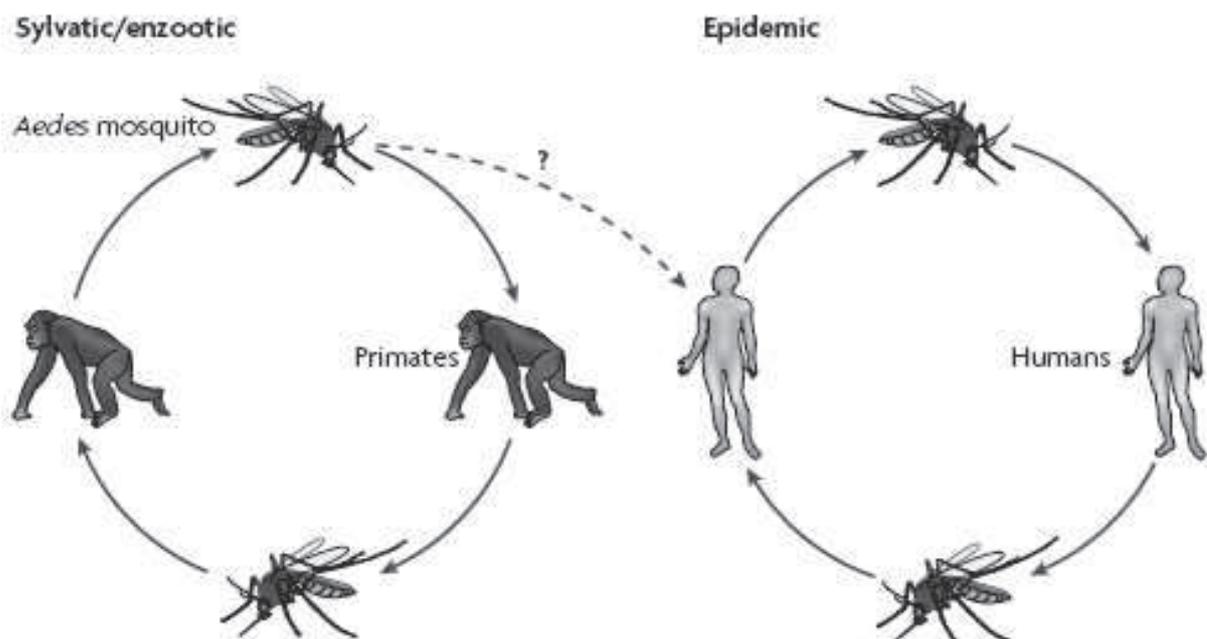


Figura 6: Ciclo silvestre de dengue e ciclo epidêmico. Fonte WHITEHEAD, 2007

Em centros urbanos tropicais infestados pelo vetor um ou mais sorotipos de DENV um ou mais sorotipos podem ser comumente encontrados, em outros locais epidemias são resultado da introdução de outro sorotipo (A *et al.*, 2004). Dependendo de diversos fatores, como linhagem viral, idade, e estado imune da população, a dengue pode se apresentar como uma doença leve, e a disseminação do vírus pode passar despercebida, ou em um cenário diferente podem haver

epidemias com altas taxas de infecção sintomática e doença severa. Outros fatores como mudanças no ambiente nas populações humanas, do vírus e dos mosquitos podem resultar em aumento da transmissão e epidemia (GUBLER *et al.*, 2007).

No continente americano a frequência de infecções tem aumentado desde 1980 e múltiplos sorotipos de dengue foram introduzidos (MONATH, 1994). Desde a década de 1970, a região tropical do continente foi reinfestada pelo *Aedes aegypti* (Figura 5)(GUBLER *et al.*, 2007), com isto, houve grandes surtos de dengue, alguns envolvendo mais de um milhão de pessoas em populações susceptíveis imunologicamente e com infecção variando de 20 a 90 por cento (KOURI *et al.*, 1998). Em muitos países tropicais na Ásia e nas Américas estabeleceu-se um padrão endêmico de transmissão de dengue, com epidemias ocorrendo a cada 3 a 6 anos (GUBLER, 1998a; CUMMINGS *et al.*, 2004).

No Brasil, entre 1998 e 2008 foram notificados 3.825.077 casos de dengue. O maior número de casos ocorreu em 2002 quando foram notificados 697.998 casos. Após essa epidemia, houve uma redução significativa em 2003 e 2004 com 281.005 e 72.481 casos respectivamente. A partir de 2005, as notificações voltaram a subir, com registro de 150.827 casos neste ano, 259.514 casos em 2006, em 2007 foram notificados 475.267 casos e em 2008 houve outra grande epidemia com 585.769 casos registrados, o segundo maior valor desde 1990. Este padrão também se repetiu para os óbitos da doença, no entanto, o número casos confirmados de Dengue com complicações aumentou vertiginosamente em 2008 sendo registrados 17.945 casos um número muito mais alto do que na maior epidemia que ocorreu em 2002 onde se registraram apenas 4.778. Há ocorrência de casos de dengue em todas as regiões do País, sendo nordeste e sudeste, as regiões com maior número de casos com 43 e 35 por cento dos casos, respectivamente (http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27629).

O monitoramento da circulação viral em 2009 demonstra que o sorotipo DENV 3 continua predominando no país, representando 66% das amostras isoladas. Entretanto, observa-se também, um percentual crescente de isolamentos do sorotipo DENV 2 (31%), sendo esse sorotipo predominante nos Estados do Ceará (89%), Rio de Janeiro (69%) e São Paulo (60%). O sorotipo DENV 1 foi isolado em apenas 2%

das

amostras

(http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27629).

2.4 Vacinas Experimentais Contra DENV

Os esforços no desenvolvimento de uma vacina contra o DENV têm se focado principalmente em vacinas com vírus atenuados e vacinas com vírus inativados. Estes estudos tomam como exemplo o sucesso das vacinas utilizando o YFV atenuado 17D e o JEV atenuado SA14-14-2, e as vacinas de vírus inativados contra JEV e TBEV. Também têm sido realizados esforços na geração de vacinas utilizando subunidades virais, vetores e DNA, porém estes estudos ainda estão em fase inicial de desenvolvimento. Os maiores desafios no desenvolvimento de vacinas contra estes vírus encontram-se na necessidade de gerar uma vacina tetravalente eficaz, que impeça o desenvolvimento da ADE e, por conseguinte, DHF e DSS, e no fato de que esta deverá gerar uma imunidade duradoura (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

2.4.1 Vacinas de vírus atenuados

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 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 pudesse ser identificado o nível de passagens que geraria o melhor balanço entre atenuação e imunogenicidade. Nos estudos 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 contrário 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 tetra-valente 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 DENV1 e DENV-4 (MEN *et al.*, 1996; WHITEHEAD, 2003a). A deleção do fragmento 3' 172–143, denominada Δ 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 DENV1 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. Estudos também demonstraram que a mutação $\Delta 30$ é geneticamente estável mesmo após a replicação em humanos. Devido ao fato dos vírus DEN2 $\Delta 30$ e DEN3 $\Delta 30$ não serem candidatos apropriados para vacinas, foi utilizada a estratégia alternativa baseada em vírus quiméricos. Estes vírus foram construídos utilizando-se o DEN4 $\Delta 30$ 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 DEN2 $\Delta 30$, DEN3 $\Delta 30$, DEN2/4 $\Delta 30$ e DEN3/4 $\Delta 30$ 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 tem 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 pelas dos quatro sorotipos do DENV individualmente. A atenuação destes candidatos a 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 demonstraram baixa ou nenhuma infectividade nos mosquitos vetores (HIGGS, 2006). 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-DEN2 foi testada com sucesso em humanos e demonstrou ser segura e imunogênica (GUIRAKHOO, 2006). Os relatos iniciais dos testes de fase um da vacina tetra valente ChimeriVax

indicam que ela é segura e sem nenhum efeito colateral sério, mas pode ser necessário administrá-la em doses maiores que 10^4 pfu por mL (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

2.4.2 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 deveria ser igualmente imunogênico. No entanto o uso destas vacinas apresenta seus próprios desafios, dentre eles está o fato desta vacina apenas conter as proteínas estruturais do vírus, desta forma 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 a vacina 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).

2.4.3 Vacinas de subunidade recombinante

Antígenos do dengue, primariamente a proteína E tem 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 imunização 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 em macacos rhesus, utilizando vacinas monovalentes de proteínas E truncadas 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 e 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 mais 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).

2.4.4 Vacinas de ácidos nucleicos

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 imunoestimulatórios, 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).

2.4.5 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 disto poder ser realizado sem os riscos associados a vacinas utilizando o patógeno atenuado como a regressão à forma patogênica. Alguns destes vetores também possuem a vantagem de poder serem administrados a pacientes imunocomprometidos.

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 cortadas na extremidade C terminal deixando a proteína expressa com aproximadamente 80% do comprimento completo. Os vetores MVA construídos tiveram sua 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, 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. Os animais 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).

3 A família *Poxviridae*

Os maiores e mais complexos vírus DNA, que infectam células de hospedeiros animais, estão compreendidos na família *Poxviridae*. Eles são capazes de multiplicação no citoplasma das células de hospedeiros, sendo estes tanto vertebrados quanto invertebrados. Estes vírus se caracterizam como grandes vírus envelopados com forma ovóide ou de tijolo, cujas dimensões podem variar entre 220-450nm X 140-260nm. Possuem genoma composto de uma molécula de DNA dupla fita linear que varia de 130 a 300 Kpb, sendo que, as extremidades encontram-se covalentemente unidas em alça (MOSS, 2001; ESPY *et al.*, 2002).

A família se divide em duas subfamílias, a subfamília dos vírus que infectam invertebrados é denominada *Entomopoxvirinae*, esta subfamília é muito divergente geneticamente, o que pode ser apontado como indício de que foi a primeira a divergir (GUBSER *et al.*, 2004). Já os vírus que infectam vertebrados são agrupados como *Chordopoxvirinae*, e se subdividem em oito gêneros: *Parapoxvirus*, que contém, dentre outros, os vírus *Orf* e *Pseudocowpox*; gênero *Avipoxvirus*, que contém alguns vírus aviários como *Fowlpox* e *Canarypox*; gênero *Capripoxvirus*, contendo vírus de animais ungulados que podem ser transmitidos por artrópodes; gênero *Leporipoxvirus*, contendo vírus de esquilos e coelhos como *Myxoma vírus*; gênero *Suipoxvirus*, que contém vírus de suínos com estreito espectro de hospedeiro; *Molluscipoxvirus*, que contém o vírus *Molluscum contagiosum*, que infecta seres humanos causando displasias celulares; gênero *Yatapoxvirus*, que contém vírus de roedores e primatas e, por último, o gênero *Orthopoxvirus*, que contém vírus que infectam humanos, animais de interesse veterinário e animais silvestres, sendo também o gênero protótipo da família e, portanto, o mais profundamente estudado e conhecido (MOSS, 2007).

Os membros de um gênero são agrupados conforme suas similaridades antigênicas, genéticas e morfológicas (FENNER, 2000). No entanto, nota-se que vírus de espectro restrito, como o *Variola virus*, são encontrados agrupados no mesmo gênero que vírus de amplo espectro de hospedeiros, como os *Vaccinia virus* (VV) e *Cowpox virus*. Pouco se sabe sobre os mecanismos que governam esta

especificidade. Porém, acredita-se hoje que o tropismo dos poxvírus em nível celular é determinado por eventos intracelulares que ocorrem após a adsorção e penetração dos vírus. Isto contrasta com o que é observado para a maioria dos outros vírus, nos quais disponibilidade de receptores celulares específicos é o fator determinante do tropismo viral (MCFADDEN, 2005). Apesar desta característica, a família *Poxviridae* apresenta apenas duas espécies que são patógenos humanos específicos, o *Variola virus* (gênero *Orthopoxvirus*) e o *Molluscum contagiosum virus* (gênero *Molluscipoxivirus*), porém três outras espécies de *Orthopoxvirus* – *Monkeypox virus*, *Cowpox virus* e *Vaccinia virus* - também podem vir a causar doença em humanos (MOSS, 2001).

3.1 Morfologia

As partículas virais maduras intracelulares (IMV) dos poxvírus apresentam forma ovóide ou de tijolo, e medem em torno de 200 a 320 nm, aproximando-se do limite de definição do microscópio óptico (BULLER e PALUMBO, 1991). Ao microscópio eletrônico, pode ser observado um envelope externo, circundando um cerne na forma de disco ovalado, bicôncavo e envolto por uma camada composta de pequenas subunidades protéicas cilíndricas, denominada paliçada. Nas concavidades do cerne, encontramos estruturas de natureza protéica (devido à sensibilidade ao tratamento com tripsina) denominadas corpúsculos laterais. Estas estruturas são heterogêneas, sem nenhuma forma definida (CYRKLAFF *et al.*, 2005). No interior do cerne encontra-se o DNA viral complexado a quatro grandes polipeptídios em uma estrutura denominada nucleossoma, dada sua semelhança àquelas encontradas nas células de eucariotos, além de enzimas virais (SODEIK e KRIJNSE-LOCKER, 2002; MALKIN *et al.*, 2003; CYRKLAFF *et al.*, 2005). Já as partículas extracelulares (EEV) possuem um envelope lipídico adicional, também adquirido da célula hospedeira e que dão a esta forma certas características únicas em relação ao IMV, tais como maior resistência à neutralização por anticorpos e à ação do sistema complemento (SMITH e LAW, 2004).

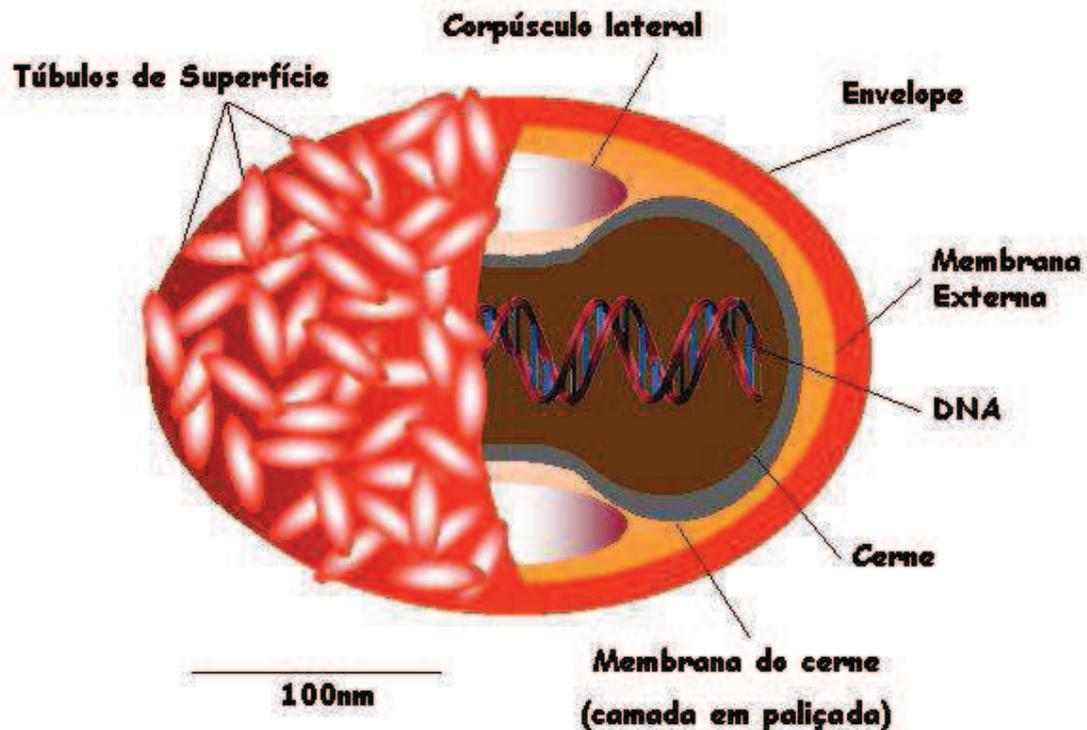


Figura 7: Representação esquemática da partícula do vírus Vaccinia: A figura mostra a partícula viral infecciosa completa (EEV) evidenciando seus elementos estruturais principais: membrana externa, corpúsculos laterais, cerne e envelope. Fonte: Adaptado de (FENNER, 1989).

3.2 Estrutura do Genoma

Os poxvírus apresentam um genoma composto por uma molécula de DNA dupla fita que varia de 130 Kpb (parapoxvirus) a 300 Kpb (avipoxivirus) que é unido por alças de fita simples em suas extremidades. Todos os poxvírus possuem sequências denominadas ITR's (*inverted terminal repetitions* – repetições terminais invertidas). Estas sequências são idênticas, porém orientadas em sentidos diferentes nas extremidades do genoma. As ITRs das duas fitas de DNA são ligadas covalentemente formando alças de fita simples, ricas em adenina e timina, denominadas alças terminais. A região, de cerca de 100pb, adjacente às alças é

altamente conservada e contém sequências necessárias para a formação dos concatâmeros durante replicação do DNA e um conjunto de pequenas sequências repetidas em *tandem* (MOSS, 2001).

Os genes da região central do genoma são geralmente conservados entre todos os poxvírus. Estes genes estão relacionados a funções essenciais, como replicação do DNA, transcrição, enzimas e proteínas estruturais (SMITH e MCFADDEN, 2002; SEET *et al.*, 2003). Nas porções terminais do genoma existem regiões que codificam genes que estão envolvidos na interação com o hospedeiro e que, em sua maioria, não são essenciais para a multiplicação do vírus em cultivo celular. Estudos demonstram que estas regiões sofrem frequentes rearranjos genéticos como duplicação de genes, transposição e provavelmente transferência horizontal de genes do hospedeiro, tais como os análogos de citocinas e quimiocinas e seus receptores solúveis (MOSS, 2001; (HUGHES e FRIEDMAN, 2005). Desta forma, estas regiões possuem importância na co-evolução destes vírus com seus hospedeiros, uma vez que lhes permitem codificar uma gama de proteínas para evasão da resposta imune destes, auxiliando na sua disseminação dentro do organismo e na sua dispersão no ambiente natural (GUBSER *et al.*, 2004).

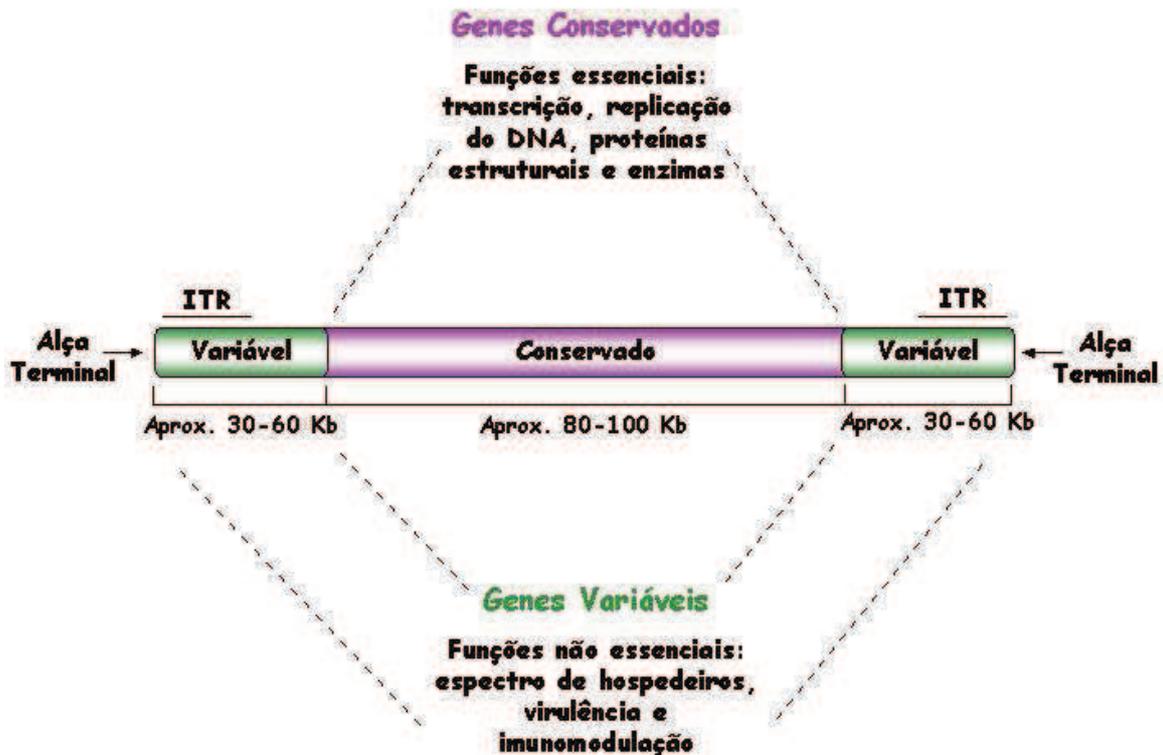


Figura 8: Representação esquemática do genoma dos poxvirus. O genoma possui, em média, 200 Kb e pode ser dividido em duas partes. Uma região central conservada que codifica principalmente proteínas essenciais para a replicação viral e as regiões terminais, que são mais variáveis e codificam proteínas não essenciais para a replicação viral em cultura de células. Estas últimas também contêm as regiões terminais invertidas e repetidas (ITR). **Fonte:** Adaptado de SMITH & McFADDEN, 2002.

É importante ressaltar que a expressão gênica nos poxvirus é regulada temporalmente, sendo a replicação do DNA o marco que divide as fases precoces e tardias. Diferentes promotores e fatores virais e celulares são utilizados para se alcançar esta divisão temporal e otimizar a produção da progênie viral (BROYLES, 2003).

3.3 Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos poxvírus é bastante complexo devido à existência de várias formas infecciosas e possui uma peculiaridade dentre os vírus DNA de animais, pois ocorre inteiramente no citoplasma, característica compartilhada apenas com a família *Asfarviridae*. O ciclo necessita de apenas de alguns fatores de transcrição do núcleo celular para otimização da transcrição dos genes virais. De fato, a multiplicação destes vírus já foi observada em células anucleadas (MOSS, 2001). A duração do ciclo de multiplicação pode variar de acordo com o vírus e a célula infectada. Por exemplo, para o VV a duração do ciclo de multiplicação varia de 12 a 24 horas em células de linhagem contínua derivadas de rim de macaco verde (Vero). As informações que se seguem são relativas ao ciclo de multiplicação do *Vaccinia virus*, porém, uma vez que este é o vírus protótipo da família, refletem também os mecanismos que ocorrem durante o ciclo de multiplicação da grande maioria dos poxvírus (MOSS, 2001; SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002).

3.3.1 Adsorção

Assim como acontece para outros vírus, a infecção dos poxvírus inicia-se com a adsorção da partícula viral à superfície celular. Porém, os poxvírus diferem da maioria dos vírus por não possuírem um ligante único específico de interação com receptores celulares. Desta forma, a possibilidade de utilização de diferentes receptores, bem como a existência de duas formas infectivas com topologias distintas, IMV e EEV, tornam difícil o entendimento do processo de ligação dos poxvírus às células hospedeiras. Sendo assim, hoje se sabe que as formas IMV e EEV ligam-se a diferentes receptores, isto devido à presença de diferentes proteínas em suas superfícies. No entanto, a natureza destes receptores continua pouco conhecida (SMITH *et al.*, 2003).

3.3.2 Penetração e Desnudamento

Muitos mecanismos de penetração vêm sendo propostos para poxvírus, isto ocorre em decorrência da falta de um consenso a respeito do número de membranas lipídicas que envolvem as formas infectivas dos poxvírus (SODEIK e KRIJNSE-

LOCKER, 2002; SMITH *et al.*, 2003). Porém, assumindo-se que a partícula de IMV possui apenas uma membrana lipídica, um simples processo de fusão de membranas seria capaz de explicar sua penetração (SMITH *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a forma EEV tem seu envelope mais externo rompido em uma reação não-fusogênica dependente da ligação com poliânions presentes na superfície celular (LAW *et al.*, 2006). Tal dissolução permitiria a liberação de uma forma IMV na superfície celular, que penetraria por fusão através do mecanismo descrito anteriormente na literatura (CARTER *et al.*, 2005).

Independentemente do modo exato de penetração do vírus na célula, o resultado final do processo é a liberação do cerne viral, contendo o genoma do vírus e enzimas associadas no citoplasma (MALLARDO *et al.*, 2002). Após este processo, o cerne é degradado, o que é denominado de desnudamento secundário. Uma vez que o uso de inibidores transcricionais e traducionais interrompe o ciclo de multiplicação dos poxvírus nesta etapa, torna-se aparente que ela é dependente de uma proteína viral ou de alguma proteína celular induzida pelo vírus (MOSS, 2001). Acredita-se que durante esse processo, o genoma permanece inserido no cerne até que ocorra a síntese das proteínas precoces, necessárias para induzir a liberação do DNA viral. Após o desnudamento do cerne, o DNA se associa com a membrana do retículo endoplasmático rugoso, formando um sítio de replicação para onde proteínas precoces envolvidas na síntese de DNA são recrutadas (MALLARDO *et al.*, 2002).

3.3.3 Expressão de Genes Virais

Como ressaltado anteriormente, existe um controle da expressão gênica em poxvírus que atua através de um mecanismo em cascata e ocorre na etapa de iniciação da transcrição. Neste mecanismo, os fatores transcricionais de uma etapa são transcritos pela anterior gerando um controle temporal, desta forma os fatores transcricionais necessários para a expressão dos genes intermediários são codificados por genes precoces; já os fatores necessários para a expressão de genes tardios são, por sua vez, produtos de genes intermediários, e aqueles fatores responsáveis pela transcrição de genes precoces são produtos de genes tardios, que são encapsidados no interior da partícula viral para serem utilizados no próximo ciclo de multiplicação (BALDICK *et al.*, 1992; MOSS, 2001; CONDIT e NILES, 2002; BROYLES, 2003). No entanto, deve se lembrar da existência de genes virais que são

expressos durante todo o tempo da infecção. Geralmente, isto ocorre devido ao fato destes genes, geralmente possuírem um arranjo de promotores precoces e intermediários ou tardios em *tandem*, a montante de uma ORF (MOSS, 2001; BROYLES, 2003).

Aproximadamente metade dos genes virais conhecidos corresponde a genes precoces. Eles codificam para proteínas relacionadas a diversos processos como a biossíntese de nucleotídeos, evasão imune, replicação do DNA, fatores de crescimento e transcrição dos genes intermediários (CONDIT e NILES, 2002; BROYLES, 2003). Embora existam outros, somente alguns genes do VV pertencentes à classe dos genes intermediários, foram identificados. Os genes tardios codificam a maioria dos polipeptídios estruturais, enzimas e fatores de transcrição precoces que farão parte da partícula viral e correspondem, praticamente, à outra metade dos genes virais (MOSS, 2001).

3.3.4 Replicação do Genoma

A replicação do DNA viral ocorre entre 2 e 3 horas após infecção, dependendo do vírus, multiplicidade de infecção e do tipo de célula hospedeira (MOSS, 2001). Ela ocorre exclusivamente no citoplasma em regiões granulares, eletrodensas denominadas “fábricas virais” ou virossomos. Acredita-se que estas fábricas sejam derivadas de membranas e organelas celulares (MALKIN *et al.*, 2003). Sendo assim, este processo parece ser independente do núcleo celular e a maioria (se não todas) as proteínas necessárias à replicação do DNA viral são codificadas pelo vírus. Ao contrário do completo sistema de transcrição dos mRNAs precoces que faz parte da partícula viral, as proteínas envolvidas na replicação do DNA são sintetizadas nos estágios precoces da infecção, no entanto, algumas destas proteínas podem fazer parte da partícula viral. A princípio, proteínas celulares necessárias à síntese de DNA viral poderiam ser recrutadas do núcleo, embora nenhuma tenha ainda sido encontrada (FENNER, 1989; MOSS, 2001).

A replicação do DNA viral inicia-se com um corte em um sítio específico no DNA parental em uma ou ambas as regiões das ITR do genoma. Isto é, considerando-se que um corte ocorra em uma ou ambas as alças da fita, é produzido um iniciador com uma extremidade 3'-OH livre. É importante lembrar, no entanto, que esta etapa

inicial jamais foi demonstrada experimentalmente, e nenhuma enzima envolvida no processo de quebra inicial do DNA foi identificada. Em seguida, as alças terminais são desfeitas e extremidades 3' OH expostas servirão como iniciadores para a fita complementar. O DNA recém sintetizado volta a se dobrar através do pareamento das ITRs, formando novas alças, dando continuidade à replicação da fita-nascente, formando então moléculas concatêmeras que serão posteriormente clivadas em moléculas maduras de DNA, as quais serão, posteriormente, empacotadas nas novas partículas virais (MOSS, 2001). Este processo resulta na geração de aproximadamente 10.000 cópias do genoma viral por célula, porém, destas apenas a metade será empacotada nas partículas virais durante a morfogênese (FENNER, 1989).

