

**ROBERT ANDREATA SANTOS**

**Avaliação de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via  
transcutânea visando à geração de anticorpos neutralizantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2017

**ROBERT ANDREATA SANTOS**

**Avaliação de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via transcutânea visando à geração de anticorpos neutralizantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Original

São Paulo  
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Andreatta Santos, Robert

Avaliação de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via transcutânea visando a geração de anticorpos neutralizantes / Robert Andreatta Santos; orientador Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira. -- São Paulo, 2017.

85 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Transcutânea. 2. Dengue. 3. Vacina. 4. Vírus inativado. 5. Toxina termolábil. I. de Souza Ferreira, Prof. Dr. Luís Carlos, orientador. II. Título.

---

Candidato: Robert Andreato Santos

Titulo da Dissertação/Tese: Avaliação de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via transcutânea visando a geração de anticorpos neutralizantes

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o candidato:

( ) **Aprovado**                      ( ) **Reprovado**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **034** nas fls.**030** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Rita de Cássia Café Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via transcutânea visando a geração de anticorpos neutralizantes*" do qual participam o(s) aluno(s) **Jaime Henrique Amorim, Robert Andreato Santos, Lennon Ramos Pereira, Denicar Lina Nascimento Fabris, Rúbens Prince dos Santos Alves, Sara Araujo Pereira** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **24.03.2015, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 24 de março de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE  
Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl.CEUA.099/2015

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao certificado CEUA nº **034/2015**, do estudo intitulado "*Desenvolvimento de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via transcutânea visando a geração de anticorpos neutralizantes*", aprovado em 24/03/2015, teve sua responsabilidade transferida da Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira para o Prof. Dr. **Luis Carlos de Souza Ferreira**, em função da orientação ter sido efetuada na maior parte pelo pesquisador indicado.

São Paulo, 26 de novembro de 2015.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
Coordenador da CEUA-ICB/USP

**Dedico este trabalho**

**Às minhas famílias de sangue e de vida,  
Por todo amor, carinho, paciência, ânimo  
E apoio incondicional nos momentos difíceis.  
E a Deus,**

**Por ter permitido tudo de maravilhoso até aqui,  
Sempre renovando forças e guiando novas conquistas.**

## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Luís pela orientação, confiança, paciência, exemplo de conduta, dedicação e profissionalismo. Sinto-me grato pela oportunidade de aprendizado e formação com uma pessoa que respeito e admiro. Muito obrigado pelos ensinamentos nos campos da ciência e da vida.

Ao prof. Dr. Jaime Henrique Amorim por abrir os caminhos da ciência para mim, mesmo sem por um bom tempo estar ciente disso. Agradeço o apoio, as dicas, os puxões de orelha e os conhecimentos transmitidos ao longo desta caminhada.

À prof.<sup>a</sup> Rita pelo acolhimento no laboratório, compartilhamento de experiências todo o apoio, incentivo e momentos de risada.

À Dra. Camila Mathias dos Santos pela ajuda, disponibilidade e preocupação desempenhada no início da caminhada. Obrigado por todo o conhecimento compartilhado.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Sílvia Beatriz Boscardin pelo apoio, ensinamento e paciência durante os momentos difíceis do projeto. Meus sinceros agradecimentos.

Ao prof. Dr. Edison Durigon, a Dra. Danielle Oliveira e a todos do LVCM e do LEMB por todos os conhecimentos trocados e a grande parceria durante a epidemia de ZIKV.

Aos técnicos Eduardo Gimenes, José Carlos, Márcio Yamamoto e Carolina Bertelli, por toda a ajuda e amizade, sendo indispensáveis à realização deste projeto. Muito obrigado.

Aos meus companheiros e amigos do LDV, com os quais compartilhei não só o trabalho como a vida. Muito obrigado por tudo. Não chegaria até aqui sem a ajuda de todos vocês! Em especial aos amigos do grupo ZENGUE e aos sofreadores de plantão Lennon, Mônica, Gisela, Hélic, Dalva, Mariana Cintra, Samuel, Aléxia, Tácita, Karine, Patrícia, Mariângela, Rúbens, Bruna, Natiely, Deni, Sara, Ewerton, Marco e Jamile. Contem sempre comigo!