3.3.5 Morfogênese

A morfogênese ou montagem dos poxvírus começa 5 a 6 horas após a infecção. Durante a morfogênese pode-se observar a formação de diversas estruturas: vírus crescentes, vírus imaturo (IVs), vírus maduro intracelular (IMV), vírus envelopado intracelular (IEV), vírus extracelular associado à célula (CEV) e finalmente o vírus envelopado extracelular (EEV) (MOSS, 2001; SMITH e MCFADDEN, 2002). Neste processo a primeira estrutura visível são estruturas circunscritas, em forma de lua crescente, constituídas de proteínas virais e lipídios do hospedeiro. Essas estruturas contêm espículas ligadas em sua superfície convexa e se estendem para formar vírions imaturos esféricos (IV). Embora as partículas dos IV contenham o genoma viral, elas não são infecciosas. Os IVs maturam a IMVs através de várias clivagens das proteínas do capsídeo viral, o que promove condensação do cerne viral e garante a forma característica de tijolo da forma IMV (SMITH e MCFADDEN, 2002; SODEIK e KRIJNSE-LOCKER, 2002; SMITH *et al.*, 2003).

3.3.6 Liberação

A partícula IMV representa a maioria da progênie infecciosa de cada célula, porém só são liberadas da célula em caso de lise. Devido a sua alta resistência no ambiente, estas partículas virais desempenham um papel importante na transmissão entre hospedeiros. A membrana do IMV teria sua origem em vesículas oriundas do

compartimento intermediário entre o Retículo Endoplasmático e o Complexo de Golgi (ERGIC) (SODEIK e KRIJNSE-LOCKER, 2002; SMITH *et al.*, 2003).

Uma parte dos IMVs deixa as fábricas virais transportada por microtúbulos e são envolvidos por duas membranas intracelulares derivadas do complexo *trans*-Golgi ou de endossomos, formando os IEVs. Esta membrana lipídica adicional torna as partículas virais envelopadas menos sensíveis a ação do complemento e de anticorpos, devido à presença de proteínas específicas do CEV/EEV, virais e celulares (SMITH e MCFADDEN, 2002). Os IEVs são ativamente transportados pelo citoesqueleto por microtubulos e ao alcançar a membrana celular, a membrana mais externa dos IEVs se funde com esta, expondo no meio extracelular os vírus envelopados. As partículas que permanecem na superfície celular são chamadas CEVs e, quando liberados no meio extracelular, são denominados EEVs (WARD, 2005). A exposição de formas CEV na superfície celular permite a interação de proteínas virais de envelope com um receptor celular desconhecido. Esta interação leva ao recrutamento de um complexo de proteínas celulares (NEWSOME *et al.*, 2004), que induz a formação de filamentos de actina que direcionam o vírus às células vizinhas. Os CEVs importantes são para a propagação célula-célula em monocamada celular, isto é devido à propulsão fornecida pela cauda de actina que fornece um eficiente mecanismo para este tipo de propagação (JOHNSON e HUBER, 2002). Devido à maior resistência à eliminação pelo sistema imune, os EEVs são importantes para a disseminação do vírus dentro do hospedeiro ao permitirem disseminação do vírus para células distantes (MOSS, 2001; SMITH e MCFADDEN, 2002; SMITH *et al.*, 2003). Os IMVs, que não são convertidos em IEV, CEV ou EEV, podem permanecer no citoplasma da célula como partículas livres ou ficarem retidos dentro de corpúsculos de inclusão (ATI), que são estruturas protéicas bem definidas e grandes (FENNER, 1989; MOSS, 2001). A maioria dos orthopoxvírus, incluindo o VV, não forma ATI, mas outros o fazem, como Cowpox, Raccoonpox e Ectromelia (FENNER, 1989; MOSS, 2001; SMITH e MCFADDEN, 2002). O ATI aumenta a estabilidade do IMV após a morte celular e ajuda na transmissão viral entre hospedeiros, devido ao aumento na resistência no ambiente (SMITH e MCFADDEN, 2002).

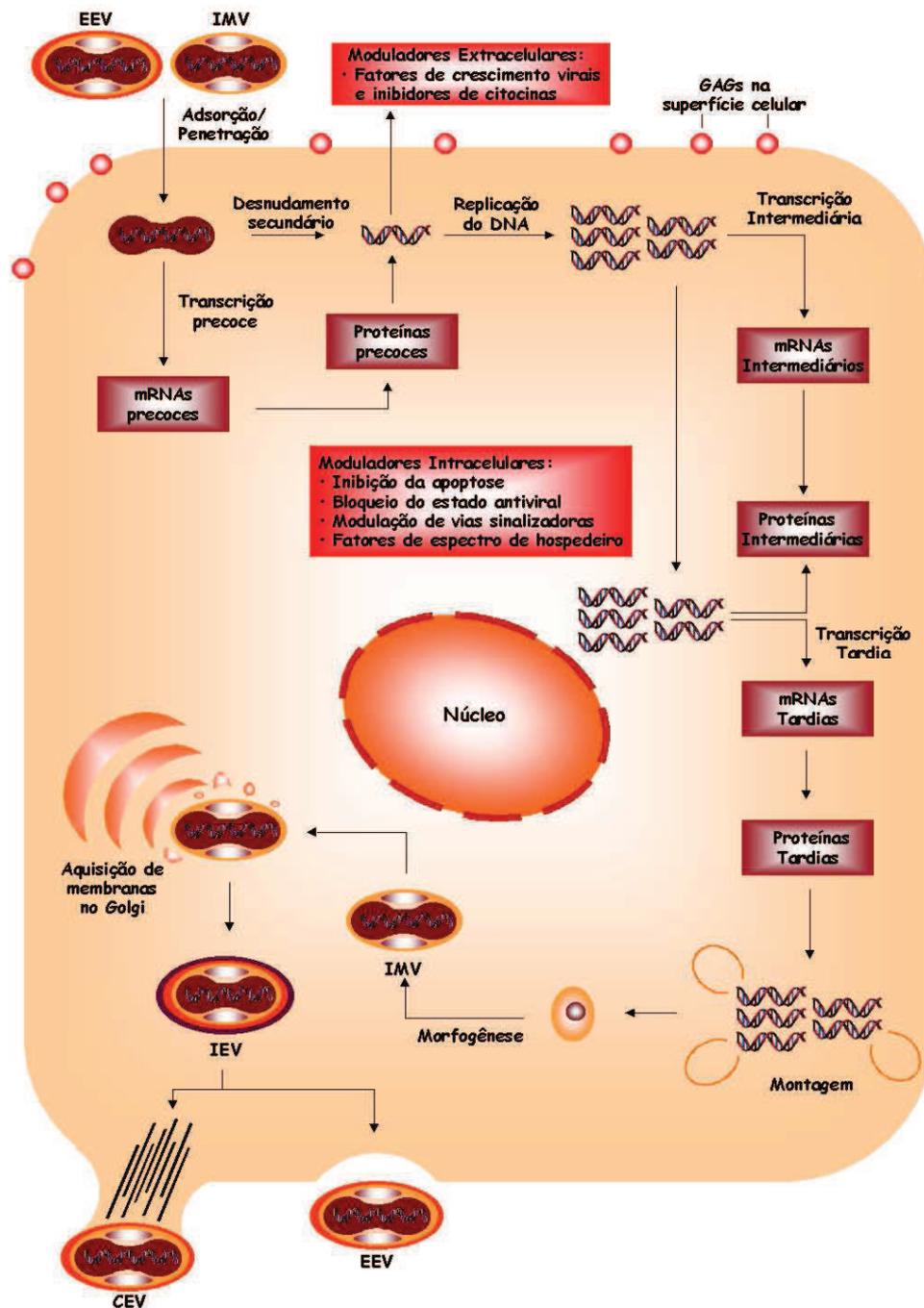


Figura 9: Ciclo de multiplicação dos Poxvírus: As duas formas infectivas dos poxvírus, o vírus envelopado extracelular (EEV) e o vírus maduro intracelular (IMV) iniciam o seu ciclo ao se ligarem e penetrarem na célula, ocorrendo o desnudamento primário. Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes imediatamente precoces e após a síntese de proteínas precoces, ocorre o desnudamento secundário e consequente liberação do DNA no citoplasma. Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção atuam, então, na replicação do DNA viral. Durante e após a replicação deste DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários e tardios. Finalmente, tem-se a montagem do vírus e este é

liberado no meio extracelular, ou permanece associado à célula sendo propelido por meio de caudas de actina para as células vizinhas. *Ver texto para detalhes.* **Fonte:** Adaptado de McFADDEN, 2005.

4. POXÍRUS COMO VETORES

4.1 Histórico

As bases para a utilização de poxvírus como vetores para expressão de genes exógenos foram estabelecidas no mesmo ano em que a vacinação contra varíola foi descontinuada pela WHO, e os primeiros vetores virais recombinantes foram construídos apenas dois anos depois (MACKETT *et al.*, 1982; PANICALI e PAOLETTI, 1982). Desta forma, o fim da primeira e mais bem sucedida campanha de vacinação, serve como marco para um novo capítulo na longa história de utilização dos poxvirus. Esta nova era foi marcada pelo desenvolvimento de diversos poxvirus expressando genes de antígenos de vírus, bactérias e parasitas patogênicos. Estes vetores foram avaliados em modelos animais e nas espécies alvos (MOSS, 1996; PAOLETTI, 1996). Hoje, relativo sucesso comercial foi atingido na geração de vacinas para o campo veterinário (YOKOYAMA *et al.*, 1997) e existem vacinas em teste clínico para a utilização em humanos (WEBSTER *et al.*, 2005). Além desta sua utilização na indução imune, novos campos estão sendo contemplados como a utilização na construção de bibliotecas genômicas (SMITH *et al.*, 2001) e até mesmo imunoterapia do câncer (MASTRANGELO e LATTIME, 2002).

4.2 Utilização

Quando são considerados vetores para sistemas de terapia gênica, os candidatos costumam ser adenovirus e retrovírus. Estes vetores têm sido escolhidos segundo critérios como tropismo, duração de expressão e capacidade de integração com o genoma do hospedeiro. Diversas características do ciclo de multiplicação dos poxvírus os tornam fracos candidatos para uma expressão de longo prazo, isto tem levado estes vírus a terem sua pesquisa negligenciada. Porém, estes vírus podem vir a ser ideais em aplicações de imunoterapia, incluindo sua capacidade de utilização

como agente replicativo voltado diretamente contra tumores sólidos. Eles também podem ser utilizados como vetores recombinantes para vacinas e na expressão de genes *in situ* que expressam a produção de citocinas, estas que levam ao reconhecimento e rejeição de tumores (PAOLETTI, 1996; MASTRANGELO e LATTIME, 2002).

O potencial dos poxvirus como vetores é reflexo de diversas características. Dentre elas pode ser destacado o amplo tropismo celular, que nos poxvirus não é regido pela disponibilidade de receptores celulares específicos, e sim, por eventos intracelulares que ocorrem após a adsorção e penetração dos vírus. Isto permite que os vírus infectem de maneira eficiente uma gama variada de tipos celulares, esta característica também gera a possibilidade de células infectadas serem parcialmente permissivas, o que permite que ocorra a expressão dos genes virais sem ativa multiplicação do vírus, esta possibilidade será discutida mais a fundo adiante (MASTRANGELO *et al.*, 2000; MCFADDEN, 2005).

A morfologia dos vírus da família *Poxviridae* também apresenta diversas características muito interessantes: o grande tamanho da partícula viral e do genoma permite a inserção estável de grandes fragmentos de DNA podendo chegar a até vinte e cinco mil pares de base, muito acima do esperado para diversos outros vetores (MOSS, 1996; 2001). Além da capacidade de tolerar a inserção de grandes fragmentos, o genoma dos poxvirus é transcrito no citoplasma, desta forma não requer processamento nuclear e o RNA não precisa ser transportado a partir do núcleo. Também pode se ressaltar que a tradução dos genes alvo em proteínas ocorre em níveis relativamente altos. Estes vírus também apresentam grande potencial ao se analisar o modo como interagem com o sistema imune do hospedeiro. Uma vez que a expressão dos genes alvo ocorre mesmo que o hospedeiro possua imunidade específica contra o vetor (MASTRANGELO *et al.*, 2000).

Vetores poxvirais possuem a vantagem de sua manipulação ser relativamente segura, por exemplo, o VV pode ser contido em laboratórios com nível de biosegurança dois (MASTRANGELO *et al.*, 2000) e o vírus MVA pode ser mantido em laboratórios de nível de biosegurança um.

Outro fator de importância é a relativa simplicidade empregada nos métodos para a construção e manipulação destes vetores, que são baseados na recombinação homóloga, um processo que ocorre naturalmente dentro das células infectadas. Também se pode ressaltar que as proteínas são expressas, processadas e transportadas seguindo as vias de produção celular naturais, gerando ao fim proteínas biologicamente ativas com características iguais as geradas no ambiente original (MOSS, 1996; MASTRANGELO *et al.*, 2000). Os poxvirus também possuem grande estabilidade na forma de vacina liofilizada, sendo que esta possui custos baixos de produção, é de fácil produção e administração. A vacina produzida pode ser administrada por diversas vias, sendo que a inoculação intranasal e/ou oral, gera resposta específica nas mucosas (PASTORET e VANDERPLASSCHEN, 2003)

4.3 Poxvirus como vetores vacinais

As estratégias para vacinação contra agentes infecciosos, utilizam a inoculação do patógeno atenuado, morto e, mais recentemente, proteínas recombinantes. Estes protocolos, apesar de amplamente utilizados, possuem algumas desvantagens. A inoculação de patógenos atenuados não pode ser realizada em indivíduos imunocomprometidos, e existe sempre o risco deste sofrer regressão à forma patogênica. A utilização do patógeno morto e de proteínas recombinantes geram uma forte resposta humoral, mas, em geral, a resposta imune celular é fraca o que se torna um problema no caso de patógenos intracelulares (LEVINE e SZTEIN, 2004).

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.

4.5 Modified Vaccinia Ankara

A erradicação da varíola foi um triunfo do programa de vacinação global, porém este sucesso não ocorreu sem risco associado à vacina. Foram associados à vacina efeitos adversos, que tiveram consequências severas ou letais. Estes efeitos adversos podiam apresentar uma distribuição generalizada, ou mais específica com taxas mais altas em certas populações, com certas linhagens vacinais ou preparações. Em crianças jovens o *eczema vaccinatum* e a encefalite eram complicações sérias, mas infrequentes, já em adultos podiam ocorrer casos de vaccinia progressiva ou disseminada mediante imunodeficiência. As tentativas iniciais de manufaturar o vaccinia em condições mais definidas e reguladas foram abandonadas com o sucesso da erradicação. Desta forma, a conhecida capacidade do vaccinia de gerar efeitos adversos, foi um problema a ser resolvido quando se propôs que estes vírus fossem utilizados como vetores. Diversas abordagens foram desenvolvidas para aumentar a segurança do *Vaccinia vírus*, e, durante a era da varíola, diversas linhagens atenuadas destes vírus foram desenvolvidas com este intuito (MOSS, 1996; PAOLETTI, 1996).

Uma destas linhagens foi gerada a partir de um isolado de uma lesão poxviral, em um equino, na região de Ankara na Turquia. Este isolado sofreu 572 passagens seriais em culturas primárias de fibroblastos embrionários de frango (CEF) (SUTTER e STAIB, 2003). A seleção gerada por este processo resultou em seis deleções de aproximadamente trinta e um Kbp, o que corresponde à cerca de quinze por cento do genoma da linhagem selvagem (MEYER *et al.*, 1991; ANTOINE *et al.*, 1998). A maior parte dos genes deletados ou truncados demonstrou estar envolvida com atividades imunoregulatórias ou com o espectro de hospedeiros, sendo que múltiplos defeitos genéticos teriam de ser corrigidos para que ocorresse a reversão ao tipo selvagem. A este vírus foi dado o nome de vaccinia Ankara modificado (MVA) (SUTTER e MOSS, 1992; MOSS, 1996; ANTOINE *et al.*, 1998; BLANCHARD *et al.*, 1998; WYATT, 1998).

O MVA demonstrou ser fenotípica e geneticamente estável, e incapaz de multiplicação em grande parte das linhagens celulares de mamíferos testadas, incluindo as de origem humana, porém, mesmo em células não permissivas, os

genes virais são expressos (SUTTER e MOSS, 1992; CARROLL e MOSS, 1997; DREXLER *et al.*, 1998; WYATT, 1998). Isto ocorre porque a multiplicação viral, nas células de mamíferos, é bloqueada nos estágios tardios da morfogênese, desta forma, não impedindo a síntese das proteínas do vírus (MOSS, 1996). A perda da habilidade do vírus de se replicar em células de mamíferos, o tornou altamente atenuado, sendo que nenhum efeito adverso foi reportado mesmo quando altas doses de MVA foram administradas a primatas não humanos imunodeficientes (STITTELAAR *et al.*, 2001) ou em camundongos com um quadro severo de doenças de imunodeficiência combinadas (WYATT *et al.*, 2004). Seu perfil de segurança foi comprovado pela mínima morbidade apresentada quando deliberadamente se vacinou, durante a campanha de erradicação da varíola na Turquia e Alemanha, um grupo de cento e vinte mil pessoas cuja vacinação era de alto risco, como eczemasos, crianças e idosos (STITTELAAR *et al.*, 2001; MOORTHY *et al.*, 2003; VAN ROMPAY *et al.*, 2003; HUGHES e FRIEDMAN, 2005). De fato, o MVA é tão seguro que o trabalho com ele é permitido em laboratórios com nível de segurança 1, sem a necessidade de vacinação (MOSS, 1996).

Apesar de sua não patogenicidade, o MVA carrega e expressa antígenos de forma altamente imunogênica, que estimula tanto a resposta humoral quanto a celular (RAMIREZ *et al.*, 2000; SUTTER e STAIB, 2003), sendo que sua eficácia como um vetor vacinal tem sido avaliada em uma miríade de modelos de doenças infecciosas e tumores (CARROLL e MOSS, 1997; MINEV *et al.*, 1999; BONNET *et al.*, 2000; DREXLER *et al.*, 2004). Porém, em vista da capacidade limitada de replicação do MVA, em estudos médicos onde o MVA for utilizado como vetor vacinal, pode ser necessário que sejam desenhados protocolos mais eficientes, que acentuem ainda mais a resposta imune, desta forma conferindo uma maior proteção contra patógenos e tumores (WEYER *et al.*, 2007). Estudos apontam que interferon gama (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) poderiam ser utilizados com este intuito uma vez que estão envolvidos na modulação do sistema imune, desta forma, desempenhando um papel crítico na diferenciação de linfócitos T helper (Th) e no balanço entre as respostas Th1 e Th2 (ABAITUA *et al.*, 2006).

O genoma do MVA possui 178 Kb em comprimento, sendo assim significativamente menor do que o genoma do VV Copenhagen que possui 192 Kb.

Das 193 ORFs presentes neste vírus, provavelmente apenas 177 correspondam a genes, sendo que vinte e cinco destes genes estão divididos e/ou sofreram mutações resultando em proteínas encurtadas. No MVA, a região genômica terminal esquerda contém quatro grandes deleções e uma grande inserção quando comparada com a linhagem VV Copenhagen. Em adição a isto muitas ORFs nesta região estão fragmentadas, deixando apenas oito genes estruturalmente intactos e, portanto presumivelmente funcionais. O DNA inserido codifica para um grupamento de genes que também é encontrado na linhagem VV WR e no *Cowpox vírus* (CPV), e inclui um gene altamente fragmentado que homólogo ao gene de espectro de hospedeiro do CPV, o que serve de evidencia de que, possivelmente, um vírus semelhante ao CPV foi o ancestral do vaccinia. Surpreendentemente, a região central conservada do genoma, também contém alguns genes fragmentados, incluindo a ORF F5L, que codifica uma importante proteína de membrana, e as ORFs F11L e O1L. A região genômica terminal direita possui três grandes deleções, sendo que, todos os genes clássicos de evasão do sistema imune e todos os genes *ankyrin-like* localizados nesta região estão fragmentados exceto pelos que codificam para o receptor de interleucina 1b e a proteína *ankyrin-like* B18R. Portanto o fenótipo atenuado do MVA é resultado de numerosas mutações, particularmente afetando as proteínas de interação com o hospedeiro, incluindo genes *ankyrin-like*, mas também envolvendo algumas proteínas estruturais.

II. JUSTIFICATIVA

A Dengue é atualmente considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem em termos de morbidade e mortalidade (GUBLER, 1998b). Comparando a distribuição de dengue em 1950 com a atual, nota-se o aumento significativo de nove países registrando a doença, para mais de cem, respectivamente. A WHO estima que mais de dois bilhões e meio de pessoas estão em risco de infecção pelo DENV. A maior parte destas pessoas poderá sofrer apenas de infecções assintomáticas, mas é importante ressaltar que a infecção vem se tornando um importante fator na mortalidade infantil em países da Ásia e América do Sul. O número de casos de DF e DHF aumentou de 908 no período de 1950 e 1959, para 514.139 entre 1990 e 1999. Porém, o valor real estimado fica próximo de 50 milhões de casos por ano causando cerca de 24.000 mortes (GUHA-SAPIR e SCHIMMER, 2005).

Metade da população mundial vive em países onde o DENV é endêmico, um fator que ressalta a urgência de soluções para o problema, uma vez que o impacto social da doença é grave. Em países em desenvolvimento, a DF causa a perda de dias de trabalho em comunidade dependentes de salários, e as formas mais severas, como DHF e DSS, têm uma alta taxa de mortalidade, uma vez que, o nível de cuidados médicos necessários está além do alcance da maior parte das pessoas que necessita dele (GUHA-SAPIR e SCHIMMER, 2005).

Esforços recentes para desenvolver uma vacina segura e efetiva contra dengue têm se focado principalmente em vírus vivos atenuados por passagens seriadas do tipo selvagem em culturas celulares ou por modificações genéticas do genoma viral (MCKEE *et al.*, 1987; BRAY *et al.*, 1996; VAUGHN *et al.*, 1996). Também tem sido feito progresso na geração de uma vacina utilizando o vírus inteiro inativado (PUTNAK & BARVIR *et al.*, 1996; PUTNAK & CASSIDY *et al.*, 1996). Apesar disto, os estudos de candidatos promissores a vacinas permanecem no estágio experimental.

O MVA é um mutante altamente atenuado do VV obtido através de repetidas passagens em células CEF. Nestas células o vírus se multiplica eficientemente, atingindo altos títulos, enquanto na maioria das células de mamíferos ele é deficiente na replicação devido a problemas na morfogênese (SUTTER e MOSS, 1992). Porém em células de mamíferos as proteínas exógenas ainda são expressas

abundantemente (WYATT *et al.*, 1996). Vários MVA recombinantes demonstram induzir resposta imune protetora contra uma grande variedade de vírus infecciosos, como os vírus influenza e parainfluenza (SUTTER *et al.*, 1994; WYATT *et al.*, 1996; DURBIN *et al.*, 1998). Os estudos realizados até o momento, utilizando vetores MVA recombinantes como vacina, sugerem que estes merecem futura avaliação como candidatos a vacinas para humanos, uma vez que o MVA provou ser seguro em estudos clínicos envolvendo mais de cem mil pessoas (MOSS, 1996).

Ao contrário dos outros VV, o MVA não gera efeitos citopáticos, como a destruição da monocamada celular, isto dificulta a seleção de clones e observação da multiplicação destes. Estudos mais antigos utilizavam a marcação por anticorpos para identificar os vírus selvagens e anticorpos específicos para identificar os vírus recombinantes (SUTTER *et al.*, 1994; WYATT *et al.*, 1996; DURBIN *et al.*, 1998), processo que é muito lento e oneroso. Estudos mais recentes têm utilizado marcadores fluorescentes para identificar a presença destes vírus (BISHT *et al.*, 2004); (COSMA *et al.*, 2004; WYATT *et al.*, 2008), o que facilita e acelera o processo por não exigir nenhum tipo de especial preparação. Também é importante ressaltar que a marcação por fluorescência permite a inserção de múltiplos genes no genoma de MVA com possibilidade de seleção facilitada, uma vez que diferentes marcadores podem ser utilizados para cada um dos genes inseridos. Essa última possibilidade ainda não havia sido testada para a plataforma de vetores recombinantes MVA.

Sendo assim, neste estudo propomos a construção de vetores MVA modificados para expressar a proteína E e NS1 dos DENV como meio de desenvolver uma estratégia alternativa para vacinação. Uma vez que estas proteínas já demonstraram a capacidade de gerar imunidade protetora em estudos anteriores (MEN *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2007). Devido ao fato das proteínas serem produzidas pelas células do vacinado, ocorre a apresentação pelo sistema de MHC de classe II, o que deve levar a uma resposta celular mais robusta, fator que pode vir a ser o diferencial na geração de uma vacina eficiente contra DENV. O projeto também utiliza um sistema de diferentes proteínas marcadoras fluorescentes (GFP e RFP) relativamente novo e ainda pouco estudado, que permite um estudo direto do comportamento dos vírus recombinantes gerados. Com todos os fatores citados acima, torna-se clara a grande importância que o presente projeto tem, tanto na

geração de uma vacina contra DENV, como desenvolvimento da tecnologia de vetores recombinantes no Brasil.

III. OBJETIVOS

1 Objetivo geral

- Construir vetores virais recombinantes, baseados no vírus MVA, que expressem proteínas do vírus DENV 2, e também múltiplas proteínas marcadoras fluorescentes

2 Objetivos específicos

- Construir plasmídeos de transferência pLW44 contendo as regiões codificadoras da proteína E e NS1 do vírus DENV2;
- Através do processo de recombinação homóloga, gerar Vetores MVA recombinantes, contendo o gene codificador da proteína E de DENV2 em seu genoma (MVA-DENV2-E);
- Através do processo de recombinação homóloga, gerar Vetores MVA recombinantes, contendo o gene codificador da proteína NS1 de DENV2 em seu genoma (MVA-DENV2-NS1);
- Através do processo de recombinação homóloga, gerar Vetores MVA recombinantes, contendo os genes codificadores tanto da proteína NS1 quanto a proteína E de DENV2 em seu genoma (MVA-DENV2-E-NS1);
- Através do processo de recombinação homóloga, gerar Vetores MVA recombinantes, contendo genes codificadores das proteínas marcadoras GFP ou RFP;
- Avaliar a expressão das proteínas marcadoras GFP ou RFP em células infectadas pelo vírus MVAs recombinantes gerados.

- Avaliar a expressão da proteína E em células infectadas pelo vírus MVAs recombinantes gerados.
- Avaliar a expressão da proteína NS1 em células infectadas pelo vírus MVAs recombinantes gerados.

IV. METODOLOGIA

1. Vírus e plasmídeos de transferência

O vírus MVA parental deste estudo foi gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of viral Diseases – NIAID-NIH, EUA). O pool semente foi cedido sob a forma de extrato de células infectadas com título viral igual a 4×10^9 PFU/mL, foi gerado então um novo estoque semente por meio de três passagens em células CEF.

O cDNA codificando o gene da proteína E foi preparado pela Dr. Jaqueline Germano de Oliveira (Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil) e foi clonado no plasmídeo pGEM-T, ficando entre dois sítios para as enzimas de restrição *SmaI* e *PstI*, dando origem ao clone DRD3.5 (pGEM-TDENV2ESmaIPstI). O cDNA codificando para o gene que expressa DENV2 NS1/2a também nos foi cedido pela Dr. Jaqueline Germano de Oliveira e também está clonado no plasmídeo pGEM-T e está contido entre dois sítios de restrição para a enzima *SmaI*, dando origem ao clone 14.13 (pGEM-TDENV2NS1/2aSmaI). Estes cDNAs foram gerados a partir de rtPCRs do soro de pacientes infectados pelo DENV2.

Um dos plasmídeos de transferência, utilizado para a inserção do gene recombinante da , foi o pLW44 (Figura 10) (BISHT *et al.*, 2004), também cedido pelo Dr. B. Moss. Este plasmídeo possui um cassete de expressão no qual o gene exógeno é controlado por um promotor forte do tipo early/late dos poxvirus (mH5). Este cassete é flanqueado por sequências de DNA homólogas às presentes na “Região de Deleção III” do genoma do MVA e tem a função de dirigir a recombinação a esta região. Contíguo ao gene exógeno e dentro da região flanqueada pelas sequências homólogas à região de Deleção III está o gene que codifica a Proteína Verde Fluorescente (GFP) controlado por promotor tardio do VV. Também dentro desta região estão sítios de restrição para as seguintes enzimas *SmaI*, *Sall* e *PstI*.

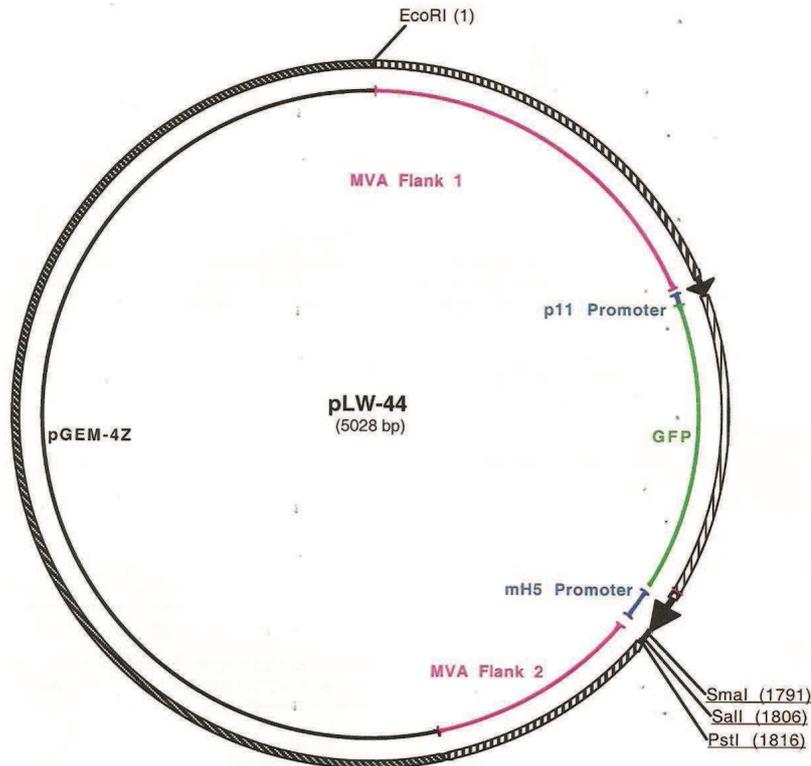


Figura 10: Estrutura do Plasmídeo pLW44. Em vermelho as duas regiões franqueadoras homólogas à região de Deleção III; em verde, está o gene que codifica a Proteína Verde Fluorescente; também estão indicados os sítios de ação das três enzimas de restrição.

O plasmídeo pJD19, também foi cedido pelo Dr. Bernard Moss, possui uma organização estrutural similar ao pLW44, tendo origem no plasmídeo pLW37 (WYATT *et al.*, 1996) acrescido do gene para RFP. No entanto, as regiões flanqueadoras direcionam a recombinação homóloga para o sítio de deleção II. Ao invés de GFP o promotor p11 está controlando o gene da proteína vermelha fluorescente (*Red Fluorescent Protein* - RFP). Ele também possui um ao promotor MH5 que controla um sítio de inserção com dois sítios de digestão para *Sall* e *SmaI*. Também nota-se que o promotor p11 está situado em sentido oposto ao promotor MH5 (Figura 11).

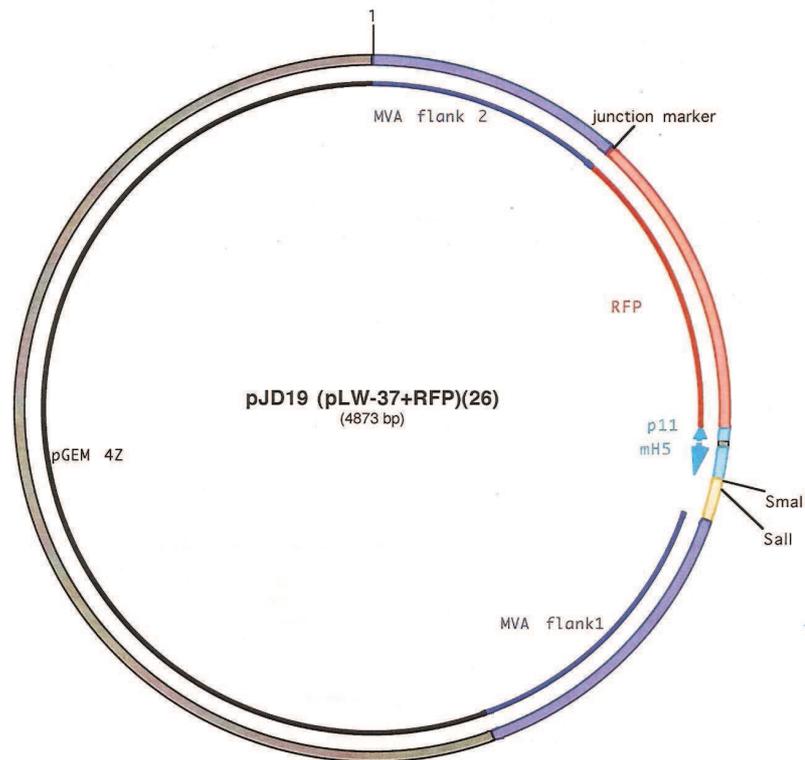


Figura 11: Estrutura do Plasmídeo pJD19. Em lilás as duas regiões franqueadoras homólogas à região de Deleção II; em vermelho, encontra-se o gene que codifica a RFP; também estão indicados os sítios de ação das duas enzimas de restrição *SmaI* e *Sall*.

2. PCR

Como citado anteriormente, a primeira fita do cDNA codificador para a proteína E de DENV2 nos foi fornecida clonada no plasmídeo pGEM-T, ficando entre dois sítios para as enzimas de restrição *SmaI* e *PstI*. No entanto, a análise inicial do inserto revelou que existe um sítio de ação da enzima de restrição *PstI* na região central deste (Figura 12). Sendo assim, foi necessário realizar uma PCR para inserir um sítio de *Sall*.

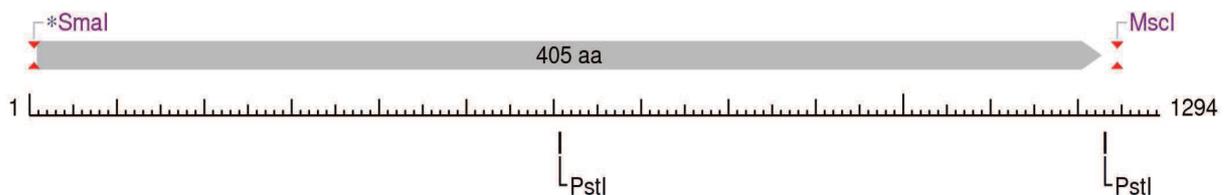


Figura 12: Esquema dos sítios de restrição do inserto do Clone DRD3.5. Em destaque o sítio para *PstI* no centro do inserto.

Para a amplificação do gene que codifica para a proteína E de DENV2 foram então utilizados o par de iniciadores mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Seqüência e amplificado esperado para os iniciadores Den2E-SmaF e Den2E-SalR, em negrito os sítios de restrição para cada enzima.

Iniciadores	Seqüência	Amplificado
Den2E-SmaF	5'- TCCCCCGGGATGCGTTGCATAGGAATATCAAATAGAG -3'	~ 1237 pb
Den2E-SalR	5'-GGCCAAATGATTGAGACAACATAAG TCTGACT TATA- 3'	

Esse par de iniciadores foi desenhado com base nas seqüências existentes no GeneBank para o gene que codifica para a proteína E do DENV2. Eles amplificam aproximadamente 80% do tamanho total desse gene. Essa estratégia foi adotada, uma vez que estudos anteriores (MEN *et al.*,2000) relatam que a proteína E truncada na região C-terminal é mais imunogênica do que a proteína completa. Além disso, esses iniciadores, como o nome deles indica, possuem sítios de restrição para as enzimas SmaI e SalI, permitindo a subclonagem do produto amplificado no plasmídeo de transferência pLW44.

Na reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction –PCR foram utilizados 2 µL da primeira fita do cDNA codificador para a proteína E de DENV-1; 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM); 2 µL de tampão 10X (KCl 500 mM, Triton X100 1%, Tris pH 8,3 100 mM); 0,2 µL de enzima Taq polimerase (3 U/µL); 0,2 µL de cada iniciador (10 pmol/µL); 0,4 µL de dNTPs (10 mM) e H₂O até o volume final de 20 µL.

A amplificação ocorreu da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; pareamento a 58°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 2 minutos; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

3. Eletroforese em gel de agarose

O produto das reações de PCR foi separado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, onde os produtos amplificados foram comparados a padrões de tamanho molecular conhecidos. Cerca de 10 µL de cada reação foram separados em géis de agarose ultra pura 0,8% em TAE 1X (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA) acrescidos de 0,5 ug/mL de brometo de etídio a um potencial elétrico constante de 80 volts. Os fragmentos foram visualizados e fotografados no transluminador de luz UV.

4. Purificação de DNA de bandas de gel de agarose

As bandas de DNA foram cortadas do gel de agarose utilizando-se um bisturi limpo, e armazenadas em um microtubo. Com isto realizado, o peso do gel cortado com a banda foi determinado descontando-se o peso do microtubo. Foram adicionados três vezes o peso de GTI (Isotiocianato de Guanidina) em relação ao peso determinado de cada banda. A solução foi incubada a 55°C durante quinze minutos, sendo homogeneizada em intervalos regulares. Então, foram adicionados 10uL de sílica, sendo que a mistura foi vortexada por cinco segundos e posteriormente incubada no homogenizador durante dez minutos à temperatura ambiente. Após este período de incubação a solução foi centrifugada a 16.000 G durante 10 segundos. Então foi realizado o processo de lavagem com GTI que consiste em descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 250 µL de GTI por meio vortexamento, e novamente centrifugado a 16.000 G durante 10 segundos. O processo de lavagem foi repetido duas vezes substituindo GTI por Etanol 96%. Após este procedimento foram realizadas outras duas lavagens substituindo o Etanol 96% por Acetona. O sobrenadante da última lavagem com acetona foi descartado e o tubo com o sedimento incubado a 50 °C durante dez minutos com a tampa aberta. Após este período, o sedimento foi eluído em 15 µL de água ultra pura e incubado por cinco minutos à 55°C. Passado o período de incubação a solução foi centrifugada a 16.000 G durante 10 segundos, com isto realizado o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

5. Clonagem no plasmídeo pGEM-T Easy

Os fragmentos de DNA correspondentes ao gene que codifica para a proteína E de DENV-1, purificados a partir do gel de agarose, foram inseridos no plasmídeo pGEM-T Easy, utilizando-se o sistema de clonagem pGEM-T Easy Vector Systems (Promega[®] Corporation, USA).

Para reações de ligação o cálculo utilizado para se saber a quantidade de inserto de DNA foi o seguinte:

$$X = \frac{\text{Ng de vetor} \times \text{Kb do inserto}}{\text{Tamanho em Kb do vetor}} \times \frac{3 \times \text{Inserto}}{\text{Vetor}}$$

Desta forma na reação de ligação de pGEM-T foram adicionados em um tubo estéril 5 µL de tampão 2X para a enzima, água ultra pura em quantidade suficiente para (qsp) 10 µL de reação, 1 µL de pGEM-T, a quantidade correspondente de inserto e 1 µL da enzima T4 DNA ligase. O tubo foi então incubado à 4°C durante dezesseis horas. (Promega[®] Corporation, USA)

6. Transformação em bactérias competentes (SAMBROOK *et al.*, 2002)

O produto das clonagens foi utilizado para a transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes, preparadas de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK e colaboradores (2002).

Assim, 5 µL do produto da clonagem foram misturados a 100 µL de bactérias DH5α quimiocompetentes e imediatamente colocados em banho de gelo e nele mantidos por 30 minutos. Posteriormente, foi realizado o choque térmico a 42°C por 3 minutos e incubação em banho de gelo por mais 2 minutos. Em seguida, 500 µL de meio LB 1X sem antibiótico (Bacto triptona 1% p/v; extrato de levedura 0,5% p/v; NaCl 171 mM) foram adicionados e as bactérias foram incubadas a 37°C, sob agitação de 250 rpm, por 1 hora. A cultura bacteriana resultante foi sedimentada por centrifugação a 16.000 G por 1 minuto e homogeneizada em 100 µL de LB 1X. A suspensão foi inoculada em placas de Petri contendo LB-ágar suplementado com ampicilina (50 µg/mL), estas placas foram incubadas a 37°C e o crescimento

bacteriano observado após 16 horas (SAMBROOK *et al.*, 2002). Paralelamente, foram realizados controles de crescimento de bactérias quimiocompetentes não transformadas, em placas de LB-ágar contendo ou não ampicilina.

7. Triagem de colônias por PCR

As colônias crescidas foram inoculadas em 10 mL de meio LB 1X contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C com agitação de 250 rpm por aproximadamente 18 horas. Em seguida, as culturas bacterianas foram triadas, por PCR, para a verificação da presença do plasmídeo contendo os fragmentos de interesse.

Assim, alíquotas de 2 µL das culturas foram utilizadas como moldes em reações de PCR, com perfil idêntico às reações já descritas (item 2). Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose 0,8% em TBE 1X, acrescido de 0,5 µg/mL de brometo de etídio a um potencial elétrico constante de 80 V. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados. Alíquotas das culturas identificadas como positivas para a presença plasmídeo contendo o inserto foram congeladas com glicerol 40% a -80°C.

8. Obtenção de plasmídeo em pequena escala

As reações para Obtenção de Plasmídeo foram realizadas utilizando-se o Kit “Wizard plus SV Minipreps” (Promega[®], EUA), conforme indicações do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (espectrofotômetro NanoDrops ND-1000) e estocado a -20°C

9. Sequenciamento

O seqüenciamento do cDNA clonado no plasmídeos pGEM-T Easy foi realizado através do método de dideoxi (SANGER *et al.*, 1977), em sequenciador automático capilar Mega Bace1000 (GE HEALTHCARE), utilizando o Kit DYEnamic[™] ET Dye Terminator (MegaBACE[™]), seguindo as instruções do fabricante.

Cerca de 300 ng de cada plasmídeo e 5 pmol de iniciadores universais M13 senso e anti-senso foram utilizados em cada reação de seqüenciamento. Essa

reação foi realizada em placa de 96 poços, em Termociclador Eppendorf 96-well Mastercycler® e nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 segundos, seguida de 36 ciclos de 25 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 3 minutos a 60°C. O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado com acetato de amônio e lavado com etanol, visando a purificação desse produto, e homogeneizado em tampão de amostra.

10. Análise das seqüências

Os resultados do seqüenciamento foram armazenados sob forma de cromatogramas processados automaticamente pelo aparelho mencionado. Esses cromatogramas foram analisados com o auxílio do programa "Electropherogram quality analysis" (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

Esse programa analisa as seqüências geradas pelo seqüenciador automático atribuindo a cada uma delas valores de qualidade, que são determinados pelo programa Phred. As seqüências referentes aos vetores são retiradas e a seqüência consenso é feita por meio do programa CAP3 Sequence Assembly Program (HUANG e MADAN, 1999; <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>).

De posse da seqüência consenso, análises manuais foram realizadas com o objetivo de verificar se o gene para a proteína E estava em condições adequadas para a expressão e, também, analisar a integridade do sítio de ação da enzima *SmaI*, das seqüências complementares aos iniciadores, e a correta inserção do sítio de ação de *SalI*. Para isso, os programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/BLAST.cgi>), MultiAlin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>), BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>), NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) e MEGA 4 foram utilizados.

11. Construção dos plasmídeos de transferência

Para obter os vírus MVA recombinantes expressando as proteína E e NS1 de DENV2, foram utilizado um plasmídeos de transferência que mediarão a recombinação homóloga. Esses plasmídeos de transferência consistem,

basicamente, do cDNA codificador da proteína E clonado no plasmídeo pLW44, e do cDNA codificador da proteína NS1 clonado no plasmídeo pJD19.

11.1 Subclonagem do cDNA do gene para a proteína E no plasmídeo pLW44

Os plasmídeos pGEM-TDEN2ESmaISall gerados e o plasmídeo pLW44 foram digeridos separadamente utilizando se primeiramente a enzima *Sall*. A quantidade de DNA digerida foi de 3000 ng por reação e a quantidade de reagentes utilizada foi a recomendada pelo fabricante. O material foi digerido por três horas a 37° C, após este período, foi incubado por dez minutos a 65°C. A concentração de sais da reação foi então ajustada para favorecer a ação da enzima *SmaI*, e esta foi adicionada, sendo o material incubado por outras três horas a 25°C. Após este processo a reação foi submetida á eletroforese em gel de agarose, para que as bandas nos tamanhos desejados pudessem ser cortadas e purificadas segundo o protocolo descrito acima.

A reação de ligação foi realizada na proporção de 3:1 de inserto em relação à vetor Sendo que em 1 µL de tampão de ligação 10X (Promega), 1 µL (3U) de T4 DNA ligase (Promega), 100 ng do pLW44 digerido, 250 ng do inserto de DENV-1E e H₂O até o volume final de 10 µL. A reação foi homogeneizada e incubada a 12°C por 72 horas, o produto da ligação foi utilizado para a transformação de *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes, como já descrito (item 6). As colônias crescidas foram triadas, por PCR, e aquelas identificadas como positivas foram utilizadas na obtenção de plasmídeos, empregando-se o Kit Wizard Plus SV Miniprep (Promega-USA), conforme instruções do fabricante (itens 7 e 8). Esses plasmídeos foram digeridos em reações com o mesmo perfil descrito acima para a verificação da presença dos insertos de DENV2-E. Uma segunda verificação foi a realização de uma PCR utilizando se os iniciadores pLW44F (5'-CCCGACAACCACTACCTGAG-3') e pLW44R (5'-TGGGCTCCTTATAACCAAGC-3') as condições desta PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; pareamento a 54°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 2 minutos; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

11.2 Subclonagem do cDNA do gene para a proteína NS1/2a no plasmídeo pJD19

No caso dos plasmídeos pGEM-TNS1/2aSmaI gerados e pJD19 foi realizada apenas uma digestão com *SmaI* durante um período de três horas a 37° C. Após este período, o material foi incubado durante dez minutos a 65°C para inativar a enzima de restrição, com isto realizado a reação foi submetida á eletroforese em gel de agarose, para que as bandas nos tamanhos desejados pudessem ser cortadas e purificadas segundo o protocolo descrito acima. A reação de ligação foi realizada de forma similar a descrita no item 11.1, no entanto, as reações foram incubadas incubadas a 4°C *overnight*. As colônias crescidas foram testadas por PCR, utilizando-se os iniciadores DEN2NS1-smaF e DEN2NS2a-SmaR, descritos na tabela 2. As condições desta PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; pareamento a 54°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 2 minutos; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2 – Seqüência e amplificado esperado para os iniciadores DEN2NS1-smaF e DEN2NS2a-SmaR, em negrito os sítios de restrição para *SmaI*.

Iniciadores	Seqüência	Amplificado
DEN2NS1-smaF	5'- TATG CCCGGG GATGGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGG -3'	
		~ 1736 pb
DEN2NS2a-SmaR	5'-TAG CCCGGG TTACCTTTTCTTGTTGGTTCTTGAAAGGG- 3'	

As colônias identificadas como positivas foram utilizadas na obtenção de plasmídeos, empregando-se o Kit Wizard Plus SV Miniprep (Promega-USA), conforme instruções do fabricante (itens 7 e 8). O plasmídeos gerados foram digeridos em reações com o mesmo perfil descrito acima para a verificação da presença dos insertos de DENV2-NS1/2a. Eles também foram submetidos a uma digestão por *EcoRV* e *PvuII* para verificar a orientação dos insertos.

12. Cultivo primário de Fibroblastos de embrião de galinha

Os vírus MVA se desenvolvem bem neste tipo de células, devido a isto, neste projeto eles foram multiplicados e titulados nestas células. Por se tratar de um cultivo primário foi necessário processar embriões de galinha. Isto foi realizado utilizando-se ovos embrionados com aproximadamente dez dias de postura. A partir destes ovos os embriões foram dissecados removendo-se a cabeça, os membros superiores e inferiores e parte das vísceras. O material obtido foi lavado em meio E-MEM e passado através de uma seringa. A massa celular gerada por este processo foi homogeneizada quimicamente através da incubação em meio com tripsina 12,5%, a 37° C e sobre agitação, durante 15 minutos. Após este período, a suspensão celular foi filtrada em gaze estéril, sendo acrescidos, ao filtrado, 200 a 300 mL de meio E-MEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). Devido ao grande número de proteínas presentes no SFB ocorre a neutralização da tripsina. Esse material foi então centrifugado a 1000 G por 10 minutos, o sobrenadante foi então descartado, o pellet foi transferido para outro tubo evitando-se pegar as células de sangue que se acumularam no fundo. Este processo foi repetido mais três vezes. O material gerado por este processo foi transferido para garrafas plásticas de 150 cm² e incubadas em estufa de CO₂ à 37° C até atingirem confluência. A partir deste ponto as células foram sub-cultivadas, por no máximo três passagens, para outras garrafas e placas de acordo com os experimentos a serem realizados.

13. Produção de vírus recombinantes

A tecnologia de construção de vetores poxvirais tem base na recombinação homóloga, que ocorre quando células infectadas por MVA são transfectadas com plasmídeos de transferência contendo os genes alvo. Neste estudo foram utilizadas células CEF infectadas pelo MVA parental na MOI de 1. Durante o período de adsorção, foi realizado o preparo da solução transfectante contendo 2000 ng do plasmídeo de transferência e 5 µL de Lipofectamina (Invitrogen, EUA) em 200 µL meio Optimem (Invitrogen, EUA) sem soro. Esta solução foi incubada por no mínimo, 30 minutos à temperatura ambiente. Após a adsorção o inóculo viral foi removido e substituído pela solução de transfecção, preparada anteriormente, completando-se o volume para 1 mL com meio Optimem sem soro. As células foram então incubadas à

37° C e 5% de CO₂ durante cinco horas, após este período, o meio foi substituído pelo meio E-MEM contendo 2,5 % SFB. As células foram recolhidas depois de decorrido um período de 48 horas e o extrato teve as células lisadas através de três ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos. Este extrato foi então estocado a -70° C até o momento da seleção dos clones virais recombinantes. Os vírus recombinantes produzidos foram selecionados e purificados em ciclos sucessivos de purificação de placa em meio semi-sólido com agarose, seguido da amplificação dos clones para geração do estoque-trabalho (EARL *et al.*, 1991).

Este processo visou construção do vírus MVA-DENV2-E. Este foi produzido pela recombinação do MVA parental com pLW44 contendo o gene codificador da proteína E do DENV2. Os clones recombinantes obtidos foram selecionados sob microscopia de fluorescência, uma vez que é esperado que os recombinantes expressem a GFP, cujo gene codificador está contido no cassete de expressão de pLW44 (Figura 10). O mesmo processo também foi utilizado na construção dos vírus MVA-DEN2-NS1/2a, no entanto o plasmídeo utilizado foi o pJD19 que contém o gene para RFP que emite fluorescência vermelha.

Na construção dos vírus MVA-DENV2-E-NS1/2a, ao invés do vírus MVA parental, utilizou-se os vírus MVA-DENV2-E na transfecção com os plasmídeos pJD19-NS1/2A. Isto produziu vírus tanto que emitiam ambas as fluorescências verde e vermelha. Ao sobrepor-se as imagens geradas estes vírus utilizando o programa Adobe Photoshop CS4, estes clones apresentavam-se como amarelos.

14. Multiplicação viral

Os vírus MVA produzidos foram multiplicados em monocamadas de CEFs aderidas à 20 garrafas de 150 cm². Essas células foram infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI.) de 1, sendo a adsorção em um volume final de 5 mL de meio E-MEM com 10% de SFB, a 37°C e com homogeneização constante durante 2 horas. Depois o volume foi completado para 25 mL acrescentando-se de E-MEM com 2,5% de SFB. Então, as garrafas foram novamente incubada a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas.

Após essas 48 horas, a monocamada de células foi raspada e a solução resultante foi centrifugada por 10 minutos a 2.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi solubilizado com 500 µL de meio E-MEM sem SFB essa suspensão foi submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento em refrigerador -80°C, para rompimento das células infectadas. O material foi então armazenado a -80°C até o momento da purificação viral.

15. Purificação viral (JOKLIK, 1962)

Utilizou-se um “Douncer” para realizar a lise mecânica das células coletadas, em tampão de lise (1mM de MgCl₂; 10 mM de Tris- HCl pH 7; 10 mM de KCl). O lisado então foi centrifugado a 1190 G durante 15 minutos. O sobrenadante, contendo as partículas virais e restos celulares, foi coletado e centrifugado em colchão de sacarose a 36% durante duas horas a 14000 rpm (rotor AH629 Sorvall) e 4°C. Após essas 2 horas, o sobrenadante e a sacarose foram desprezados, e o sedimento, contendo as partículas virais, foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 10mM, pH8, e submetido a dois ciclos de sonicação de trinta segundos cada (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific-USA). Após este processo a suspensão foi alíquotado e armazenado a -80°C.

16. Titulação viral

A titulação dos estoques de vírus foi realizado em células CEF que foram crescidas por 24 a 48 horas, sendo obtidas $1,5 \times 10^6$ células/câmara (35 mm). Quatrocentos microlitros de uma série de diferentes diluições em meio DMEM, realizadas na razão de 10, da suspensão contendo o vírus a ser titulado, foram inoculados às culturas recém confluídas, sendo uma mantida falsamente infectada, como controle celular. Após 2 horas de adsorção, ao meio de inóculo foram adicionados 1,5 ml de DMEM contendo 2,5% de SFB. Como o vírus MVA não produz efeito citopático foram utilizadas as proteínas fluorescentes para realizar a contagem das placas. As diluições contendo entre 30 e 300 placas de lise foram utilizadas para determinação do número de unidades virais formadoras de placas (UFP) por ml de estoque.

17. Western Blot

Para a realização do *Western blot*, os extratos proteicos 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 utilizou os anticorpos policlonais contra o vírus da Dengue 1+2+3+4, ab9200 Abcam®, para a detecção da proteína E, e anticorpos monoclonais contra a glicoproteína NS1 do DENV, ab41490 Abcam®, para a detecção da proteína NS1, nas proporções de 1:10.000 e 1:100 respectivamente. A reação foi incubada por 1 hora e, posteriormente, as membranas foram lavadas com tampão de bloqueio 0,5% [0,5% (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%)] por três vezes, 10 minutos cada. A reação com os anticorpos secundários utilizou os anticorpos policlonais anti-IgG HRP, ab6721, Abcam® para a detecção de E e anticorpos policlonais anti-IgG HRP, ab6728 Abcam® a detecção de NS1, nas proporções 1:3.000 e 1:2000, respectivamente. Esta reação também foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, 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.

V.RESULTADOS

1. Inserção de modificações e clonagem do inserto DEN2E

O resultado da PCR do plasmídeo pDRD35 (pGEM-TDENV2ESmaIPstI), utilizando-se os iniciadores DEN2E-SmaF e DEN2E-SaII/R, apresentou uma banda de aproximadamente 1200 pbs, quando comparada frente a padrão de tamanho molecular *Ladder* de 1 Kb. Esta banda foi exisada do gel por corte e purificada, obtendo-se uma concentração final de 62 ng por μL .

O produto da PCR foi posteriormente clonado ao plasmídeo pGEM-T, e este, transformado em *E. coli* DH-5 α . Os clones obtidos foram selecionados mediante perfil de resistência à ampicilina e 10 foram escolhidos para triagem por PCR de colônia (LCV1-10). Nove dos dez clones testados apresentaram, após eletroforese em gel de agarose do produto da PCR, uma banda de aproximadamente 1200 pbs (Figura 13). Desta forma, foi possível confirmar a presença do inserto nestes plasmídeos.

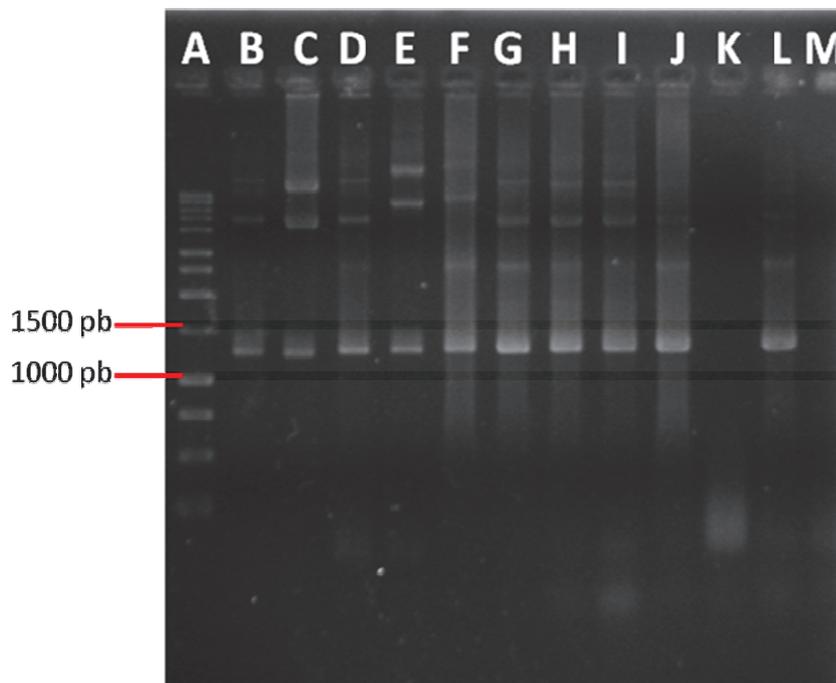


Figura 13: Verificação da presença do inserto DENV2ESmaISaII nos clones transformantes LCV através de PCR. A amplificação foi feita utilizando iniciadores DEN2E-SmaF e DEN2E-SaII/R. Os fragmentos foram separados eletroforicamente a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Os clones positivos apresentaram um amplicon de aproximadamente 1200 Kpb.(A) ladder DNA 1Kb Promega®; (B)LCV01; (C)LCV02; (D)LCV03; (E)LCV04; (F)LCV05; (G)LCV06; (H)LCV07;

(I)LCV08; (J)LCV09; (K) LCV10; (L) controle positivo utilizando o clone DRD3.5; (M) controle negativo, no qual no lugar de DNA molde foi utilizada água.

Uma vez obtida a amplificação do fragmento correspondente a DEN2-E, foi feita uma extração de DNA plasmidial para que os clones positivos pudessem ser sequenciados a fim de se verificar o gene correspondente à proteína E, comparando-o com o sequenciamento prévio do inserto do clone DRD3.5 e com outras amostras depositadas no *Gene Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este sequenciamento dos clones LCV01-09, revelou que no clone LCV01 não houve modificações na sequência de DNA em relação à DRD3.5 exceto pela adição pretendida do sítio para a enzima *Sall*. O *contig* gerado pelo sequenciamento está demonstrado na Figura 14.

```

GAATTCACTAGTGATTTCCCCCGGGATGCGTTGCATAGGAATATCAAATAGAGACTTCGTAGAAGGGGTTTCAGG
AGGAAGCTGGGTTGACATCGTTTTAGAACATGGAAGTTGTGTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGA
TTTTGAACTGATAAAAAACAGAAGCCAAACAACCTGCCACTCTAAGGAAGTACTGTATAGAAGCAAAGCTGACCAA
CACAACAACAGAATCGCGTTGCCCAACACAAGGGGAACCCAGTCTAAATGAAGAGCAGGACAAAAGGTTTCATCTG
CAAACACTCCATGGTAGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGATTATTTGGAAAGGGAGGCATTGTGACCTGTGC
TATGTTTACATGCAAAAAGAACATTGGAAGGAAAAATCGTACAGCCAGAAAAATTGGAAATACACCATCGTGATAAC
ACCTCACTCAGGAGAAGAGCACGCTGTAGGTAATGACACAGGAAAGCATGGCAAGGAAATCAAAAATAACACCACA
GGGTTCCACCACAGAAGCAGAACTGACAGGCTATGGCACTGTCACGATGGAGTGCCTCCTCCGAGAACGGGCCTCGA
CTTCAATGAGATGGTGTCTGCTGCAGATGGAAGACAAAGCTTGGCTGGTGCACAGGCAATGGTTCTTAGACCTGCC
GTTGCCATGGCTACCCGGAGCGGATACACAAGGATCAAATTGGATACAGAAAGAGACATTGGTCACTTTCAAAAA
TCCCCACGCCAAGAAACAGGATGTCGTTGTCTTAGGGTCTCAAGAAGGGGCCATGCACACGGCACTCACAGGGGC
TACAGAAATCCAGATGTCATCAGGAACTTACTGTTACGGGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGAATGGACAAACT
ACAGCTCAAAGGAATGTCATACTCTATGTGTACAGGAAAGTTTAAAATCGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACA
TGGAACAATAGTTATCAGAGTACAATATGAAGGGGACGGTTCTCCATGTAAGATCCCTTTTGGATAACAGATTT
GGAAAAAAGACACGCTCTTAGGACGCCTGATTACAGTTAACCCAATCGTAACAGAAAAAGATAGCCAGTCAACAT
AGAAGCAGAACCCCATTCGGAGACAGCTACATCATCGTAGGAGTAGAGCCGGGACAACCTGAAACTCAATTGGTT
TAAGAAGGGAAGTTCCATCGGCCAAATGATTGAGACAACATAAGTCGACTATAAATCGATTCCCGCGCCGCATG
CGGCCGGAGCATGCGACGTCGGCCA

```

Figura 14: Sequência do inserto DENV2ESmaISall clonado no plasmídeo pGemT. Sequenciamento do clone LCV01 utilizando os iniciadores universais M13F e M13R. Em azul, a sequência do iniciador DEN2E-SmaF com sítio de restrição de *SmaI* destacado em vermelho; Em verde, a sequência do iniciador DEN2E-SalR com sítio de ação da enzima *Sall* destacado em amarelo.

A sequência gerada pelo sequenciamento pode ser comparada com a do DRD35 e com a sequência referencial NC_001474.2 (Figura 15). Ao se observar as três sequências notam-se diversas modificações pontuais entre DRD3.5/LCV01 e o genoma completo do DENV2. Estas diferenças podem estar ligadas ao fato de

DRD3.5 ser derivada de uma amostra circulante do Brasil enquanto o vírus utilizado na caracterização do genoma do DENV tem origem no Sudeste Asiático. Essa hipótese é corroborada quando se compara a amostra utilizando o BLAST e nota-se que ela possui um alto grau de similaridade com diversas amostras isoladas em São Paulo (isolados DENV-2/BR/BID-V3644/2008 gene bank ACY70780; DENV-2/BR/BID-V3486/2008 gene bank ACW82873), no Norte do Brasil (DENV-2/BR/BID-V2402/2008 gene bank ACS32031) e na República Dominicana (DENV-2/DO/BID-V2955/2003 gene bank ACQ44490).

Ao ser realizada a análise comparativa da proteína gerada por estes nucleotídeos com a amostra ACY70780.1 isolada no Brasil em 2008 nota-se que há um alto grau de similaridade com apenas duas substituições (Figura 16). A primeira modificação seria de serina por uma glicina, um resíduo polar por um resíduo apolar. Apesar de não ser conservativa, a amostra ABW35389, outro DENV2, também possui esta alteração no gene da proteína E. A segunda modificação é conservativa, pois altera um resíduo fenilalanina por um isoleucina ambos resíduos apolares. Também é possível observar-se os resíduos de aminoácidos que foram retirados na proteína truncada, ficando esta com aproximadamente 18 por cento de aminoácidos a menos. A remoção desta fração, segundo estudos anteriores (MEN *et al*, 2000), gera uma resposta imunológica mais robusta.

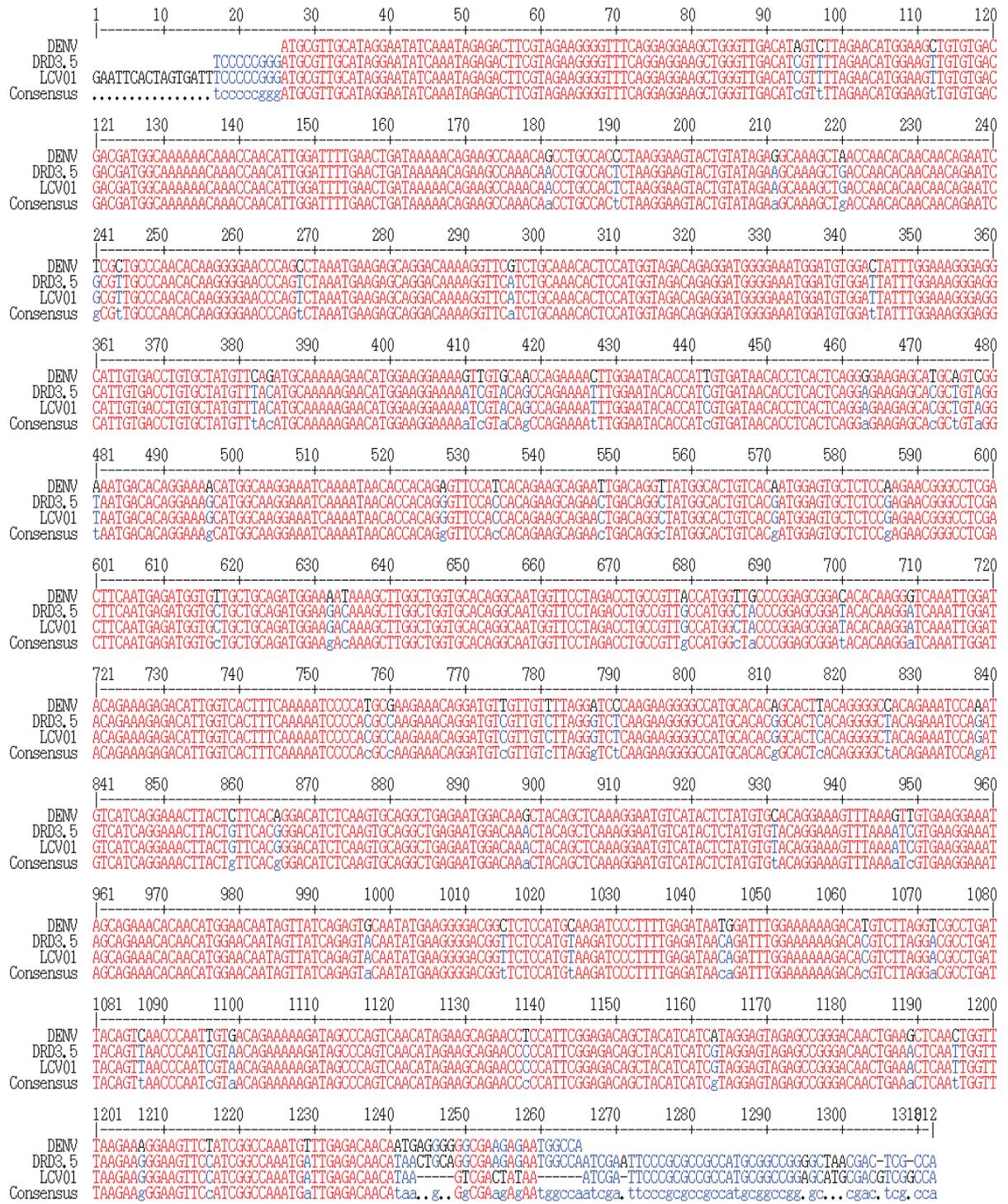


Figura 15: Alinhamento das seqüências de nucleótidos da proteína E. Alinhamento nucleotídico das seqüências de nucleótidos da proteína E do Clone LCV01(pGEM-TDENV2ESmaI/Sall) com o clone DRD3.5 (pGEM-TDENV2ESmaI/PstI), e com o isolado NC_001474.2 (DENV) Marcado em vermelho estão os nucleotídeos iguais para as três amostras, em azul os nucleotídeos iguais para duas amostras e em preto os nucleotídeos presentes em apenas uma das amostras.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
LCV01	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
polyprotein	MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVITMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYCIEAKLTNTTRESRCTQGEP								
Consensus	MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVITMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYCIEAKLTNTTRESRCTQGEP								
	81	90	100	110	120	130	140	150	160
LCV01	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
polyprotein	SLNEEQDKRFICKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCKKNMEGKIVQPENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGKHGK								
Consensus	SLNEEQDKRFICKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTCKKNMEGKIVQPENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGKHGK								
	161	170	180	190	200	210	220	230	240
LCV01	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
polyprotein	EIKITPQ ^g STTEAELTGYGTVMECSPTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPWPWPADTQGSNWIQKETLVTF								
Consensus	EIKITPQ ^g STTEAELTGYGTVMECSPTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPWPWPADTQGSNWIQKETLVTF								
	241	250	260	270	280	290	300	310	320
LCV01	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
polyprotein	KNPHAKKQDVVVVLSQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCRRLMDKLQKGMSSYMCTGKFKIVKEIAETQHGTI								
Consensus	KNPHAKKQDVVVVLSQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCRRLMDKLQKGMSSYMCTGKFKIVKEIAETQHGTI								
	321	330	340	350	360	370	380	390	400
LCV01	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
polyprotein	VIRVQYEGDGSPPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVIVTEKDSVNVIEAEPFPGDSYIIVGVPEPGQLKLNWFKKGSSIGQ								
Consensus	VIRVQYEGDGSPPCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVIVTEKDSVNVIEAEPFPGDSYIIVGVPEPGQLKLNWFKKGSSIGQ								
	401	410	420	430	440	450	460	470	480
LCV01	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
polyprotein	MIETT								
Consensus	MFETTMRGAKRMAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVIITWIGMNSRSTLSVSLV								
	481	490	495						
LCV01	-----+-----								
polyprotein	LVGVVTLYL ^g GAMVQA								
Consensus								

Figura 16: Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína E do clone LCV01 (pGEM-TDENV2ESmaI) com a amostra ACY70780.1 (polyprotein). Marcado em vermelho estão os nucleotídeos iguais nas duas sequências, em azul os nucleotídeos presentes apenas em LCV01 e em preto os nucleotídeos presentes em apenas na amostra ACY70780.1.

2. Plasmídeo de transferência pLW44 contendo o inserto com o gene para a proteína DENV2-E.

Para a inserção do gene para a proteína E no vetor pLW44, o clone LCV01 (pGEM-TDENV2ESmaISall), previamente analisado por sequenciamento, e o plasmídeo pLW44 foram digeridos com as enzimas *SmaI* e *Sall* e os fragmentos gerados foram analisados em gel de agarose (Figura 17). As bandas referentes ao pLW44 digerido e o inserto liberado de DENV2-E foram exisadas do gel por corte e purificadas separadamente. Parte do material purificado foi submetida a outra eletroforese em gel de agarose (Figura 18) e o restante foi utilizado em clonagens seguindo diversas proporções entre plasmídeo e vetor. A proporção mais bem sucedida foi a de 10 vezes a quantidade de inserto para 1 de vetor.

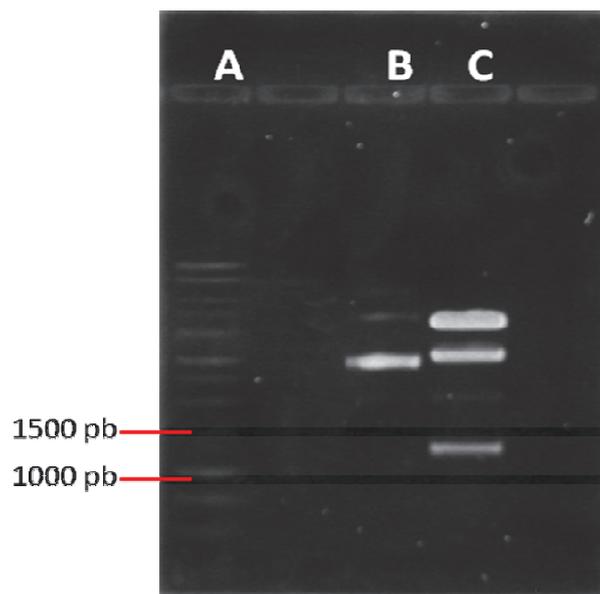


Figura 17:- igestão de pLW44 e LCV01 (pGEM-TDENV2ESmaISall) com as enzimas de restrição *SmaI* e *Sall*. Os produtos da digestão tiveram seus fragmentos separados eletroforéticamente a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. (A) 1Kb DNA Ladder Promega®, (B) Plasmídeo pLW44 digerido (C) Clone LCV01 digerido,.

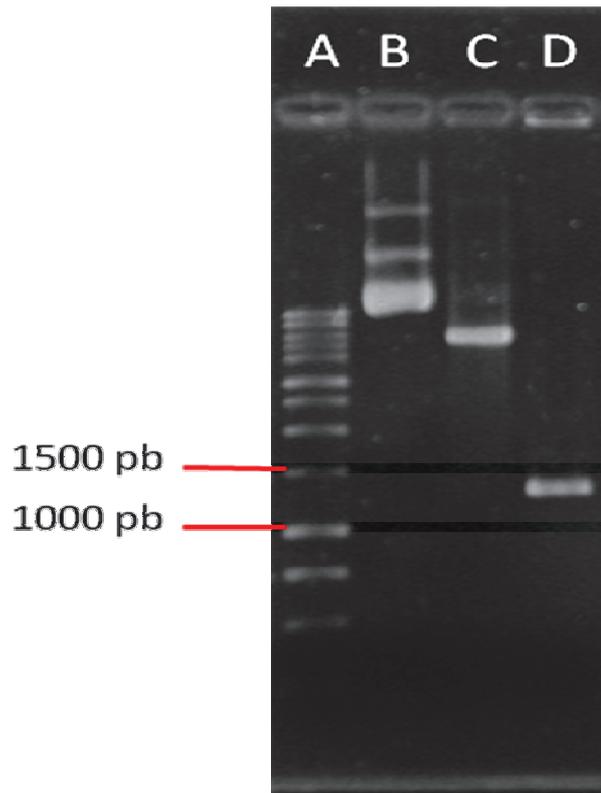


Figura 18:-Purificação realizada do DNA de pLW44 e LCV01 (pGEM-TDENV2ESmaISall) digerido por Sall e SmaI. Os fragmentos foram separados eletroforéticamente a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio; (A) 1Kb DNA Ladder Promega[®], (B) Plasmídeo pLW44 não digerido; (C) Plasmídeo pLW44 digerido e purificado; (D) Inserto digerido a partir do clone LCV01 purificado.

Os produtos das ligações de pLW44-LCV01 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. A transformação de bactérias DH-5 α produziu 06 clones denominados PLCV e numerados de 01 a 06, destes, quatro clones (PLCV01, PLCV03, PLCV05, PLCV06), quando submetidos à PCR de colônia apresentaram amplicons com aproximadamente 1200 pb correspondentes ao inserto codificante para a proteína E de DEN-2 truncada (dado não apresentado). Foi feita a *miniprep* e então, mais uma PCR dos quatro clones positivos pLW44DENV2ESmaISall (PLCV01, PLCV03, PLCV05, PLCV06), No entanto os iniciadores utilizados foram pLW44F(5'-CCCGACAACCACTACCTGAG-3') e pLW44R (5'-TGGGCTCCTTATACCAAGC-3'). A vantagem desta última PCR é que ela identifica não só os plasmídeos com o inserto, nos quais o amplicon gerado tem aproximadamente 1700 Kb, mas também os vazios uma vez que estes geram um amplicon de 500 pbs (Figura 19). A digestão dos plasmídeos destes quatro

clones, com as enzimas *Sma*I e *Sal*I, apresentou bandas de aproximadamente 1200 pbs, tamanho esperado do inserto, corroborando os achados da PCR descrita acima (Figura 20).

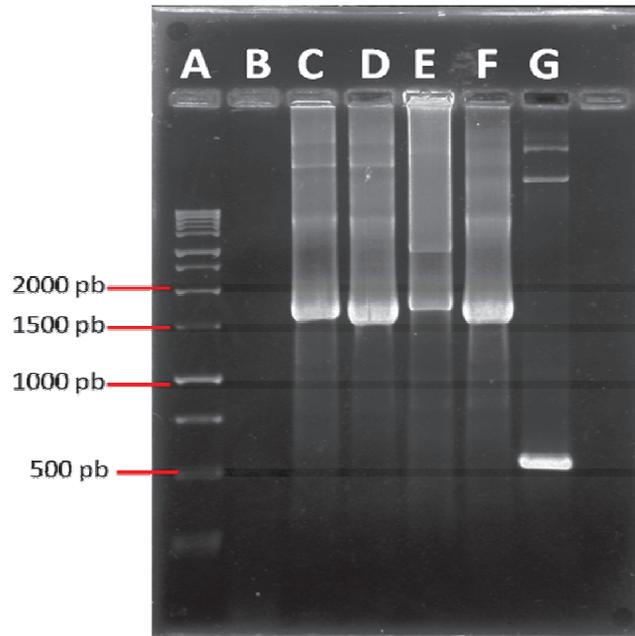


Figura 19: PCR para detecção do inserto DENV2ESmaISalI nos plasmídeos dos clones transformantes PLCV (pLW44DENV2ESmaISalI). A amplificação foi feita utilizando iniciadores pLW44F e pLW44R. Os amplicons foram submetidos a eletroforese a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. (A) 1Kb DNA Ladder Promega[®], (B) Controle Negativo; (C) PLCV01; (D) PLCV03; (E) PLCV05; (F) PLCV06; (G) pLW44 sem inserto.

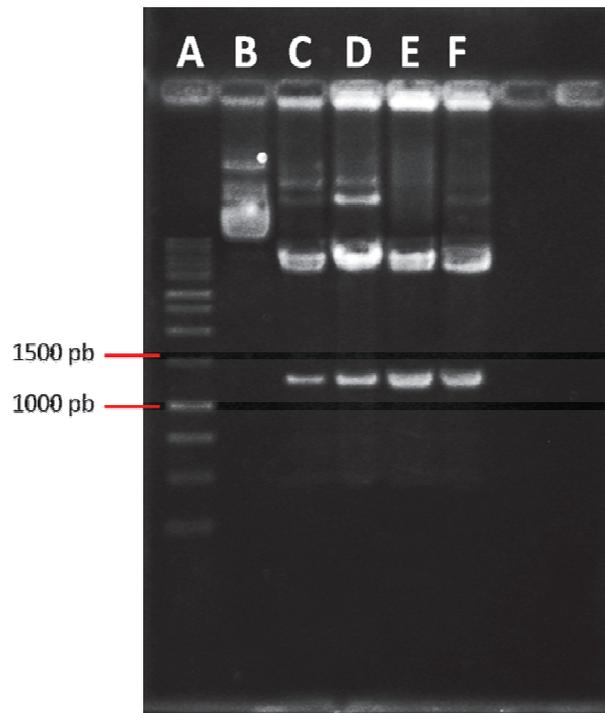


Figura 20: Digestão dos plasmídeos dos clones positivos pLW44DENV2ESmaISall com as enzimas *Sall* e *SmaI* Os produtos da digestão foram fracionados eletroforéticamente a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, (A) 1Kb DNA Ladder Promega[®], (B) pLW44 sem inserto foi utilizado como controle negativo; (C) PLCV01; (D) PLCV03; (E) PLCV05; (F) PLCV06.

3. Produção e amplificação dos clones virais MVA DENV2-E-GFP

Visando a construção de um MVA recombinante capaz de expressar a proteína DEN2-E e a proteína fluorescente verde (MVA DENV2-E-GFP), células CEFs foram infectadas por MVA e então transfectadas paralelamente com os quatro plasmídeos pLW44DENV2-E (PLVC01, PLVC03, PLVC05, PLVC06). Também foram testadas três diferentes concentrações de plasmídeo, 1000 ng, 2000 ng e 3000 ng. A concentração de 2000 ng foi a selecionada para o restante dos experimentos, pois se mostrou mais eficiente que a de 1000 ng e de rendimento similar a de 3000 ng.

Também se testou a possibilidade de que o plasmídeo aberto linearizado possuiria uma capacidade de recombinação maior ou de melhor transfecção através da digestão deste com *EcoRI*. No entanto não se observou melhora em nenhum dos

parâmetros observados, de fato houve uma diminuição da transfecção assim como na geração de recombinantes.

Células transfectadas com o plasmídeo pLW44 adquirem fluorescência verde mediante estímulo de luz UV, isto ocorre devido à expressão da proteína GFP (Figura 21). Utilizando-se desta fluorescência foi possível comparar eficiência da transfecção dos plasmídeos, ou seja, quais plasmídeos geram mais células transfectadas, e observou-se que esta pode ser organizada de forma decrescente na seguinte ordem: PLCV05, PLCV03, PLCV06 e PLCV01. Ao inocular estas transfecções na primeira rodada de seleção em meio semi-sólido, PLCV03 gerou 36 clones recombinantes, enquanto PLCV05 gerou 22, PLCV06 gerou 9 e PLCV01 apenas 2. É interessante notar que taxas de transfecção maiores levam a um maior número de recombinantes, no entanto, como observado pela diferença entre PLCV03 e PLCV05, às vezes pode haver uma maior taxa de recombinação mesmo com um número menor de células transfectadas.

Os clones virais gerados foram denominados V1, V3, V5 e V6 de acordo com o plasmídeo de quais estes tiveram origem (Ex. V5.3, foi o terceiro clone coletado na primeira rodada de seleção do lisado de células transfectadas pelo plasmídeo PLCV05). Para a etapa de seleção seguinte foram selecionados aleatoriamente dois clones de V1, V3, V5 e V6. Nas etapas de seleção subsequentes foram selecionados apenas os clones gerados a partir de V5. Após estas duas rodadas iniciais foram realizadas mais seis rodadas de seleção de clones, no fim destas, foi escolhido apenas um clone que passou a ser denominado VRD. Este foi amplificado em células CEF e então purificado. Com a purificação obteve-se um estoque viral que foi então titulado em células CEF, sendo o título obtido em torno de 2×10^{10} vírus viáveis por mL.

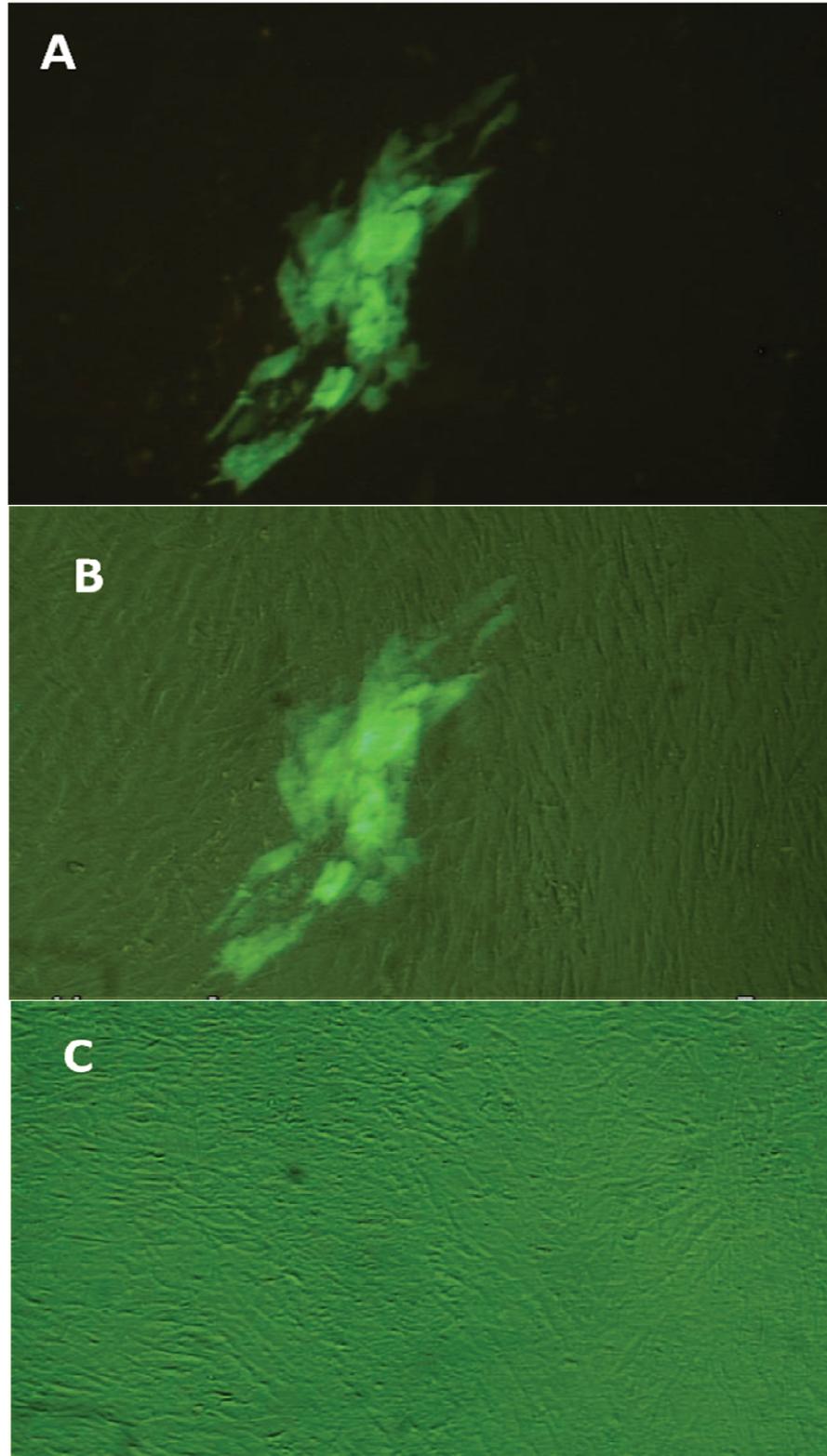


Figura 21: Microscopias de células infectadas com MVADEN2E. As imagens revelam a presença de MVADEN2E através da expressão da proteína GFP, a sequência de fotos foi realizada em um mesmo campo **(A)** Na Microscopia de Fluorescência é possível identificar a expressão de GFP, e com isso, a presença do MVADEN2E, **(B)** Na microscopia de campo claro mais fluorescência é possível observar a monocamada de células mais a presença do clone MVADEN2E, **(C)** Já na microscopia de

Figura 21 (continua): campo claro, há uma ausência de evidência da presença do MVADEN2E, pois como foi citado anteriormente o MVA não gera efeito citopático..

4. Clonagem do inserto DEN2NS1

As etapas de construção e clonagem deste inserto foram realizadas em colaboração com a Dr. Fabiana Magalhães Coelho. A amostra 14.13 trata-se do gene para a proteína DENV2-NS1/2a inserido dentro do plasmídeo PGem-T e flanqueado por dois sítios de restrição para a enzima *SmaI*. O sequenciamento indicou a inexistência de qualquer sítio de restrição para a enzima *SmaI* dentro do inserto, também apontou para a posição correta dos sítios de restrição para *SmaI* nas regiões flanqueadoras. (Figura 22)

```

TTATGCCCGGGATGGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAATAAAGAAGTGAATGTGGCAGCGGGATCTTCA
TTACAGACAACGTACACACATGGACAGAGCAATATAAGTTCCAACCAGAATCCCCTTCAAACTAGCTTCAGCTA
TCCAAAAAGCTCATGAAGAAGGCATTTGTGGAATCCGCTCAGTAACAAGATTGGAGAATCTGATGTGAAACAAA
TAACACCAGAATTGAATCATATTCTATCAGAAAATGAGGTAAAGTTGACCATTATGGCAGGAGACATTAAGGAA
TCATGCAGGCAGGAAAACGATCCTTGCGGCCTCAGCCCACTGAGCTGAAGTACTCATGGAAAACATGGGGAAAAG
CGAAAATGCTCTCTACAGAGTCTCACAATCAGACCTTTCTTATTGATGGCCCTGAAAACAGCAGAATGCCCAACA
CAAACAGAGCTTGGAACTCACTGGAAGTTGAAGACTATGGTTTTGGAGTTTTTACCACCAATATATGGCTAAAAT
TGAGAGAAAAACAGGATGTATTTTGTGACTCAAACTCATGTGAGCGGCCATTAAAGACAACAGAGCCGTCCATG
CCGATATGGGTTATTGGATAGAAAAGTGCACACTCAATGACACATGGAAGATGGAGAAAAGCCTCCTTCATTGAAGTTA
AAAGCTGCCACTGGCCAAAGTCACACACCCTCTGGAGCAATGGAGTATTAGAAAAGTGAGATGATAATCCAAAAA
ATTTGCGCGGCCAGTGTCAACAACAACACTACAGACCAGGCTACCATACACAAACAGCAGGACCTTGGCATCTAG
GTAAGCTTGAGATGGACTTTGATTTCTGCGAAGGAACACTACAGTGGTGGTACTGAGGACTGTGAAAATAGAGGAC
CCTCTTTAAGAACGACCCTGCTCTGAAAAGCTCATAACAGAATGGTGTGCGGATCCTGCACACTACCACCTC
TAAGATACAGAGGTGAGGATGGATGCTGGTACGGGATGGAATCAGACCTTTGAAAAGAGAAAAGAGAACTTGG
TCAACTCCTTGGTACAGCCGGACATGGGCAGATTGACAACTTTTCACTAGGAGTCTTGGGAATGGCACTGTTCC
TGGAAGAAATGCTTAGGACCCGAGTAGGAACGAAACATGCAATACTGCTAGTTGCACTATCTTTTCGTGACATTGA
TTACTGGGAACATGTCTTTTAGAGACCTGGGAAGAGTGATGGTCATGGTGGGCGCTACCATGACGGATGACATAG
GTATGGGAGTGACTTATCTTGGCCCTACTAGCAGCTTTCAAAGTTAGACCAACTTTTGCAGCTGGACTACTCTTGA
GAAAACACTGACCTCCAAGGAATTGATGATGGCCACCATAGGAATCGCACTCCTTTCCCAAAGCACCTTGCCAGAGA
CCATTCTAGAACTGACTGATGCGTTAGCCTTGGGCATGATGGCCCTCAAATAGTGAGAAAATATGAAAAAATACC
AATTGGCAGTGACTATCATGGCTATTTTCGTGTGTCCCAAATGCAGTGATATTGCAAAACGCATGGAAGGTGAGTT
GCACAATATTGGCAGCGGTGTCCGTTTCTCCACTGCTCCTAACATCCTCACAGCAGAAAAGCGGATTGGATACCAC
TGGCATTGACGATAAAAGGTCTCAACCCAACAGCCATTTTTCTAACAAACCCCTTTCAAGAACCAACAAGAAAGGT
AACCCGGGCTA

```

Figura 22: Sequência de nucleotídeos gerada pelo sequenciamento do inserto de 14.13 (pGEM-TDENV2-NS1/2a*SmaI*) utilizando os iniciadores universais M13F e M13R. Destacado em verde a sequência do iniciador DEN2NS1-*smaF*, em azul a sequência do iniciador DEN2NS12a-*SmaR* e em amarelo as sequências dos sítios de restrição para *SmaI*.

A sequência de nucleotídeos gerada pelo sequenciamento do inserto de 14.13, foi submetida a dois alinhamentos utilizando a ferramenta BLAST, um comparando a sequência com toda a coleção de nucleotídeos do *gene bank* e outro

comparando a amostra apenas com o banco de sequências genômicas de referência. Como resultado do alinhamento de referência, a seqüência nucleotídica de referência para o DENV2 foi a da amostra NC_001474.2. A comparação com todas as sequências revelou um alto grau de similaridade com a amostra GU131881.1 um isolado brasileiro de 2008 do vírus DENV2 (Figura 23).

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
14,13	TTATGCCGGGATGGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAATAAAGAACTGAAATGTGGCAGCGGGATCTTCATTACAGACAACGTACACACATGGAC										
Proxima	GATAGTGGTTGCATTGTGAGCTGGAAAAATAAAGAACTGAAATGTGGCAGCGGGATCTTCATTACAGATAACGTACACACATGGAC										
Referencia	GATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAACAAGAACTGAAATGTGGCAGTGGGATTTTCATCACAGACAACGTGCACACATGGAC										
ConsensusGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGGAAAAATAAAGAACTGAAATGTGGCAGCGGGATCTTCATTACAGACAACGTACACACATGGAC										
	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
14,13	AGAGCAATATAAGTTCCAACCAGAATCCCCTTCAAAGTCTAGCTTACAGTATCCAAAGGTCATGAAGAAGGCATTTGTGGAATCCGCTCAGTAAACAAGA										
Proxima	AGAGCAATATAAGTTCCAACCAGAATCCCCTTCAAAGTCTAGCTTACAGTATCCAAAGGTCATGAAGAAGGCATTTGTGGAATCCGCTCAGTAAACAAGA										
Referencia	AGAACAATACAGTTCCAACCAGAATCCCCTTCAAAGTCTAGCTTACAGTATCCAAAGGTCATGAAGAAGGCATTTGTGGAATCCGCTCAGTAAACAAGA										
Consensus	AGAGCAATATAAGTTCCAACCAGAATCCCCTTCAAAGTCTAGCTTACAGTATCCAAAGGTCATGAAGAAGGCATTTGTGGAATCCGCTCAGTAAACAAGA										
	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
14,13	TTGGAGAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAATTGAATCATATTCTATCAGAAAAATGAGGTAAAGTTGACCATTATGCGAGGAGACATTAAAGGAA										
Proxima	TTGGAGAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAATTGAATCATATTCTATCAGAAAAATGAGGTAAAGTTGACCATTATGCGAGGAGACATTAAAGGAA										
Referencia	CTGGAGAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAATTGAATCATATTCTATCAGAAAAATGAGGTAAAGTTGACCATTATGCGAGGAGACATTAAAGGAA										
Consensus	tTTGGAGAATCTGATGTGGAACAATAACACCAGAATTGAATCATATTCTATCAGAAAAATGAGGTAAAGTTGACCATTATGCGAGGAGACATTAAAGGAA										
	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
14,13	TCATGCAGGCAGGAAAAACGATCCTTGGGGCTCAGCCCACTGAGCTGAAGTACTCATGGAAAAACATGGGGAAGGCGAAAAATGCTCTCTACAGAGTCTCA										
Proxima	TCATGCAGGCAGGAAAAACGATCCTTGGGGCTCAGCCCACTGAGCTGAAGTACTCATGGAAAAACATGGGGAAGGCGAAAAATGCTCTCTACAGAGTCTCA										
Referencia	TCATGCAGGCAGGAAAAACGATCCTTGGGGCTCAGCCCACTGAGCTGAAGTACTCATGGAAAAACATGGGGAAGGCGAAAAATGCTCTCTACAGAGTCTCA										
Consensus	TCATGCAGGCAGGAAAAACGATCCTTGGGGCTCAGCCCACTGAGCTGAAGTACTCATGGAAAAACATGGGGAAGGCGAAAAATGCTCTCTACAGAGTCTCA										
	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
14,13	CAATCAGACCTTTCTATTGATGGCCCTGAAACAGCAGAATGCCCAACACAACAGAGCTTGGAACTCAGTGGAAAGTTGAAGACTATGGTTTTGGAGTT										
Proxima	CAATCAGACCTTTCTATTGATGGCCCTGAAACAGCAGAATGCCCAACACAACAGAGCTTGGAACTCAGTGGAAAGTTGAAGACTATGGTTTTGGAGTT										
Referencia	TAACAGACCTTTCTATTGATGGCCCTGAAACAGCAGAATGCCCAACACAACAGAGCTTGGAACTTGGTTGGAAAGTTGAAGACTATGGTTTTGGAGTT										
Consensus	cAATCAGACCTTTCTATTGATGGCCCTGAAACAGCAGAATGCCCAACACAACAGAGCTTGGAACTcAcTGGAAAGTTGAAGACTATGGTTTTGGAGTT										
	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
14,13	TTTACCACCAATATATGGCTAAAAATTGAGAGAAAAACAGGATGTATTTTGTGACTCAAAGTCTATGTCAGCGGCCATTAAAACAACAGAGCCGTCATG										
Proxima	TTTACCACCAATATATGGCTAAAAATTGAGAGAAAAACAGGATGTATTTTGTGACTCAAAGTCTATGTCAGCGGCCATTAAAACAACAGAGCCGTCATG										
Referencia	TTCACCAACCAATATATGGCTAAAAATTGAAAGAAAAACAGGATGTATTTTGTGACTCAAAGTCTATGTCAGCGGCCATTAAAACAACAGAGCCGTCATG										
Consensus	TTtACCACCAATATATGGCTAAAAATTGAgAGAAAAACAGGATGTATTTtGtGACTCAAAGTCTATGtCAGCGGCCAttAAAACAACAGAGCCGTCATG										
	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
14,13	CCGATATGGGTTATTGGATAGAAAGTGCACCTAATGACACATGGAAGATGGAGAAAGCCTCTTCATTGAAGTTAAAAGCTGCCACTGGCCAAAATCACA										
Proxima	CCGATATGGGTTATTGGATAGAAAGTGCACCTAATGACACATGGAAGATGGAGAAAGCCTCTTCATTGAAGTTAAAAGCTGCCACTGGCCAAAATCACA										
Referencia	CCGATATGGGTTATTGGATAGAAAGTGCACCTAATGACACATGGAAGATGAGAGAAAGCCTCTTCATTGAAGTTAAAAGCTGCCACTGGCCAAAATCACA										
Consensus	CCGATATGGGTTATTGGATAGAAAGTGCACCTAATGACACATGGAAGATgGAGAAAGCCTcTTCATTGAAGTTAAAAGCTGCCACTGGCCAAAATcCACA										
	701	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
14,13	CACCCTCTGGAGCAATGGAGTATTAGAAAGTGAATGATAATCCAAAAATTTTGGCCGGCCAGTGTCAACACAACACTACAGACCAGGCTACCATACA										
Proxima	CACCCTCTGGAGCAATGGAGTATTAGAAAGTGAATGATAATCCAAAAATTTTGGCCGGCCAGTGTCAACACAACACTACAGACCAGGCTACCATACA										
Referencia	CACCCTCTGGAGCAATGGAGTCTAGAAAGTGAATGATAATCCAAAAATCTCCTGACAGTGTCTCAACACAACACTACAGACCAGGCTACCATACA										
Consensus	CACCCTCTGGAGCAATGGAGTatTAGAAAGTGAATGATAATCCAAAAaATtTtGCcGGcCAGTGTcAcACACAACACTAcAGACCAGGCTACCATACA										
	801	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
14,13	CAAAcAGcAGGACCtTGGcATcTAGGTAAGcCTTgAGATgGACTTTgATTtCTGcGAAGGAActACAGTGGTgGTGACTGAGGACTGTGGAAATAGAGGAC										
Proxima	CAAAcAGcAGGACCtTGGcATcTAGGTAAGcCTTgAGATgGACTTTgATTtCTGcGAAGGAActACAGTGGTgGTGACTGAGGACTGTGGAAATAGAGGAC										
Referencia	CAAAcAGcAGGACCtTGGcATcTAGGTAAGcCTTgAGATgGACTTTgATTtCTGcGAAGGAActACAGTGGTgGTGACTGAGGACTGTGGAAATAGAGGAC										
Consensus	CAAAcAGcAGGACCtTGGcATcTAGGTAAGcCTTgAGATgGACTTTgATTtCTGcGAAGGAActACAGTGGTgGTGACTGAGGACTGTGGAAATAGAGGAC										

	901	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	
14,13	CCTCTTTAAGAACGACCCTGCTCTGGAAAAGCTCATAACAGAATGGTGTGCGGATCCGTCACACTACCACCTCTAAGATACAGAGGTGAGGATGGATG											
Proxima	CCTCTTTAAGAACGACCCTGCTCTGGAAAAGCTCATAACAGAATGGTGTGCGGATCCGTCACACTACCACCTCTAAGATACAGAGGTGAGGATGGATG											
Referencia	CCTCTTTAAGAACGACCCTGCTCTGGAAAAGCTCATAACAGAATGGTGTGCGGATCCGTCACACTACCACCTCTAAGATACAGAGGTGAGGATGGATG											
Consensus	CCTCTTTAAGAACGACCCTGCTCTGGAAAAGCTCATAACAGAATGGTGTGCGGATCCGTCACACTACCACCTCTAAGATACAGAGGTGAGGATGGATG											
	1001	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	
14,13	CTGGTACGGGATGGAATCAGACCTTTGAAAAGAGAAAGAGAGAACTTGGTCAACTCCTTGGTCACAGCCGGACATGGGCAGATTGACAACCTTTTCACTA											
Proxima	CTGGTACGGGATGGAATCAGACCTTTGAAAAGAGAAAGAGAGAACTTGGTCAACTCCTTGGTCACAGCCGGACATGGGCAGATTGACAACCTTTTCACTA											
Referencia	CTGGTACGGGATGGAATCAGACCTTTGAAAAGAGAAAGAGAGAACTTGGTCAACTCCTTGGTCACAGCCGGACATGGGCAGATTGACAACCTTTTCACTA											
Consensus	CTGGTACGGGATGGAATCAGACCTTTGAAAAGAGAAAGAGAGAACTTGGTCAACTCCTTGGTCACAGCCGGACATGGGCAGATTGACAACCTTTTCACTA											
	1101	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
14,13	GGAGTCTTGGGAATGGCACTGTTCTGGAAAGAAATGCTTAGGACCCGAGTAGGAACGAAACATGCAATACTGCTAGTTGCACATCTTTCTGTCGACATTGA											
Proxima	GGAGTCTTGGGAATGGCACTGTTCTGGAAAGAAATGCTTAGGACCCGAGTAGGAACGAAACATGCAATACTGCTAGTTGCACATCTTTCTGTCGACATTGA											
Referencia	GGAGTCTTGGGAATGGCACTGTTCTGGAAAGAAATGCTTAGGACCCGAGTAGGAACGAAACATGCAATACTGCTAGTTGCACATCTTTCTGTCGACATTGA											
Consensus	GGAGTCTTGGGAATGGCACTGTTCTGGAAAGAAATGCTTAGGACCCGAGTAGGAACGAAACATGCAATACTGCTAGTTGCACATCTTTCTGTCGACATTGA											
	1201	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
14,13	TTACTGGGAACATGTCCTTTAGAGACCTGGGAAGAGTATGGTATGGTGGGGCTACCATGACGGATGACATAGGTATGGGAGTGACTTATCTTTGCCCT											
Proxima	TTACTGGGAACATGTCCTTTAGAGACCTGGGAAGAGTATGGTATGGTGGGGCTACCATGACGGATGACATAGGTATGGGAGTGACTTATCTTTGCCCT											
Referencia	TTACTGGGAACATGTCCTTTAGAGACCTGGGAAGAGTATGGTATGGTGGGGCTACCATGACGGATGACATAGGTATGGGAGTGACTTATCTTTGCCCT											
Consensus	TTACTGGGAACATGTCCTTTAGAGACCTGGGAAGAGTATGGTATGGTGGGGCTACCATGACGGATGACATAGGTATGGGAGTGACTTATCTTTGCCCT											
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	
14,13	ACTAGCAGCTTTCAAAGTTAGACCAACTTTTGCAGCTGGACTACTCTTGGAAAAGCTGACCTCCAAGGAATTGATGATGGCCACCATAGGAATCGCACTC											
Proxima	ACTAGCAGCTTTCAAAGTTAGACCAACTTTTGCAGCTGGACTACTCTTGGAAAAGCTGACCTCCAAGGAATTGATGATGGCCACCATAGGAATCGCACTC											
Referencia	ACTAGCAGCTTTCAAAGTTAGACCAACTTTTGCAGCTGGACTACTCTTGGAAAAGCTGACCTCCAAGGAATTGATGATGGCCACCATAGGAATCGCACTC											
Consensus	ACTAGCAGCTTTCAAAGTTAGACCAACTTTTGCAGCTGGACTACTCTTGGAAAAGCTGACCTCCAAGGAATTGATGATGGCCACCATAGGAATCGCACTC											
	1401	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	
14,13	CTTTCCCAAAGCACCTTGGCAGAGACCATTCTAGAACTGACTGATGCGTTAGCCTTGGGCATGATGGCCCTCAAATAAGTGAGAAAATATGGAAAATACC											
Proxima	CTTTCCCAAAGCACCTTGGCAGAGACCATTCTAGAACTGACTGATGCGTTAGCCTTGGGCATGATGGCCCTCAAATAAGTGAGAAAATATGGAAAATACC											
Referencia	CTTTCCCAAAGCACCTTGGCAGAGACCATTCTAGAACTGACTGATGCGTTAGCCTTGGGCATGATGGCCCTCAAATAAGTGAGAAAATATGGAAAATACC											
Consensus	CTTTCCCAAAGCACCTTGGCAGAGACCATTCTAGAACTGACTGATGCGTTAGCCTTGGGCATGATGGCCCTCAAATAAGTGAGAAAATATGGAAAATACC											
	1501	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	
14,13	AATTGGCAGTGACTATCATGGCTATTTCTGTGTGCCAAATGCAGTGATATTGCAAAACGCATGGAAGGTGAGTTGCACAATATTGGCAGCGGTGTCGGT											
Proxima	AATTGGCAGTGACTATCATGGCTATTTCTGTGTGCCAAATGCAGTGATATTGCAAAACGCATGGAAGGTGAGTTGCACAATATTGGCAGCGGTGTCGGT											
Referencia	AATTGGCAGTGACTATCATGGCTATTTCTGTGTGCCAAATGCAGTGATATTGCAAAACGCATGGAAGGTGAGTTGCACAATATTGGCAGCGGTGTCGGT											
Consensus	AATTGGCAGTGACTATCATGGCTATTTCTGTGTGCCAAATGCAGTGATATTGCAAAACGCATGGAAGGTGAGTTGCACAATATTGGCAGCGGTGTCGGT											
	1601	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	
14,13	TTCTCCACTGCTCTAACATCCTCACAGCAGAAAAGCGGATTGGATACCCTGGCATTGACGATAAAAGGTCTCAACCCAACAGCCATTTTTCTAACAACT											
Proxima	TTCTCCACTGCTCTAACATCCTCACAGCAGAAAAGCGGATTGGATACCCTGGCATTGACGATAAAAGGTCTCAACCCAACAGCCATTTTTCTAACAACT											
Referencia	TTCTCCACTGCTCTAACATCCTCACAGCAGAAAAGCGGATTGGATACCCTGGCATTGACGATAAAAGGTCTCAACCCAACAGCCATTTTTCTAACAACT											
Consensus	TTCTCCACTGCTCTAACATCCTCACAGCAGAAAAGCGGATTGGATACCCTGGCATTGACGATAAAAGGTCTCAACCCAACAGCCATTTTTCTAACAACT											
	1701	1710	1720	1730	1736							
14,13	CTTTCAGAACCACAAGAAAAGGTAACCCGGGCTA											
Proxima	CTTTCAGAACCACAAGAAAAGG											
Referencia	CTTTCAGAACCACAAGAAAAGG											
Consensus	CTTTCAGAACCACAAGAAAAGG.....											

Figura 23: Alinhamento das seqüências de nucleotídeos da proteína NS1/2a. Alinhamento da seqüência do plasmídeo 14.13 (pGEM-TDENV2-NS1/2aSmai) com da amostra GU131881.1 (denominada Proxima) revelou apenas 6 nucleotídeos alterados, ou seja, um alto grau de similaridade, o alinhamento destas a amostra NC_001474.2 (denominada Referencia) revelou uma gama mais alta de alterações. Marcado em vermelho estão os nucleotídeos iguais para as três amostras, em azul os nucleotídeos iguais para duas amostras e em preto os nucleotídeos presentes em apenas uma das amostras.

Também foram feitas duas comparações da sequência de aminoácidos gerada pela sequência de nucleotídeos do inserto de 14.13, uma comparando esta sequência contra o banco de dados de proteínas referência, e outra comparando a sequência com todas as sequências de proteínas não redundantes. A primeira análise revelou uma similaridade com a sequência referência NP_056776.2 da poliproteína do DENV2, a região de homologia foi a referente às proteínas NS1/2a. A segunda análise revelou um alto grau de similaridade com a proteína da amostra ACW82875.1 um isolado brasileiro e, novamente, a região de homologia foi a referente às proteínas NS1/2a (Figura 24).

Foram observadas 15 modificações de aminoácidos na proteína codificada pelo gene contido no inserto 14.13 em relação à sequência referência, essa disparidade pode ter origem no fato da sequência referência ter origem em um isolado da Tailândia do ano de 1964. Sendo DENV2 um vírus com genoma RNA, e, portanto, mais propenso a mutações que um vírus DNA, as diferenças observadas na sequência de aminoácidos podem estar relacionadas à distância temporal, geológica e evolutiva entre estas duas amostras. Essa possibilidade se torna mais sólida ao comparar-se o inserto de 14.13 com a amostra brasileira apontada acima, de isolamento mais atual. Neste caso, nota-se que houve apenas duas modificações entre as duas, uma substituição alterando-se um resíduo de aminoácido polar por um apolar (uma alanina por uma treonina) e outra alterando-se um resíduo apolar por outro apolar (valina por alanina).

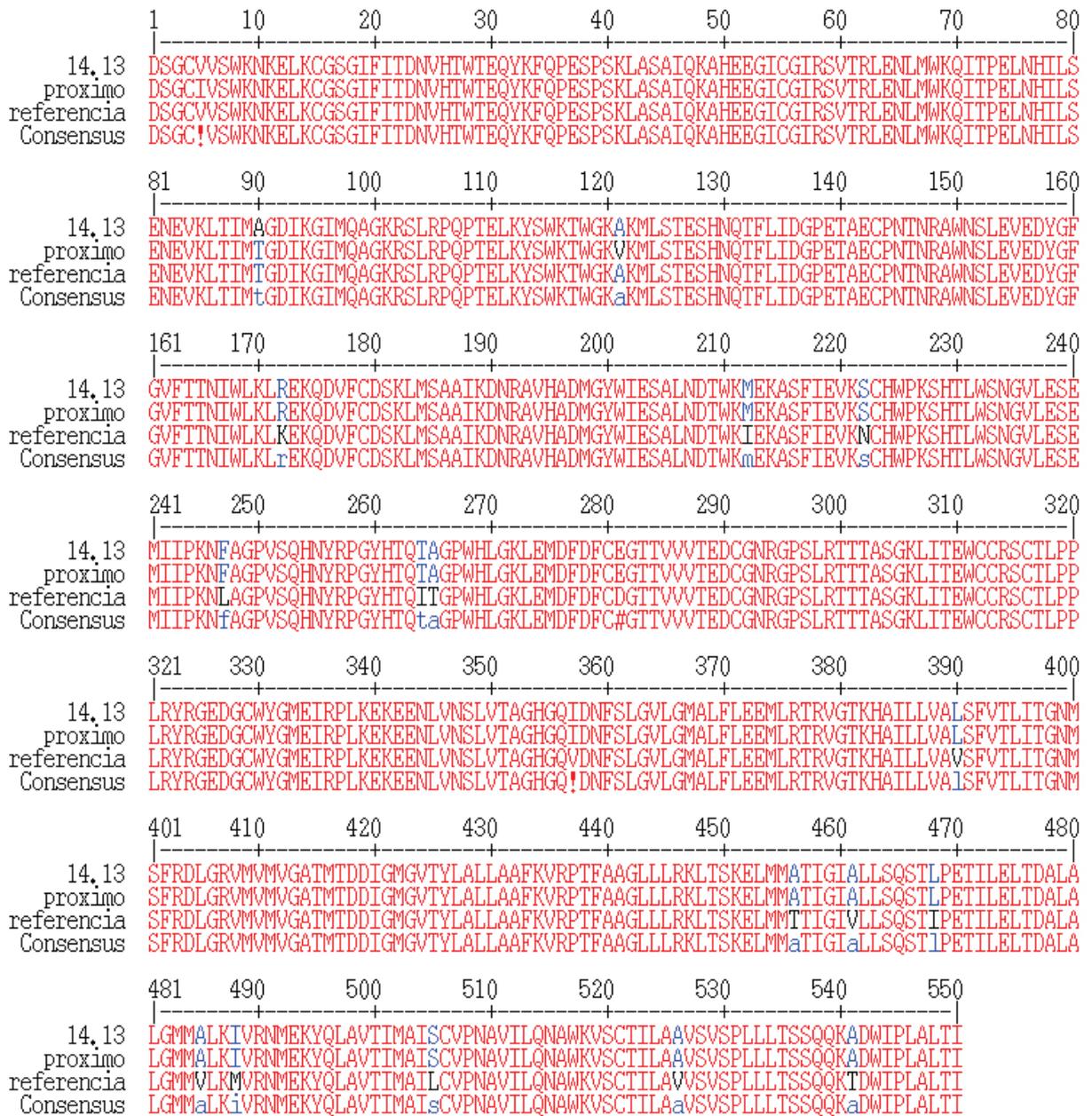


Figura 24: O Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína NS1/2a do clone 14.13 (pGEM-TDENV2-NS1/2aSmai) com a das amostras ACW82875.1 (proximo) e NP_056776.2 (referencia). É possível observar que há um alto grau de semelhança das sequências das amostras 14.13 e ACW82875.1 havendo apenas duas alterações entre as duas. Já as diferenças observadas entre 14.13 e NP_056776.2 foram mais acentuadas com 15 modificações sendo observadas. Marcado em vermelho estão os nucleotídeos iguais para as três amostras, em azul os nucleotídeos iguais para duas amostras e em preto os nucleotídeos presentes em apenas uma das amostras.

5.Obtenção do plasmídeo de transferência pJD19 contendo o inserto codificante para a proteína DENV2-NS1/2a

Mediante a constatação de que o gene contido no inserto de 14.13, corresponde ao gene de NS1/2a, foi feita a clonagem deste inserto no plasmídeo de transferência pJD19. Nesta fase, foi feita a digestão tanto o plasmídeo 14.13 como o plasmídeo pJD19 com a enzima de restrição *SmaI*. A digestão do plasmídeo 14.13 gerou duas bandas uma delas com um tamanho de aproximadamente 1700 pb, tamanho esperado para o inserto contendo o gene de NS1/2a (Figura 25).

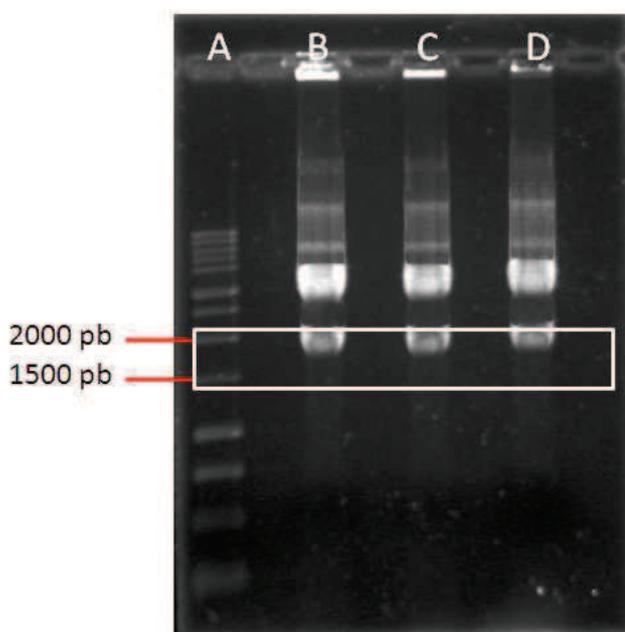


Figura 25: Digestão do plasmídeo 14.13 (pGEM-TDENV2-NS1/2aSmaI) com as enzima de restrição *SmaI*. Os produtos da digestão tiveram seus fragmentos separados eletroforéticamente a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. (A) 1Kb DNA Ladder Promega[®], (B) (C) (D) As triplicatas da digestão de 14.13 por *SmaI*.

Após a digestão o material foi recortado do gel e purificado. A purificação foi bem sucedida dando origem a uma banda única de aproximadamente 1700 Kb (Figura 26).

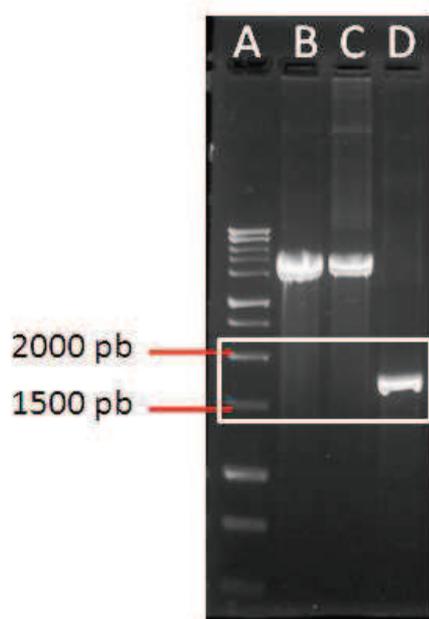


Figura 26: Purificação realizada do material de pJD19 e 14.13 (pGEM-TDENV2-NS1/2aSmaI) digerido por SmaI. Os fragmentos foram separados eletroforéticamente a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio ; (A) 1Kb DNA Ladder Promega[®], (B) (C) duplicatas do plasmídeo pJD19 digerido e purificado apresentando apenas uma banda; (D) Inserto digerido a partir do clone 14.13 purificado, apresentando apenas a banda referente ao inserto DENV2-NS1/2aSmaI I de aproximadamente 1700 pb.

Foi utilizada a proporção de dez para um, respectivamente, do inserto e do plasmídeo pJD19 digeridos e purificados, na reação de ligação. O resultado desta reação foi transformado em *E. coli* DH-5 α . O processo de transformação gerou mais de 100 clones. Destes clones foram selecionados 62, denominados 23.01 a 23.62, para que fosse testada a presença do inserto por meio de ensaio de PCR de colônia. De todos os clones testados apenas 3 geraram uma banda de aproximadamente 1700 pb, os clones 23.19, 23.59, 23.62 (Figura 27).

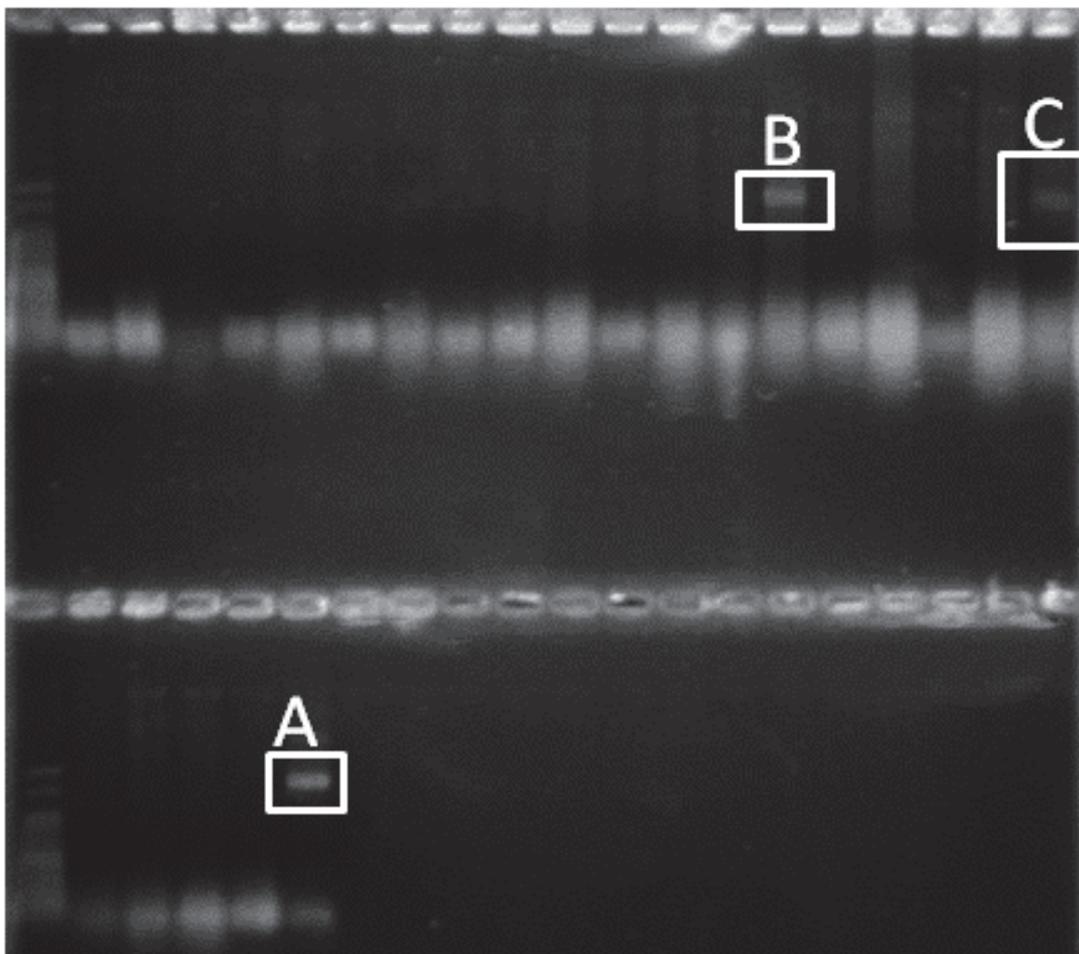


Figura 27: PCR a partir de clones bacterianos contendo o gene correspondente para a proteína NS1/2a do DENV2. Gel de agarose contendo fragmentos de DNA amplificados por PCR a partir de clones bacterianos contendo o gene correspondente para a proteína NS1/2a do DENV2. Os clones foram gerados pela transformação com o produto da ligação de ligação do plasmídeo pJD19 com o inserto DENV2-NS1/2aSmaI. Estes clones bacterianos foram selecionados por resistência à ampicilina e submetidos à PCR utilizando iniciadores DEN2NS1-smaF e DEN2NS2a-SmaR. Os fragmentos foram separados eletroforicamente a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Os clones positivos (pJD19DENV2-NS1/2aSmaI) apresentaram um fragmento de aproximadamente 1700 pb.e ,nesta figura, estão identificados por caixas brancas (A) Clone 23.19; (B) Clone 23.57; (C) clone 23.62.

Além da PCR de colônias, os plasmídeos contidos nos clones bacterianos foram submetidos à digestão pela enzima *SmaI*. Os que apresentam o inserto DENV2-NS1/2aSmaI deveriam produzir dois fragmentos um de aproximadamente 1700 pbs e outro de aproximadamente 5000 pbs. E este foi o padrão dos fragmentos produzidos na digestão dos clones 23.62 e 23.57. Sendo assim, esta digestão corrobora a presença do inserto DENV2-NS1/2aSmaI nestes dois clones(figura 28).

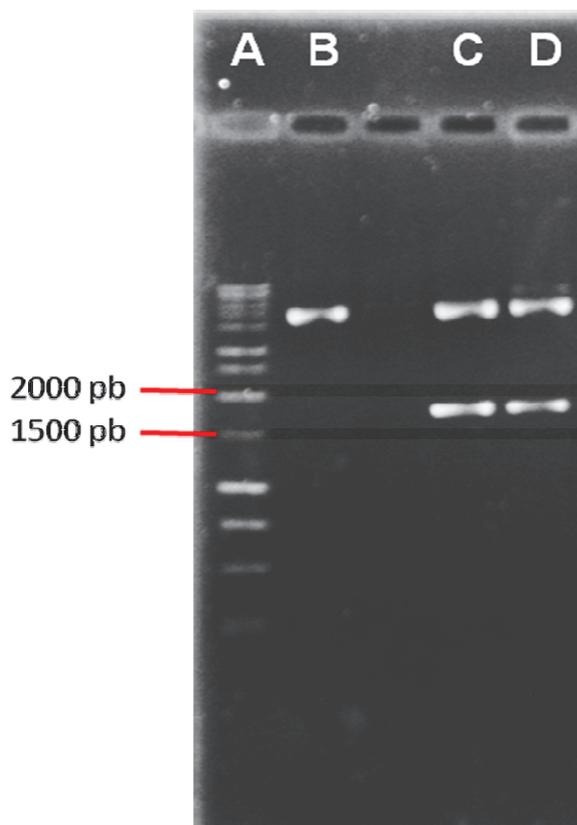


Figura 28:

Digestão dos plasmídeos clones positivos pJD19DENV2-NS1/2aSmaI com a enzima SmaI. Os produtos da digestão tiveram seus fragmentos separados eletroforéticamente a 80V em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, (A) 1Kb DNA Ladder Promega®; (B) pJD19 sem inserto foi utilizado como controle negativo; (C) 23.57; (D) 23.62 .

Devido ao fato do plasmídeo e o inserto terem sido cortados com apenas uma enzima de restrição, existe a possibilidade de o inserto ligar-se ao plasmídeo no sentido errado. Para contrapor essa possibilidade utilizou-se uma projeção utilizando-se a sequência do pJD19 somada com a sequência gerada para o inserto no sentido correto e no sentido incorreto de clonagem. Depois se utilizou o programa *nebcutterV2.0* (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) para observar quais enzimas poderiam ser utilizadas para identificar essa diferença. As enzimas para as quais o melhor resultado foi observado foram *EcoRV* e *PvuII* (Figura 29 e 30) (Tabela 3 e 4).

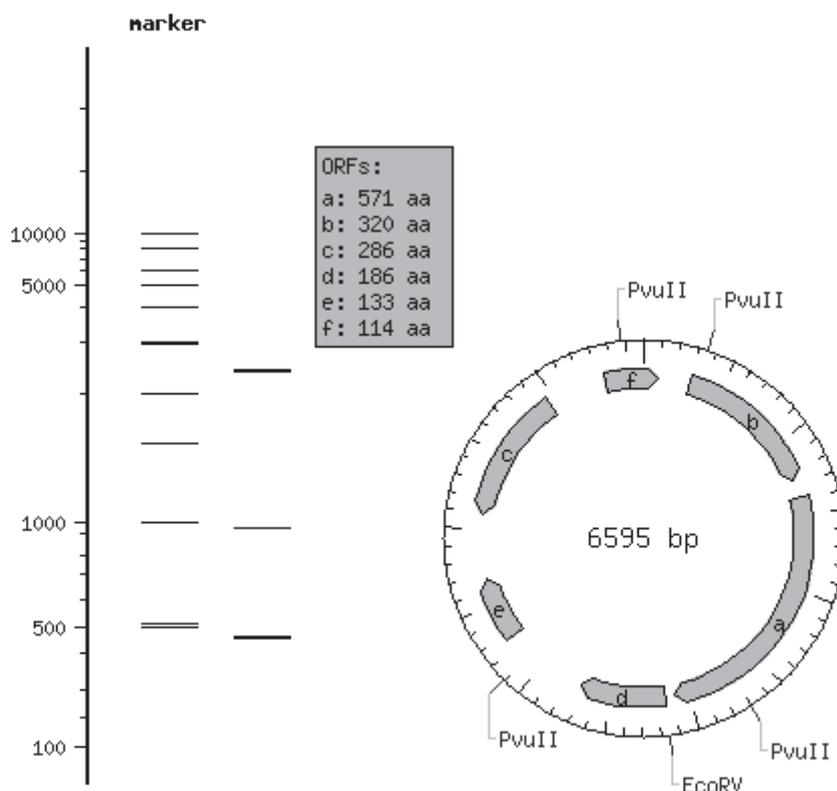


Figura 29: Esquema pJD19 com o inserto na orientação correta Esquema dos resultados esperados para digestão do plasmídeo pJD19DENV2-NS1/2aSmaI com as enzimas *EcoRV* e *PvuII* caso o inserto DENV2-NS1/2aSmaI esteja na orientação correta. À direita pode-se observar o padrão que seria gerado em um gel de agarose 0,7% e à esquerda se observa um esquema do plasmídeo e a localização dos sítios de restrição.

Tabela 3: pJD19DENV2-NS1/2aSmaI com o inserto DENV2-NS1/2aSmaI na orientação correta Indicação exata do local dos sítios de restrição e os respectivos tamanhos dos fragmentos gerados caso o inserto estiver na orientação correta.

#	Terminações	Coordenadas	Comprimento (bp)
1	<i>PvuII-PvuII</i>	4109-6472	2364
2	<i>PvuII-PvuII</i>	344-2706	2363
3	<i>EcoRV-PvuII</i>	3160-4108	949
4	<i>PvuII-PvuII</i>	6473-343	466
5	<i>PvuII-EcoRV</i>	2707-3159	453

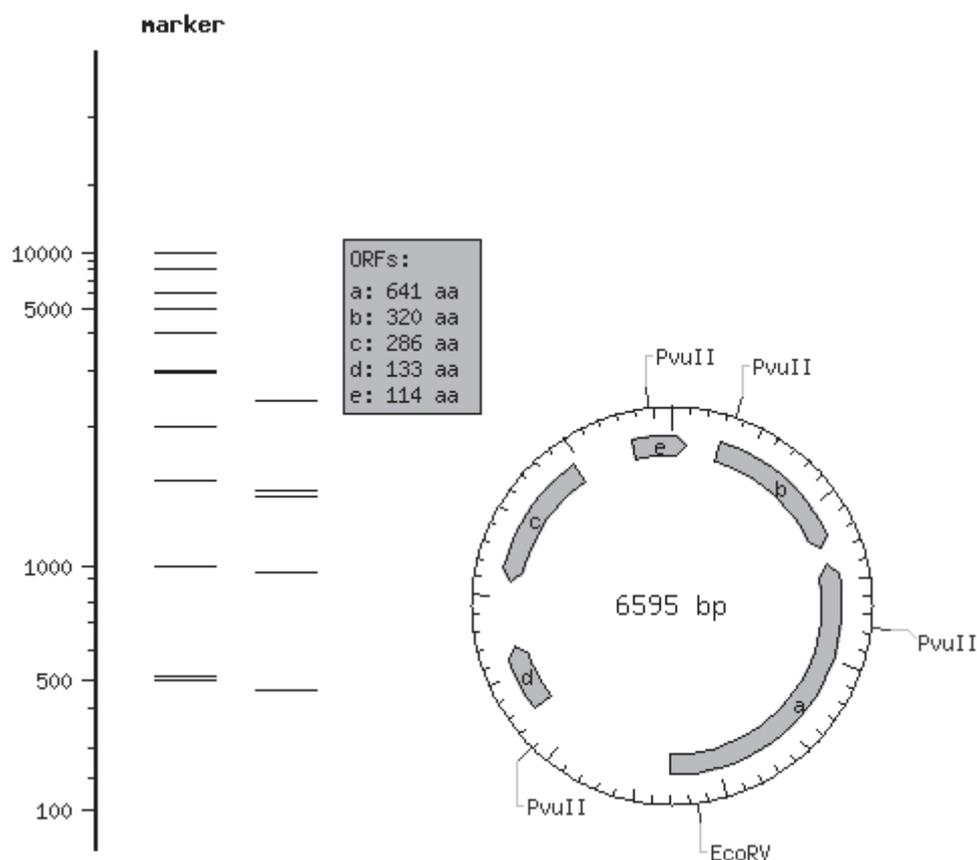


Figura 30: Esquema pJD19 com o inserto na orientação incorreta Esquema dos resultados esperados para digestão do plasmídeo pJD19DENV2-NS1/2aSmaI com as enzimas *EcoRV* e *PvuII*, caso o inserto DENV2-NS1/2aSmaI esteja no sentido incorreto. À direita pode-se observar o padrão que seria gerado em um gel de agarose 0,7% e à esquerda se observa um esquema do plasmídeo e a localização dos sítios de restrição.

Tabela 4: pJD19DENV2-NS1/2aSmaI com o inserto DENV2-NS1/2aSmaI na orientação incorreta. Indicação exata do local dos sítios de restrição e os respectivos tamanhos dos fragmentos gerados caso o inserto estiver na orientação incorreta.

#	Terminações	Coordenadas	Comprimento (bp)
1	<i>PvuII-PvuII</i>	4109-6472	2364
2	<i>PvuII-PvuII</i>	344-1774	1431
3	<i>PvuII-EcoRV</i>	1775-3159	1385
4	<i>EcoRV-PvuII</i>	3160-4108	949
5	<i>PvuII-PvuII</i>	6473-343	466

Os clones 23.57 e 23.62 foram então testados utilizando-se as enzimas de digestão para *EcoRV* e *PvuII*. Ao compararmos os resultados obtidos se torna claro que no clone 23.57 o inserto inseriu-se no sentido incorreto, e que no clone 23.62 o inserto está no sentido correto (Figura 31).

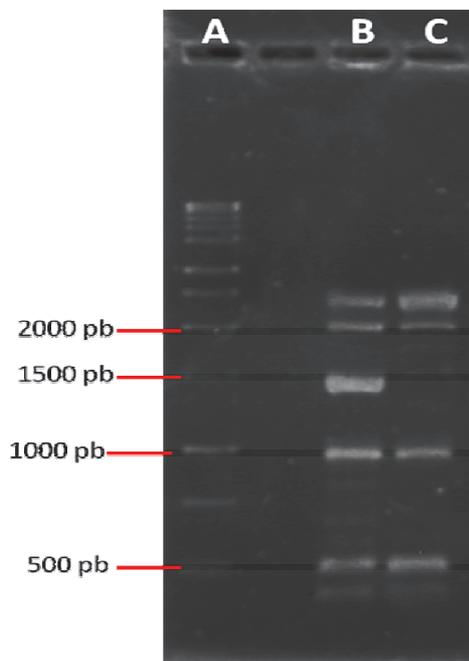


Figura 31: Eletroforese da digestão dos clones pJD19DENV2-NS1/2aSmaI com *EcoRV* e *PvuII*. A eletroforese revelou que o clone 23.62 estava no sentido correto. (A) DNA ladder 1Kb promega;(B) clone 23.57 observa-se que o padrão de bandas gerado é similar ao esperado caso o inserto estivesse no sentido incorreto com o surgimento de dois fragmentos com aproximadamente 1400 pb (comparar com Figura 29), (C) Já o padrão de bandas gerado pela digestão de 23.62.revelou-se similar ao esperado caso o inserto estivesse inserido no sentido correto (comparar com Figura 28)

6. Produção do Vetor MVA DEN2NS1/2a

Visando a construção de um MVA recombinante capaz de expressar a proteína DEN2-NS1/2a e a proteína fluorescente vermelha (MVA DEN2-NS1/2a), células CEFs foram infectadas por MVA e então transfectadas paralelamente com o plasmídeo 23.62. Devido à presença do gene codificador para a proteína RFP as células transfectadas pelo plasmídeo assumem uma fluorescência vermelha sob luz UV (Figura 32). Desta forma, torna-se possível observar a eficiência de transfecção. A transfecção foi bem sucedida e foram obtidos 40 clones na primeira rodada de seleção. Os clones foram submetidos à subseqüentes rodadas de seleção. No momento estes clones se encontram na quinta rodada de seleção.

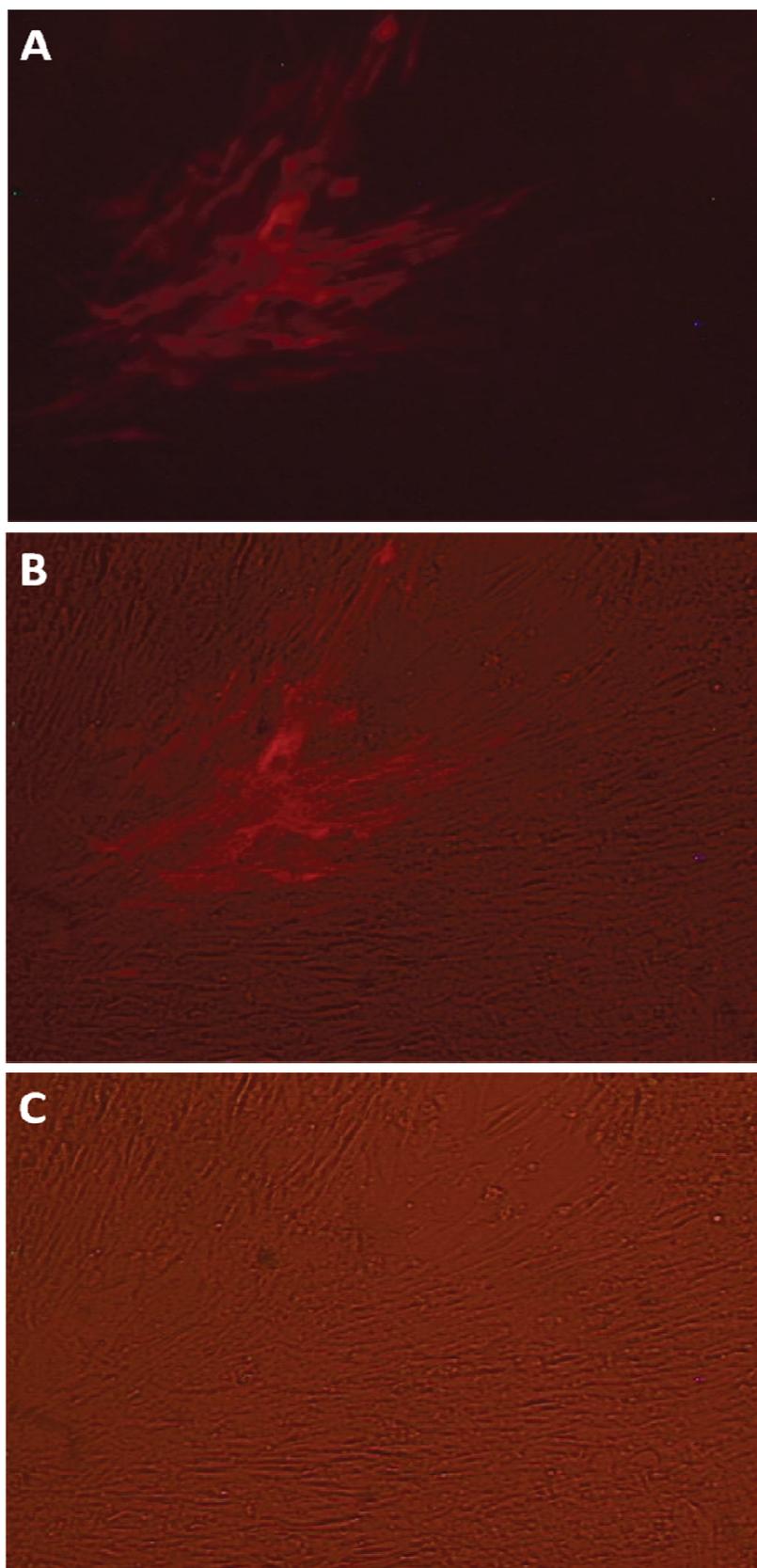


Figura 32. Microscopias de células infectadas pelo MVADEN2NS1/2a As células infectadas revelam a presença do MVADEN2NS1/2a através da expressão da proteína RFP. O MVA não apresenta efeito citopático, com isto sua detecção torna-se difícil, mas o MVADEN2NS1/2a recebeu o

gene da proteína marcadora RFP tornando possível a detecção das células infectadas mediante a expressão da proteína fluorescente. A sequência de fotos foi realizada em um mesmo campo **(A)** Na Microscopia de Fluorescência é possível identificar a expressão de RFP, e com isso, a presença do MVADEN2NS1/2a, **(B)** Na microscopia de campo claro mais fluorescência é possível observar, além da presença do clone MVADEN2NS1/2^a, a monocamada de células, **(C)** Já na microscopia de campo claro, há uma ausência de evidência da presença do MVADEN2NS1/2a, pois, como citado anteriormente, o MVA não gera efeito citopático..

7. Construção do vetor MVA DEN2-E-NS1/2a

As células CEF foram infectadas com o vetor VRD (MVADEN2-E) e transfectadas com o plasmídeo 23.62. Mediante a infecção pelo VRD as células adquirem fluorescência verde sob luz UV, e as células transfectadas pelo plasmídeo 23.62 assumem fluorescência vermelha, no entanto quando se sobrepõe as imagens dos dois filtros de UV, as células simultaneamente transfectadas e infectadas se tornam alaranjadas (Figura 33). Quase todas as células apresentaram-se verdes e houve uma boa porcentagem de células vermelhas, estes fatores apontam para o sucesso tanto da infecção quanto da transfecção, respectivamente.

Tendo sido a etapa de transfecção bem sucedida, foi iniciada a seleção dos clones positivos. Na primeira rodada de seleção houve a geração de uma grande quantidade de clones, destes quarenta foram coletados e armazenados, eles foram denominados AM01-40. Dos quarenta clones coletados na primeira etapa de seleção, foram selecionados seis para a rodada seguinte. A segunda rodada de seleção gerou um número pequeno de clones, sendo que, somando-se todos os clones gerados a partir das seis infecções foram obtidos apenas dezoito clones. Na terceira rodada, dos dezoito clones coletados na rodada anterior, foram selecionados novamente seis clones, desta vez o número de clones gerados foi ainda menor com apenas três clones. Na quarta rodada de seleção, a passagem destes três clones da rodada anterior, gerou apenas dois clones. Até este ponto foi observada uma gradativa diminuição no número de clones gerados, no entanto, esta tendência se alterou drasticamente na quinta rodada de seleção, sendo que a passagem dos dois clones da rodada anterior gerou 18 clones. Na sexta rodada de seleção, dos dezoito clones foram selecionados três clones que deram origem a trinta. Esta foi a última rodada de seleção realizada até o momento. Ao ser observado o padrão gerado

nestas rodadas de seleção, é possível observar-se os vírus expressando a proteína de interesse tendem a diminuir drasticamente, fator que também foi observado na construção do vetor MVADEN2-E. No entanto, na construção este último foi impossível precisar qual seria o fator que estaria gerando este padrão. Neste ponto a utilização do sistema RFP e GFP tornou-se instrumental, pois possibilitou o acompanhamento do comportamento da plataforma viral. Apesar da quantidade de vírus expressando RFP estar diminuindo, a quantidade de vírus expressando GFP se manteve quase a mesma. Coincidentemente, os clones AM que tiveram maior sucesso em gerar um grande número de clones nas rodadas subsequentes foram justamente os selecionados em diluições maiores onde os vírus VRD estavam mais espaçados. Estas observações permitirão uma alteração nos protocolos atuais e provavelmente levarão a processos mais rápidos e eficientes de seleção.

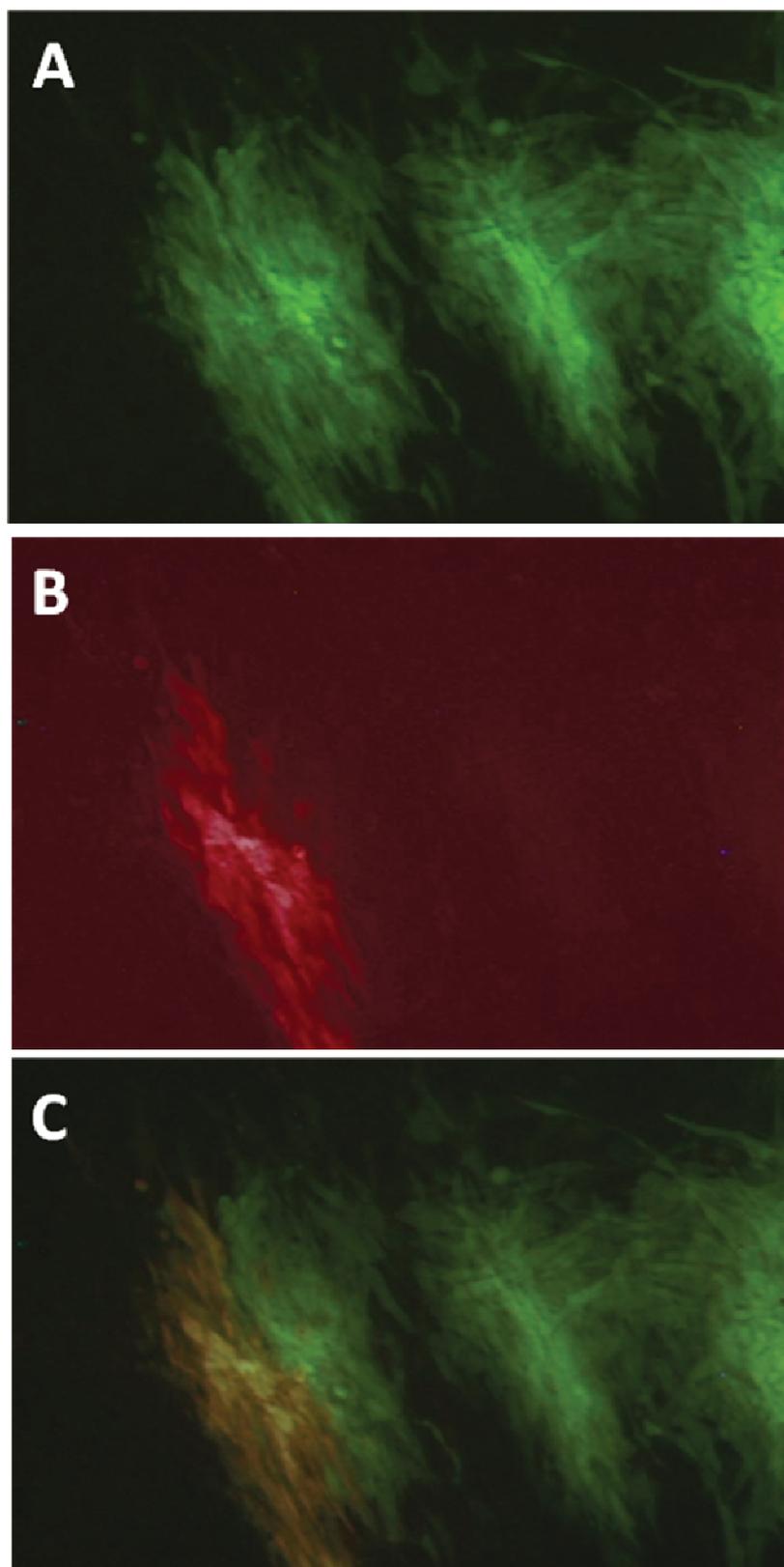


Figura 33: Microscopias de células infectadas pelo MVADEN2-E-NS1/2a. As células infectadas revelam a presença do MVADEN2-E-NS1/2a através da expressão concomitante das proteínas GFP e RFP. Esta série de fotografias foi gerada a partir de um mesmo campo na quarta rodada de seleção

(Figura 33 continuação) do vírus recombinante MVADEN2-E-NS1/2a. A fotografia A foi gerada utilizando-se microscopia de fluorescência com na presença do filtro verde, este filtro permite a passagem apenas do comprimento de onda que estimula a proteína GFP, sendo assim possível observar a presença de três clones neste campo. A fotografia B também foi gerada utilizando-se microscopia de fluorescência, porém, nesta o filtro utilizado foi o vermelho que permite a passagem apenas do comprimento de onda que estimula a proteína RFP. Através desta fluorescência foi possível observar a presença de um clone. A fotografia C é uma sobreposição das imagens de microscopia de fluorescência utilizando o filtro vermelho e verde. Desta forma, gerando uma coloração alaranjada onde existe um clone expressando as duas fluorescências concomitantemente.

8. Detecção da expressão da proteína E

Os testes de western blot realizados revelaram uma característica preocupante com relação aos anticorpos utilizados. Ao realizarmos análise dos resultados encontramos um resultado peculiar. Os anticorpos utilizados (Primários: policlonais contra o vírus da Dengue 1+2+3+4, ab9200; Secundários: anticorpos policlonais anti-IgG HRP, ab6721) marcaram todas as amostras presentes incluindo o controle de células e o controle de amostras MVA selvagens (Figura 34), o experimento foi repetido várias vezes mas os resultados se mantiveram..

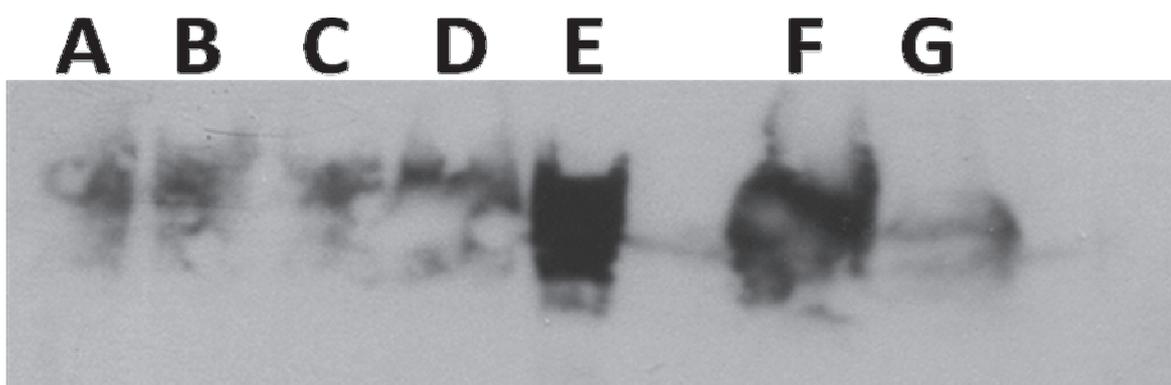


Figura 34: Análise da expressão de E em células infectadas com MVA e transfetadas com plasmídeos pLW44DEN2ESmaISall. Células de fibroblasto de embrião de galinha foram infectadas com o vírus MVA na MOI de 1, por uma hora e posteriormente transfetadas com pLW44 DEN3-E. Após um período de incubação de 48 horas em estufa à 37^oC as células 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. (A) PLCV01; (B) PLCV03; (C) PLCV05; (D) PLCV06; (E) Extrato de

células Vero infectadas por DENV2; (F) Extrato celular infectado pelo MVA Selvagem; (G) Controle de células. Houve marcação de todas as amostras presentes incluindo o controle de células e o controle de amostras MVA selvagens

9.Detecção da expressão da proteína NS1

Apesar de diversas repetições serem sido realizadas no western blot para detectar a proteína NS1, este se apresentou negativo mesmo para os controles positivos que utilizaram extrato celular infectado por DENV2. Foram testadas diferentes concentrações dos anticorpos primários e secundários, no entanto, mesmo com estas alterações não foi possível detectar a proteína. Sabe-se, porém que o anticorpo primário utilizado reage fracamente com alguns isolados de DENV2, como, por exemplo, o isolado NGC.

VI. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Atualmente, em termos de morbidade e mortalidade, considera-se a Dengue a mais importante arbovirose que afeta o homem (GUBLER, 1998b). Na última metade do século passado houve um enorme aumento na distribuição da doença que passou de 9 países para mais de 100 no intervalo entre 1959 e 1999. Estimativas da WHO apontam para que mais de 2,5 bilhões de pessoas estejam em risco de infecção por DENV, isto equivale a mais de um terço da população mundial. Apesar do fato que a maior parte destas poderá sofrer apenas de infecções assintomáticas ou subclínicas, é importante ressaltar que, em países da Ásia e América do Sul, a infecção vem se tornando uma causa importante de mortalidade infantil (GUHA-SAPIR e SCHIMMER, 2005). O número de casos de DF e DHF aumentou de 908 no período de 1950 e 1959, para 514.139 entre 1990 e 1999. Porém, devido ao fato de grande parte das infecções por DENV serem assintomáticas, o valor real estimado fica próximo de 50 milhões de casos por ano causando cerca de 24.000 mortes (GUHA-SAPIR e SCHIMMER, 2005).

A dengue é hoje objeto de uma das maiores campanhas de saúde pública do Brasil uma vez que epidemias cada vez maiores ocorrem todos os anos em quase todo o país (CAMARA *et al.*, 2007). No momento, os sorotipos DEN-1, DEN-2 e DEN-3 circulam simultaneamente em 24 dos 27 estados da Federação, contribuindo para a incidência da forma grave da doença (dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue) nas cidades onde se registram epidemias sequenciais por pelo menos dois sorotipos distintos (EDELMAN, 2007).

Apesar do grande números de casos por ano e, de aproximadamente, mais de um terço da população mundial estar sob risco de infecção, não existem drogas antivirais para o tratamento da doença e, muito menos, vacinas como prevenção. O controle do vetor é, atualmente, a única medida preventiva existente. Porém, essa medida é extremamente onerosa e pouco eficiente (GUBLER e CLARK, 1994). Esses dados demonstram a eminente necessidade do desenvolvimento de vacinas seguras e eficientes contra o DENV.

As estratégias para o desenvolvimento destas vacinas têm se baseado em técnicas utilizadas historicamente no desenvolvimento das vacinas hoje disponíveis, como vírus vivos, atenuados por passagens seriadas do tipo selvagem em culturas celulares ou por modificações genéticas do genoma viral (MCKEE *et al.*, 1987; BRAY *et al.*, 1996; VAUGHN *et al.*, 1996), ou a utilização de vírus inteiros inativados

(PUTNAK & BARVIR *et al.*, 1996; PUTNAK & CASSIDY *et al.*, 1996). Apesar disto, estas estratégias têm apresentado sucesso limitado, sendo que, os estudos de candidatos promissores a vacinas permanecem no estágio experimental.

Mediante estes problemas, a utilização do MVA, que está entre os vetores virais mais promissores e mais intensamente estudados, surge como uma ferramenta atraente e promissora para o desenvolvimento de uma vacina contra o DENV. Entre as vantagens apresentadas pelo vetor vacinal baseado no MVA destacam-se: baixo custo de produção; estabilidade ao calor; resistência ao congelamento e dessecação; simplicidade de administração, segurança ao vacinado, inclusive em indivíduos imunossuprimidos; e, principalmente, geração de imunidade de longa duração (MOSS, 1996; MASTRANGELO *et al.*, 2000).

A escolha das proteínas E e NS1/2a, inseridas no vetor MVA, foi baseada em trabalhos anteriores. No caso da proteína E, escolheu-se usar a mesma truncada em sua porção C terminal, expressa com aproximadamente 80% de sua sequência primária completa. Isto devido a testes de rádio-imunoprecipitação terem apontado 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. Também é importante ressaltar que macacos que receberam três doses das vacinas MVA homólogas para DENV 2 que expressavam a proteína E truncada, foram completamente protegidos quando desafiados (MEN *et al.*, 2000).

Um vírus vacinal similar já foi construído (MEN *et al.*, 2000). No entanto, neste trabalho não foram citados os iniciadores utilizados, foi apenas citado que o vírus utilizado foi o DENV2 *New Guinea C* (NGC) e que a proteína E foi expressa até o resíduo 405. A sequência de aminoácidos do inserto de LCV01 foi comparada à sequência de aminoácidos correspondente a 405 resíduos da proteína E do DENV2 NGC. A análise revelou que existem quatro aminoácidos diferentes, um ácido glutâmico (resíduo ácido) por uma lisina (resíduo básico), uma glicina (apolar) por uma serina (polar), uma treonina (polar) por uma isoleucina (apolar), e uma treonina por uma metionina (apolar) (Figura 35). Três dos quatro resíduos de aminoácidos alterados também estão presentes no isolado brasileiro ACY70780. Porém a alteração de glicina por serina é mais incomum em isolados brasileiros de DENV2, no entanto, esta é compartilhada pelo isolado ABW35389 de Singapura. Não se

sabe até que ponto essas mudanças podem influenciar o comportamento de uma vacina, no entanto, as sequências possuem um bom grau de semelhança e devido a isso se acredita que os resultados na geração de anticorpos e proteção devem ser semelhantes.

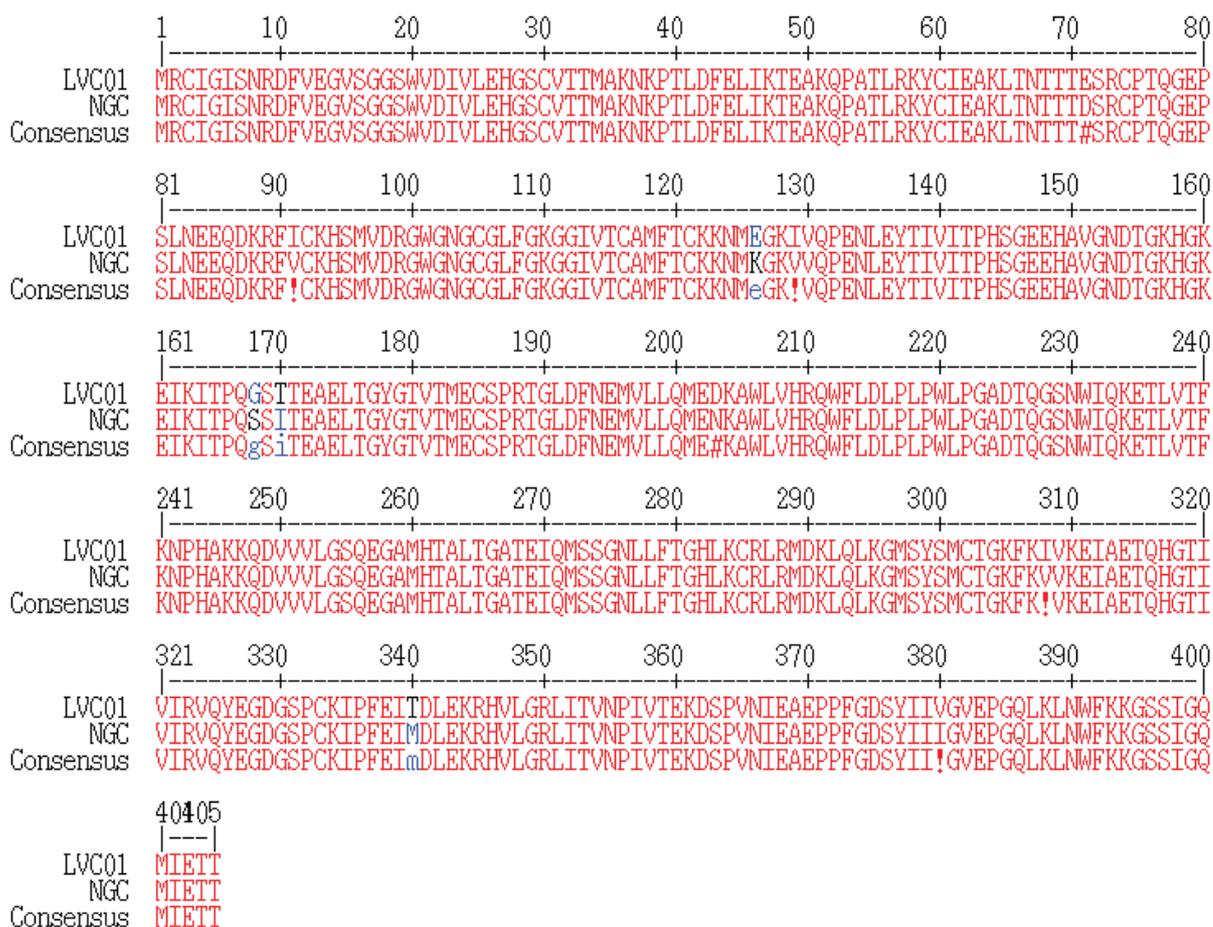


Figura 35: Alinhamento de aminoácidos de LCV01 e DENV2 NGC. O alinhamento apresentou apenas quatro modificações. Alinhamento das sequências de aminoácidos do inserto do clone LCV01 com sequência de aminoácidos correspondente a 405 resíduos da proteína E do DENV2 NGC. Marcado em vermelho estão os nucleotídeos iguais nas duas sequências, em azul os nucleotídeos presentes apenas em LCV01 e em preto os nucleotídeos presentes em apenas na amostra ACY70780.1.

A proteína NS1 foi escolhida por se mostrar altamente imunogênica e também foi capaz de induzir proteção em animais contra diferentes flavivirus (SCHLESINGER *et al.*, 1987; BRINTON *et al.*, 1998). Diversos relatos apontam para a possibilidade

de esta proteína induzir anticorpos com atividade de fixação de complemento o que aparentemente destrói as células infectadas (SCHLESINGER *et al.*, 1987; SCHLESINGER *et al.*, 1993). Estudos também apontam para a possibilidade da capacidade da proteção induzida por NS1 estar relacionada a uma resposta celular (COSTA *et al.*, 2007), esta seria desencadeada através de múltiplos epítomos de células T presentes apontados por em animais experimentais e humanos (YOUNG *et al.*, 2000). Neste estudo, a proteína NS1 foi expressa juntamente com aproximadamente 15 % da proteína NS2a, isto porque estudos anteriores apontaram para a necessidade desta região de NS2a para que NS1 atinja a conformação correta (FALGOUT *et al.*, 1990).

Assim, este estudo visou a construção de três vírus MVA recombinantes, MVADENV2-E, MVADENV2-NS1/2a e MVADENV2-E-NS1/2a. O objetivo final da geração destes três vírus é observar como diferentes padrões de imunização poderiam influenciar em diferentes respostas imunes. Diferentes estratégias de *priming-boost* podem ser testadas uma vez que estes diferentes vírus estejam concluídos. A estratégia de sua utilização conjunta aponta para a possibilidade de uma resposta mais completa contra o vírus.

No entanto é pouco provável que uma vacina monovalente gere proteção eficiente contra os quatro sorotipos do DENV. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina monovalente que seja protetora contra ao menos o seu sorotipo é uma primeira fase, e prova de princípio do método. No futuro esta estratégia poderá ser utilizada como parte da formulação de uma vacina tetravalente contra o DENV.

A escolha das enzimas de restrição é limitada pelos sítios presentes na região de inserção de pLW44, No caso deste estudo foi necessário utilizar *Sall* e *SmaI*. Isto gerou algumas dificuldades posteriores, uma vez que a temperatura de digestão e, principalmente, os tampões das duas enzimas são diferentes. Inicialmente utilizou-se uma estratégia de purificação intermediária. Mas esta estratégia gerou diversos problemas, pois a purificação intermediária gerava uma grande perda de material, mesmo utilizando diferentes estratégias de purificação. Por fim, alterou-se a estratégia totalmente, o tampão multicore não era uma opção pois *Sall* tem uma eficiência menor que 10% neste, o que se realizou então, foi uma primeira reação

utilizando o tampão para *Sall* nas concentrações recomendadas pelo fabricante (Promega[®]), para a segunda reação com *SmaI* ao invés de se purificar a amostra, apenas completou-se a reação com a quantidade de tampão para *SmaI* para aproximar a concentração dos sais à ideal. Por fim esta estratégia mostrou-se muito mais eficiente obtendo-se quantidades muito maiores de DNA no final do processo.

Também foram encontradas dificuldades no processo de ligação, foram testadas diversas proporções de inserto para plasmídeo, de temperatura e de duração do processo. Apesar de o fabricante (Promega[®]) recomendar uma proporção de um para três na quantidade molar de plasmídeo para inserto, respectivamente, a quantidade que finalmente gerou os clones necessários foi a de um para dez. Também se utilizou diferentes temperaturas e tempos, por fim a combinação que gerou os clones foi a de 60 horas a 15 °C, tempo muito superior ao recomendado pelo fabricante, que recomenda que a amostra seja incubada de 4 a 18 horas nesta temperatura.

As dificuldades na digestão e, possivelmente, de ligação apresentadas poderiam ser evitadas se um conjunto maior sítios de restrição estivesse presente no plasmídeo PLW44. Sendo assim, o nosso laboratório está desenvolvendo um novo plasmídeo de transfecção para estudos futuros, este irá conter um número maior sítios de restrição, uma vez que nenhuma das enzimas cujos sítios de restrição estão presentes em pLW44 (*SmaI*, *Sall* e *PstI*) apresentam compatibilidade de tampões. Este novo cassete de transferência poderá apresentar também, além de novos sítios de restrição, sequências de Kozac para potencializar a tradução e sinais de terminação para aumentar ainda mais a expressão de genes exógenos.

No caso do plasmídeo pJD19 não houve o mesmo problema, pois o plasmídeo e o inserto foram digeridos utilizando-se a mesma enzima. Apesar de este processo ser consideravelmente mais rápido por eliminar diversas fases na preparação das amostras ele gera outros dois grandes problemas. Ambas as extremidades do plasmídeo cortado são iguais isto gera uma possibilidade muito maior do plasmídeo ligar-se sem a presença do inserto, esta possibilidade pode ser corroborada pela grande quantidade de colônias negativas obtidas, de sessenta e duas amostras testadas apenas três apresentaram-se positivas na triagem por PCR.

O segundo problema é a possibilidade do inserto ligar-se na orientação incorreta em relação ao promotor mh5 presente no pJD19. Mas esta possibilidade pode ser testada utilizando-se as enzimas PvuI e *EcoRV*. Estas enzimas cortam o plasmídeo gerado em posições diferentes baseado na orientação do inserto gerando um padrão distinto quando o material é submetido à eletroforese. Por fim restou apenas o clone 23.62.

Os resultados do *western blot*, para a proteína E foram inconclusivos devido ao fato do controle de célula e dos controles infectados por MVA terem sido também reconhecidos pelos anticorpos utilizados. Apesar de serem testadas diferentes concentrações de anticorpos primários e secundários e diferentes amostras, o resultado persistiu. A resposta para este problema pode estar justamente na forma em que estes anticorpos são produzidos, eles são gerados pela infecção de camundongos com extrato celular infectados por DENV. Acredita-se que este procedimento possa estar gerando anticorpos que reconhecem algum componente celular ou algum dos insumos utilizados na manutenção de células como o soro fetal bovino. Foi realizado o pedido de novos anticorpos e existe o planejamento de gerar anticorpos através da imunização de camundongos apenas com a proteína E recombinante. Este é um problema recorrente para detecção de proteínas E do DENV vírus em vários outros laboratórios (F da Fonseca, R Galler, *Comunicação pessoal*).

A detecção da proteína NS1 também não foi possível. No entanto, este parece ser um problema com a técnica, uma vez que não houve marcação nem do controle positivo contendo extrato de células infectadas por DENV2. Testou-se a variação das concentrações dos anticorpos primários e secundários, porém os resultados se mantiveram. No entanto, o anticorpo primário utilizado (mouse monoclonal [DN1] para a glicoproteína NS1 do DENV, ab41490) sabidamente apresenta problemas na detecção destas proteínas em alguns isolados de DENV2 como o NGC.

A construção dos vírus MVA foi bem sucedida, no entanto, não houve tempo hábil para realizar todas as etapas de seleção dos vírus MVADENV2-NS1/2a e MVADENV2-E-NS1/2a. Parte deste problema está justamente na utilização de células CEF, uma vez tratando-se de um cultivo primário existe uma

heterogeneidade inerente entre as preparações de células, esta dificulta o processo de padronização das técnicas utilizadas. Para evitar este problema está sendo providenciada a compra de células CEF de linhagem contínua UMNSAH/DF-1 (ATCC CRL-12203)(BAREFOOT *et al.*, 2008).

Um fator inovador deste trabalho em relação aos outros utilizando MVA para a geração de vacinas contra o DENV foi a utilização do sistema de fluorescência para a detecção de clones transfectados. Os plasmídeos pLW44 (GFP) e pJD19 (RFP) permitem uma detecção mais rápida dos clones e geram a independência do uso de anticorpos nas rodadas de seleção. Mais interessante é a capacidade destes serem utilizados em concomitância. Isto é possível porque, apesar do plasmídeo pJD19 ser estruturalmente semelhante ao pLW44, seus flancos homólogos ao genoma de MVA dirigem a inserção do cassete de expressão para a região de deleção II que está fisicamente distante e é independente da região de Deleção III, local de inserção da construção contida no plasmídeo pLW44. Esta estratégia nunca tinha sido testada antes e este trabalho demonstrou que o sistema duplo funciona.

A utilização do sistema com duas proteínas fluorescentes permitiu o acompanhamento da construção do vetor de forma antes impossível, comparando-se o comportamento do vírus parental em relação ao recombinante. Era esperado que os vírus com inserto par NS1 se multiplicassem com mais dificuldade que os vírus sem este, uma vez que o promotor mh5 é muito forte e seria oneroso para estes vírus gerarem constantemente a proteína exógena, no entanto com o GFP notou-se o quão grande era essa disparidade. Por exemplo, na quarta rodada de seleção foi possível serem contados mais de 100 clones verdes em uma câmara e, no entanto, encontrou-se apenas 1 clone amarelo (duplo recombinante expressando as fluorescências verde e vermelhas) na mesma. Estes dados permitirão modificações nos protocolos das rodadas de seleção como o aumento de diluição dos lisados. Com os dados gerados pela comparação de GFP e RFP, apontando para uma menor multiplicação dos vírus expressando as proteínas exógenas, também se tornou possível comparar os resultados observados com outros estudos que apresentaram o mesmo problema. Nestes estudos foi utilizada a inserção de sequências de terminação que demonstraram aumentar a eficiência de multiplicação dos *Vaccinia virus* mesmo com a expressão de proteínas exógenas.(WARD *et al.*,

1995). Sendo assim, nossos resultados apontam para a utilidade e funcionalidade do sistema com múltiplas proteínas fluorescentes marcadoras não só na geração e seleção de vírus MVA com múltiplas recombinações mas também no estudo e adaptação da tecnologia em si.

A partir deste trabalho concluímos que: o sistema de expressão de marcadores florescentes múltiplos funciona. Esta afirmação é amparada pelo sucesso obtido na geração de clones que expressam GFP e RFP tanto individualmente quanto em conjunto. No entanto, os ensaios para detecção das proteínas E e NS1 encontram-se ainda incompletos devido a problemas técnicos encontrados na técnica de *western blot*.

Em contrapartida ao seu enorme potencial, está o fato da tecnologia dos poxvírus recombinantes simplesmente não ser produtivamente utilizada nem estudado com detalhes no Brasil. Este projeto teve como objetivo global lançar as bases para a implementação da tecnologia dos poxvírus recombinantes no Laboratório de Virologia Comparada, assim como no País. Além de sua utilização na construção e teste de vacinas recombinantes multivalentes baseadas no MVA contra infecções pelo DENV, esta tecnologia certamente tem aplicações na geração de potenciais vacinas contra outras endemias, principalmente patógenos com ciclos de vida intracelulares. Ao lidar-se com o desenvolvimento de qualquer tecnologia de ponta encontram-se imprevistos, mas estes geram as bases para a futura geração de protocolos mais eficientes.

Apesar de o presente estudo demonstrar que a plataforma é eficiente, ainda existe muito espaço para melhorias da mesma. Pode-se citar algumas melhorias do plasmídeo de transfecção como a inserção (a) de sequências de Kozak para aumentar a eficiência de expressão das proteínas; (b) de sinais de terminação de transcrição que, aparentemente, estão relacionados com uma maior capacidade multiplicação mesmo em vírus expressando proteínas exógenas (WARD *et al.*, 1995);; (c) de mais sítios de restrição desta forma permitindo uma maior flexibilidade de trabalho.

VII. PERSPECTIVAS

- Terminar as etapas de seleção dos MVADENV2-NS1/2a e MVADENV2-E-NS1/2a.
- Geração de anticorpos em camundongos através da inoculação da proteína E purificada.
- Realizar novos testes de *Western Blot* utilizando diferentes anticorpos para a detecção das proteínas E e NS1
- Criação de novos plasmídeos de transfecção com a presença de sequências de Kozak, sinais de terminação e mais sítios de restrição
- Testar as construções MVADENV2-E, MVADENV2-NS1/2a e MVADENV2-E-NS1/2a de forma monovalente em animais e determinar sua segurança e imunogenicidade.
- Testar as construções MVADENV2-E, MVADENV2-NS1/2a e MVADENV2-E-NS1/2a em animais com diferentes regimes de priming boost.
- Utilizar as construções geradas em conjunto com vetores MVA expressando individualmente as proteínas dos outros sorotipos de DENV, desta forma espera-se gerar uma vacina tetravalente.

VIII CRONOGRAMA FÍSICO DE EXECUÇÃO

Atividades	Ano	2008		2009		2010
	Semestre	1º	2º	1º	2º	1º
Redação e apresentação do projeto de Dissertação		X				
Obtenção dos créditos		X	X	X		
Manutenção de células			X	X	X	X
Obtenção do plasmídeo pLW44-DEN2E		X	X			
Obtenção do plasmídeo pJD19-DEN2NS1/2a			X	X		
Obtenção do vetor MVA DENV2-E				X	X	
Obtenção do vetor MVA DENV2 -NS1					X	X
Obtenção do vetor MVA DENV2-E-NS1					X	
Detecção da expressão da proteína E				X	X	
Detecção da expressão da proteína NS1				X	X	X
Multiplicação do vírus MVA Parental		X	X	X		
Revisão bibliográfica		X	X	X	X	X
Redação e defesa da Dissertação					X	X

IX. BIBLIOGRAFIA

A, A. N., A. Berlioz-Arthaud, *et al.* Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. Virology, v.329, n.2, p.505-12. 2004.

Abaitua, F., J. R. Rodriguez, *et al.* Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. Virus Res, v.116, n.1-2, p.11-20. 2006.

Alcon, S., A. Talarmin, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. J Clin Microbiol, v.40, n.2, p.376-81. 2002.

Alcon-Lepoder, S., M. T. Drouet, *et al.* The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. J Virol, v.79, n.17, p.11403-11. 2005.

Antoine, G., F. Scheiflinger, *et al.* The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. Virology, v.244, p.365-395. 1998.

Avirutnan, P. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. J. Infect. Dis., v.193, p.1078-1088. 2006.

Baldick, C. J., Jr., J. G. Keck, *et al.* Mutational analysis of the core, spacer, and initiator regions of vaccinia virus intermediate-class promoters. J Virol, v.66, n.8, p.4710-9. 1992.

Barefoot, B., N. J. Thornburg, *et al.* Comparison of multiple vaccine vectors in a single heterologous prime-boost trial. Vaccine, v.26, n.48, p.6108-18. 2008.

Bisht, H., A. Roberts, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.17, p.6641-6. 2004.

Blanchard, T. J., A. Alcami, *et al.* Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins- implications for use as a human vaccine. J. Gen. Virol., v.79, p.1159-1167. 1998.

Blaney, J. E. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. Am. J. Trop. Med. Hyg., 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.

Bonnet, M. C., J. Tartaglia, *et al.* Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. Immunol Lett, v.74, n.1, p.11-25. 2000.

Brandt, W. E. From the World Health Organization. Development of dengue and Japanese encephalitis vaccines. J Infect Dis, v.162, n.3, p.577-83. 1990.

- Bray, M., R. Men, *et al.* Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge. J Virol, v.70, n.6, p.4162-6. 1996.
- Bressanelli, S., K. Stiasny, *et al.* Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. Embo J, v.23, n.4, p.728-38. 2004.
- Brinton, M. A. e J. H. Disposito. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. Virology, v.162, n.2, p.290-9. 1988.
- Brinton, M. A., I. Kurane, *et al.* Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. Clin Diagn Virol, v.10, n.2-3, p.129-39. 1998.
- Broyles, S. S. Vaccinia virus transcripton. J. Gen. Virol., v.84, p.2293-2303. 2003.
- Buller, R. L. M. e G. J. Palumbo. Poxvirus pathogenesis. Microbiol. Rev., v.55, p.80-122. 1991.
- Burke, D. S. e T. P. Monath. Fields Virology: 1043-1125 p. 2001.
- Burke, D. S., A. Nisalak, *et al.* A prospective study of dengue infections in Bangkok. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.38, p.172-180. 1988.
- 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.
- Cahour, A., A. Pletnev, *et al.* Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. Virology, v.207, n.1, p.68-76. 1995.
- Calvert, A. E., C. Y. Huang, *et al.* Non-structural proteins of dengue 2 virus offer limited protection to interferon-deficient mice after dengue 2 virus challenge. J. Gen. Virol., v.87, p.339-346. 2006.
- Camara, F. P., R. L. Theophilo, *et al.* [Regional and dynamics characteristics of dengue in Brazil: a retrospective study]. Rev Soc Bras Med Trop, v.40, n.2, p.192-6. 2007.
- Carlos, C. C. Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.73, p.435-440. 2005.
- Carroll, M. W. e B. Moss. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus- propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. Virology, v.238, p.198-211. 1997.
- Carter, G. C., M. Law, *et al.* Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. J Gen Virol, v.86, n.Pt 5, p.1279-90. 2005.
- Chang, H. H., H. F. Shyu, *et al.* Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. J Infect Dis, v.186, n.6, p.743-51. 2002.
- Chen, Y., T. Maguire, *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. Nat Med, v.3, n.8, p.866-71. 1997.

Chen, Y. C., S. Y. Wang, *et al.* Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism.J Virol, v.73, n.4, p.2650-7. 1999.

Chung, K. M., G. E. Nybakken, *et al.* Antibodies against West Nile Virus nonstructural protein NS1 prevent lethal infection through Fc gamma receptor-dependent and -independent mechanisms.J Virol, v.80, n.3, p.1340-51. 2006.

Clyde, K., J. L. Kyle, *et al.* Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis.J Virol, v.80, n.23, p.11418-31. 2006.

Condit, R. C. e E. G. Niles. Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection.Biochim Biophys Acta, v.1577, n.2, p.325-36. 2002.

Cosma, A., S. Buhler, *et al.* Neutralization assay using a modified vaccinia virus Ankara vector expressing the green fluorescent protein is a high-throughput method to monitor the humoral immune response against vaccinia virus.Clin Diagn Lab Immunol, v.11, n.2, p.406-10. 2004.

Costa, S. M., A. S. Azevedo, *et al.* DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice.Virology, v.358, n.2, p.413-23. 2007.

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.

Crooks, A. J., J. M. Lee, *et al.* The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell.J Gen Virol, v.75 (Pt 12), p.3453-60. 1994.

Cummings, D. A., R. A. Irizarry, *et al.* Travelling waves in the occurrence of dengue haemorrhagic fever in Thailand.Nature, v.427, n.6972, p.344-7. 2004.

Cyrklaff, M., C. Risco, *et al.* Cryo-electron tomography of vaccinia virus.Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.8, p.2772-7. 2005.

Deas, T. S., I. Binduga-Gajewska, *et al.* Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication.J Virol, v.79, n.8, p.4599-609. 2005.

Drexler, I., K. Heller, *et al.* Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells.J. Gen. Virol., v.79, p.347-352. 1998.

Drexler, I., C. Staib, *et al.* Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?Curr Opin Biotechnol, v.15, n.6, p.506-12. 2004.

Durbin, A. P., L. S. Wyatt, *et al.* The immunogenicity and efficacy of intranasally or parenterally administered replication-deficient vaccinia-parainfluenza virus type 3 recombinants in rhesus monkeys.Vaccine, v.16, n.13, p.1324-30. 1998.

- Earl, P. L., S. Koenig, *et al.* Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. J Virol, v.65, n.1, p.31-41. 1991.
- 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. Dengue vaccines approach the finish line. Clin Infect Dis, v.45 Suppl 1, p.S56-60. 2007.
- Egan, M. A., W. A. Pavlat, *et al.* Induction of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T lymphocyte responses in seronegative adults by a nonreplicating, host-range-restricted canarypox vector (ALVAC) carrying the HIV-1MN env gene. J Infect Dis, v.171, n.6, p.1623-7. 1995.
- Endy, T. P. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. Am. J. Epidemiol., v.156, p.40-51. 2002.
- Espy, M. J., I. F. Cockerill, *et al.* Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. J Clin Microbiol, v.40, n.6, p.1985-8. 2002.
- Falconar, A. K. e P. R. Young. Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. J Gen Virol, v.72 (Pt 4), p.961-5. 1991.
- Falgout, B., M. Bray, *et al.* Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. J Virol, v.64, n.9, p.4356-63. 1990.
- Falgout, B., R. Chanock, *et al.* Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. J Virol, v.63, n.5, p.1852-60. 1989.
- Falgout, B. e L. Markoff. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. J Virol, v.69, n.11, p.7232-43. 1995.
- Fenner, F. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. Res Virol, v.140, n.5, p.465-6; discussion 487-91. 1989.
- Fenner, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. FEMS Microbiol Rev, v.24, n.2, p.123-33. 2000.
- Fernandez-Mestre, M. T., K. Gendzekhadze, *et al.* TNF-[alpha]-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. Tissue Antigens, v.64, p.469-472. 2004.
- Figueiredo, L. T., M. A. Owa, *et al.* [Laboratory diagnosis and symptoms of dengue, during an outbreak in the Ribeirao Preto region, SP, Brazil]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.34, n.2, p.121-30. 1992.

- Flamand, M., F. Megret, *et al.* Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. J Virol, v.73, n.7, p.6104-10. 1999.
- Gaunt, M. W., A. A. Sall, *et al.* Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. J Gen Virol, v.82, n.Pt 8, p.1867-76. 2001.
- Germi, R., J. M. Crance, *et al.* Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. Virology, v.292, n.1, p.162-8. 2002.
- Green, S., I. Kurane, *et al.* Recognition of dengue virus NS1-NS2a proteins by human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones. Virology, v.234, n.2, p.383-6. 1997.
- Green, S. e A. Rothman. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. Curr. Opin. Infect. Dis., v.19, p.429-436. 2006.
- Gubler, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: 1-22 p. 1997.
- Gubler, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin. Microbiol. Rev., v.11, p.480-496. 1998a.
- Gubler, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev, v.11, n.3, p.480-96. 1998b.
- Gubler, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends Microbiol, v.10, n.2, p.100-3. 2002.
- Gubler, D. J. e G. G. Clark. Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. Am J Trop Med Hyg, v.50, n.6 Suppl, p.50-60. 1994.
- Gubler, D. J., G. Kuno, *et al.* Flaviviruses. In: (Ed.). Fields Virology, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007
- Gubser, C., S. Hue, *et al.* Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. J Gen Virol, v.85, n.Pt 1, p.105-17. 2004.
- Guha-Sapir, D. e B. Schimmer. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. Emerg Themes Epidemiol, v.2, n.1, p.1. 2005.
- 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. Epidemiologic studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. Am. J. Epidemiol., v.152, p.793-799. 2000.

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.

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

Hall, R. A., A. A. Khromykh, *et al.* Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. Virology, v.264, n.1, p.66-75. 1999.

Halstead, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. Science, v.239, p.476-481. 1988.

Henchal, E. A., L. S. Henchal, *et al.* Topological mapping of unique epitopes on the dengue-2 virus NS1 protein using monoclonal antibodies. J Gen Virol, v.68 (Pt 3), p.845-51. 1987.

Higgs, S. Growth characteristics of ChimeriVax-Den vaccine viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.75, p.986-993. 2006.

Hilgard, P. e R. Stockert. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. Hepatology, v.32, n.5, p.1069-77. 2000.

Holden, K. L., D. A. Stein, *et al.* Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. Virology, v.344, n.2, p.439-52. 2006.

Huang, J. L., J. H. Huang, *et al.* High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. J Med Virol, v.65, n.3, p.553-60. 2001.

Hughes, A. L. e R. Friedman. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. Mol Phylogenet Evol, v.35, n.1, p.186-95. 2005.

Innis, B. L. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: 221-243 p. 1997.

Jacobs, M. G., P. J. Robinson, *et al.* Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. Faseb J, v.14, n.11, p.1603-10. 2000.

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.

Jindadamrongwech, S., C. Thepparit, *et al.* Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. Arch Virol, v.149, n.5, p.915-27. 2004.

Johnson, D. C. e M. T. Huber. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. J Virol, v.76, n.1, p.1-8. 2002.

Joklik, W. K. The purification fo four strains of poxvirus. Virology, v.18, p.9-18. 1962.

Kalayanarooj, S. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. J. Infect. Dis., v.176, p.313-321. 1997.

Kanesa-Thasan, N. Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. Vaccine, v.19, p.3179-3188. 2001.

Kaufman, B. M. Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.41, p.576-580. 1989.

Kaufman, B. M., P. L. Summers, *et al.* Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.36, p.427-434. 1987.

Keck, Z. Y., T. K. Li, *et al.* Analysis of a highly flexible conformational immunogenic domain in hepatitis C virus E2. J Virol, v.79, n.21, p.13199-208. 2005.

Kent, S. J., A. Zhao, *et al.* Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. J Virol, v.72, n.12, p.10180-8. 1998.

Kho, L. K., H. Wulur, *et al.* Dengue hemorrhagic fever accompanied by encephalopathy in Jakarta. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, v.12, p.83-86. 1981.

Khromykh, A. A., P. L. Sedlak, *et al.* Efficient trans-complementation of the flavivirus kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. J Virol, v.73, n.12, p.10272-80. 1999.

Khromykh, A. A., P. L. Sedlak, *et al.* cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. J Virol, v.74, n.7, p.3253-63. 2000.

Kieny, M. P., R. Lathe, *et al.* Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature, v.312, n.5990, p.163-6. 1984.

Kinney, R. M., C. Y. Huang, *et al.* Inhibition of dengue virus serotypes 1 to 4 in vero cell cultures with morpholino oligomers. J Virol, v.79, n.8, p.5116-28. 2005.

Kitchener, S. Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. Vaccine, v.24, p.1238-1241. 2006.

Kliks, S. C., S. Nimmannitya, *et al.* Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.38, p.411-419. 1988.

Kliks, S. C., A. Nisalak, *et al.* Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.40, p.444-451. 1989.

Koraka, P., C. P. Burghoorn-Maas, *et al.* Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. J Clin Microbiol, v.41, n.9, p.4154-9. 2003.

Kouri, G., M. G. Guzman, *et al.* Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. Emerg Infect Dis, v.4, n.1, p.89-92. 1998.

Kramer, L. D. e G. D. Ebel. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. Adv Virus Res, v.60, p.187-232. 2003.

- Kuhn, R. J., W. Zhang, *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell, v.108, n.5, p.717-25. 2002.
- Kuo, C. H. Liver biochemical tests and dengue fever. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.47, p.265-270. 1992.
- Kurane, I. e F. A. Ennis. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: 273-290 p. 1997.
- Lai, P. C. Characteristics of a dengue hemorrhagic fever outbreak in 2001 in Kaohsiung. J. Microbiol. Immunol. Infect., v.37, p.266-270. 2004.
- Law, M., G. C. Carter, *et al.* Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.15, p.5989-94. 2006.
- Lee, J. M., A. J. Crooks, *et al.* The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein. J Gen Virol, v.70 (Pt 2), p.335-43. 1989.
- Levine, M. M. e M. B. Sztein. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. Nat Immunol, v.5, n.5, p.460-4. 2004.
- Leyssen, P., E. De Clercq, *et al.* Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. Clin Microbiol Rev, v.13, n.1, p.67-82, table of contents. 2000.
- Li, W., Y. Li, *et al.* Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. J Virol, v.76, n.23, p.11989-2000. 2002.
- 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, p.1165-8. 2002.
- Lim, H. Y. e M. L. Ng. A different mode of entry by dengue-2 neutralisation escape mutant virus. Arch Virol, v.144, n.5, p.989-95. 1999.
- Lin, C. F., S. C. Chiu, *et al.* Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. J Immunol, v.174, n.1, p.395-403. 2005.
- Lin, C. F., H. Y. Lei, *et al.* Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. J Immunol, v.169, n.2, p.657-64. 2002.
- Lin, Y. L., H. Y. Lei, *et al.* Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. Antiviral Res, v.56, n.1, p.93-6. 2002.
- Lindenbach, B. D. e C. M. Rice. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. J Virol, v.71, n.12, p.9608-17. 1997.
- Lindenbach, B. D. e C. M. Rice. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. J Virol, v.73, n.6, p.4611-21. 1999.
- Lindenbach, B. D. e C. M. Rice. Molecular biology of flaviviruses. Adv Virus Res, v.59, p.23-61. 2003.

- Lindenbach, B. D., H. Thiel, *et al.* Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: (Ed.). Fields Virology, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007
- Macdonald, J., J. Tonry, *et al.* NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. J Virol, v.79, n.22, p.13924-33. 2005.
- Mackenzie, J. M., A. A. Khromykh, *et al.* Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. Virology, v.245, n.2, p.203-15. 1998.
- Mackett, M., G. L. Smith, *et al.* Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.23, p.7415-9. 1982.
- Malkin, A. J., A. Mcpherson, *et al.* Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by in situ atomic force microscopy. J Virol, v.77, n.11, p.6332-40. 2003.
- Mallardo, M., E. Leithe, *et al.* Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. J Virol, v.76, n.10, p.5167-83. 2002.
- Markoff, L. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. Adv Virus Res, v.59, p.177-228. 2003.
- Mason, P. W. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. Virology, v.169, n.2, p.354-64. 1989.
- Mastrangelo, M. J., L. C. Eisenlohr, *et al.* Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. J Clin Invest, v.105, n.8, p.1031-4. 2000.
- Mastrangelo, M. J. e E. C. Lattime. Virotherapy clinical trials for regional disease: in situ immune modulation using recombinant poxvirus vectors. Cancer Gene Ther., v.9, p.1013-1021. 2002.
- Mcfadden, G. Poxvirus tropism. Nat Rev Microbiol, v.3, n.3, p.201-13. 2005.
- Mckee, K. T., Jr., W. H. Bancroft, *et al.* Lack of attenuation of a candidate dengue 1 vaccine (45AZ5) in human volunteers. Am J Trop Med Hyg, v.36, n.2, p.435-42. 1987.
- Men, R., M. Bray, *et al.* Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3[prime] noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. J. Virol., v.70, p.3930-3937. 1996.
- Men, R., L. Wyatt, *et al.* 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, v.18, n.27, p.3113-22. 2000.
- Meyer, H., G. Sutter, *et al.* Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. J. Gen. Virol., v.72, p.1031-1038. 1991.
- Minev, B. R., F. L. Chavez, *et al.* Cancer vaccines: novel approaches and new promise. Pharmacol Ther, v.81, n.2, p.121-39. 1999.
- 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.

- Monath, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.7, p.2395-400. 1994.
- Monath, T. P. Yellow fever vaccine. Expert Rev Vaccines, v.4, n.4, p.553-74. 2005.
- Moorthy, V. S., S. Mcconkey, *et al.* Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. falciparum* malaria in non-immune volunteers. Vaccine, v.21, n.17-18, p.1995-2002. 2003.
- Moss, B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.21, p.11341-8. 1996.
- Moss, B. Fields Virology: 2849-2883 p. 2001.
- Moss, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: (Ed.). Fields Virology, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007
- Mukhopadhyay, S., R. J. Kuhn, *et al.* A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol, v.3, n.1, p.13-22. 2005.
- Murgue, B., C. Roche, *et al.* Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. J. Med. Virol., v.60, p.432-438. 2000.
- Muylaert, I. R., T. J. Chambers, *et al.* Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. Virology, v.222, n.1, p.159-68. 1996.
- Newsome, T. P., N. Scaplehorn, *et al.* Src mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. Science, v.306, p.124-129. 2004.
- Nguyen, T. H. Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. J. Infect. Dis., v.189, p.221-232. 2004.
- Nimmannitya, S. Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, v.18, p.392-397. 1987.
- Nimmannitya, S., U. Thisyakorn, *et al.* Dengue haemorrhagic fever with unusual manifestations. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, v.18, p.398-406. 1987.
- Nogueira, R. M., H. G. Schatzmayr, *et al.* Dengue virus type 3, Brazil, 2002. Emerg Infect Dis, v.11, n.9, p.1376-81. 2005.
- Panicali, D. e E. Paoletti. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.16, p.4927-31. 1982.
- Paoletti, E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.21, p.11349-53. 1996.
- Pastoret, P.-P. e A. Vanderplasschen. Poxviruses as vaccine vectors. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v.26, p.343-355. 2003.

Patey, O., L. Ollivaud, *et al.* Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.48, p.793-802. 1993.

Pengsaa, K. Dengue virus infections in the first 2 years of life and the kinetics of transplacentally transferred dengue neutralizing antibodies in thai children. J. Infect. Dis., v.194, p.1570-1576. 2006.

Pramulijo, H. S. e S. R. Harun. Ultrasound findings in dengue haemorrhagic fever. Pediatr. Radiol., v.21, p.100-102. 1991.

Pryor, M. J. e P. J. Wright. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. Virology, v.194, n.2, p.769-80. 1993.

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.

Ramirez, J. C., M. M. Gherardi, *et al.* Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. J Virol, v.74, n.2, p.923-33. 2000.

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.

Reyes-Del Valle, J., S. Chavez-Salinas, *et al.* Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. J Virol, v.79, n.8, p.4557-67. 2005.

Rigau-Perez, J. G., G. G. Clark, *et al.* Dengue and dengue haemorrhagic fever. Lancet, v.352, n.9132, p.971-7. 1998.

Roehrig, J. T. Antigenic structure of flavivirus proteins. Adv Virus Res, v.59, p.141-75. 2003.

Roehrig, J. T., R. A. Bolin, *et al.* Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. Virology, v.246, p.317-328. 1998.

Ruggli, N. e C. M. Rice. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. Adv Virus Res, v.53, p.183-207. 1999.

Sabchareon, A. 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., v.23, p.99-109. 2004.

Sabin, A. B. Research on dengue during World War II. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.1, p.30-50. 1952.

Sakuntabhai, A. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. Nature Genet., v.37, p.507-513. 2005.

Sambrook, J. G., R. Russell, *et al.* Fugu orthologues of human major histocompatibility complex genes: a genome survey. Immunogenetics, v.54, n.6, p.367-80. 2002.

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., G. M. Air, *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature, v.265, n.5596, p.687-95. 1977.

Schlesinger, J. J., M. W. Brandriss, *et al.* Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. J Virol, v.60, n.3, p.1153-5. 1986.

Schlesinger, J. J., M. W. Brandriss, *et al.* Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. J Gen Virol, v.68 (Pt 3), p.853-7. 1987.

Schlesinger, J. J., M. Foltzer, *et al.* The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. Virology, v.192, n.1, p.132-41. 1993.

Seet, B. T., J. B. Johnston, *et al.* Poxviruses and immune evasion. Annu Rev Immunol, v.21, p.377-423. 2003.

Shi, P. Y., M. A. Brinton, *et al.* Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA. Biochemistry, v.35, n.13, p.4222-30. 1996.

Shu, P. Y., L. K. Chen, *et al.* Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. J Med Virol, v.62, n.2, p.224-32. 2000.

Siler, J. F., M. W. Hall, *et al.* Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. Philippine J. Sci., v.29, p.1-304. 1926.

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, E. S., A. Mandokhot, *et al.* Lethality-based selection of recombinant genes in mammalian cells: Application to identifying tumor antigens. Nat Med, v.7, n.8, p.967-972. 2001.
- Smith, G. L. e M. Law. The exit of vaccinia virus from infected cells. Virus Res., v.106, p.189-197. 2004.
- Smith, G. L. e G. Mcfadden. Smallpox: anything to declare? Nature Rev. Immunol., v.2, p.521-528. 2002.
- Smith, G. L., B. J. Murphy, *et al.* Vaccinia virus motility. Annu. Rev. Microbiol., v.57, p.323-342. 2003.
- Sodeik, B. e J. Krijnse-Locker. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? Trends Microbiol, v.10, n.1, p.15-24. 2002.
- Souza, L. J. Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. Braz. J. Infect. Dis., v.8, p.156-163. 2004.
- Stephens, H. A. HLA-A and-B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. Tissue Antigens, v.60, p.309-318. 2002.
- Stephenson, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. Bull. World Health Organ., v.83, p.308-314. 2005.
- Stittelaar, K. J., T. Kuiken, *et al.* Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. Vaccine, v.19, n.27, p.3700-9. 2001.
- Stober, C. B., U. G. Lange, *et al.* Heterologous priming-boosting with DNA and modified vaccinia virus Ankara expressing trypanothione peroxidase promotes long-term memory against *Leishmania major* in susceptible BALB/c Mice. Infect Immun, v.75, n.2, p.852-60. 2007.
- Subramanian, V., S. Shenoy, *et al.* Dengue hemorrhagic fever and fulminant hepatic failure. Dig. Dis. Sci., v.50, p.1146-1147. 2005.
- Sun, W. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.69, p.24-31. 2003.
- Sutter, G. e B. Moss. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.22, p.10847-51. 1992.
- Sutter, G. e C. Staib. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. Curr. Drug Targets Infect. Disord., v.3, p.263-271. 2003.
- Sutter, G., L. S. Wyatt, *et al.* A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. Vaccine, v.12, n.11, p.1032-40. 1994.
- Thepparit, C. e D. R. Smith. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. J Virol, v.78, n.22, p.12647-56. 2004.

- Turner, C., C. Witwer, *et al.* Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. J Gen Virol, v.85, n.Pt 5, p.1113-24. 2004.
- Van Rompay, K. K., J. L. Greenier, *et al.* Immunization of newborn rhesus macaques with simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines prolongs survival after oral challenge with virulent SIVmac251. J Virol, v.77, n.1, p.179-90. 2003.
- Vaughn, D. W. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. J. Infect. Dis., v.181, p.2-9. 2000.
- Vaughn, D. W., C. H. Hoke, Jr., *et al.* Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. Vaccine, v.14, n.4, p.329-36. 1996.
- Venkata Sai, P. M., B. Dev, *et al.* Role of ultrasound in dengue fever. Br. J. Radiol., v.78, p.416-418. 2005.
- Wang, W. K., C. N. Lee, *et al.* Quantitative competitive reverse transcription-PCR for quantification of dengue virus RNA. J Clin Microbiol, v.38, n.9, p.3306-10. 2000.
- Ward, B. M. Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions. J Virol, v.79, n.8, p.4755-63. 2005.
- Ward, G. A., C. K. Stover, *et al.* Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.15, p.6773-7. 1995.
- Webster, D. P., S. Dunachie, *et al.* Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.13, p.4836-41. 2005.
- Westaway, E. G., J. M. Mackenzie, *et al.* Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. J Virol, v.71, n.9, p.6650-61. 1997.
- Weyer, J., C. E. Rupprecht, *et al.* Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. Vaccine, v.25, n.21, p.4213-22. 2007.
- 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.
- Wichmann, O. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. Trop. Med. Int. Health, v.9, p.1022-1029. 2004.

Winkler, G., S. E. Maxwell, *et al.* Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. Virology, v.171, n.1, p.302-5. 1989.

Winkler, G., V. B. Randolph, *et al.* Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. Virology, v.162, n.1, p.187-96. 1988.

Wu, S. F., C. L. Liao, *et al.* Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. Vaccine, v.21, n.25-26, p.3919-29. 2003.

Wyatt, L. S. Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus ankara. Virology, v.251, p.334-342. 1998.

Wyatt, L. S., P. L. Earl, *et al.* Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge. Proc. Natl Acad. Sci. USA, v.101, p.4590-4595. 2004.

Wyatt, L. S., P. L. Earl, *et al.* Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. Vaccine, v.26, n.4, p.486-93. 2008.

Wyatt, L. S., S. T. Shors, *et al.* Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. Vaccine, v.14, n.15, p.1451-8. 1996.

Yocupicio-Monroy, R. M., F. Medina, *et al.* Cellular proteins from human monocytes bind to dengue 4 virus minus-strand 3' untranslated region RNA. J Virol, v.77, n.5, p.3067-76. 2003.

Yokoyama, N., K. Maeda, *et al.* Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use. J Vet Med Sci, v.59, n.5, p.311-22. 1997.

Young, P. R., P. A. Hilditch, *et al.* 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, v.38, n.3, p.1053-7. 2000.

Zhang, Y. M., E. P. Hayes, *et al.* Immunization of mice with dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. J Virol, v.62, n.8, p.3027-31. 1988.

Zhu, Y., P. Rota, *et al.* Evaluation of recombinant vaccinia virus--measles vaccines in infant rhesus macaques with preexisting measles antibody. Virology, v.276, n.1, p.202-13. 2000.