Aos meus amigos que me recebem sempre de braços abertos, dando alegria a cada novo reencontro e não permitindo que a distancia seja empecilho para irmandade.

Aos meus pais Inêz e José Jackson, irmão José Roberto e toda a grande família, os mais importantes da minha vida, que estarão ao meu lado em todos os momentos e que sempre desejam meu sucesso. Todo o trabalho teve altos e baixos, mas sem dúvida vocês foram a força que me ajudou a superar todas as dificuldades. Vocês são a base e o alicerce de tudo o que sou. Nada faria sentido sem vocês e nenhuma alegria tão plena!

À Deus, por permitir a caminhada até aqui. Por ter um olhar especial por mim, me proporcionando aventuras maravilhosas e sempre aliviando as dificuldades da vida.



“Develop an attitude of gratitude, and give thanks for everything that happens to you, knowing that every step forward is a step toward achieving something bigger and better than your current situation.”

*Brian Tracy*

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT-GENE4) no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da GlaxoSmithKline (GSK) e da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo-FAPESP (processo 12/50362-3).

## RESUMO

Santos RA. Avaliação de formulações vacinais anti-dengue administradas pela via transcutânea visando à geração de anticorpos neutralizantes. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas; 2017.

A dengue é uma arbovirose que ameaça mais de metade da população mundial. No momento existem duas vacinas, administradas por vias parenterais, aprovada ou em estudos clínicos, que podem conferir proteção parcial em regiões endêmicas, mas que ainda não estão sendo administradas em larga escala. Por outro lado, a utilização de vias de administração alternativas, como a via transcutânea (TC), pode ter um impacto importante na eficácia vacinal. A entrega de formulações vacinais pela via TC tem como vantagem a administração segura e não invasiva de antígenos vacinais e a composição celular específica da pele, rica em células apresentadoras de antígenos, como as células de Langerhans; O presente estudo avaliou as respostas de anticorpos geradas em camundongos após imunização pela via TC com partículas virais de vírus dengue do sorotipo 2 (DENV2). Os antígenos foram combinados com a toxina termolábil (LT) recombinante, usada como adjuvante vacinal e originalmente produzida por linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Os resultados indicam que a vacina com vírus inativados, administrada pela via TC, mostrou-se imunogênica, porém apenas uma pequena fração dos anticorpos produzidos foi direcionada contra o ectodomínio III (EDIII) da proteína do envelope viral, responsável pela ligação do vírus à célula. A incorporação do adjuvante LT resultou no aumento da produção de anticorpos específicos e na modulação da qualidade das respostas imunológicas. Os anticorpos produzidos após as imunizações apresentaram prevalência da subclasse IgG1, sendo a razão entre IgG1/IgG2a modificada após a introdução do adjuvante LT. Com a adaptação das formulações vacinais administradas e, quando comparada com uma via parenteral, a via TC mostrou-se capaz de induzir níveis semelhantes de proteção e morbidade frente a desafio letal. O presente estudo demonstra que a via TC pode induzir respostas sorológicas vírus-específicas de forma eficiente quando utilizada para a administração de vacinas contra DENV baseadas em partículas virais. Portanto, novos estudos devem ser feitos considerando a TC como uma via de administração alternativa às vias parenterais para a administração de vacinas contra a dengue.

Palavras-chave: Transcutânea. Dengue. Vacina. Vírus inativado. Toxina termolábil.

## ABSTRACT

Santos RA. Evaluation of anti-dengue vaccine formulations administered by the transcutaneous route aiming the generation of neutralizing antibodies. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas; 2017.

Dengue is an arbovirolosis that threatens more than half the world's population. Currently there are two vaccines, both administered via parenteral routes, approved or in clinical trials, which provide partial protection but are not being administered on a large scale. On the other hand, the use of alternative routes of administration, such as the transcutaneous (TC) route, can have a significant impact on vaccine efficacy. Delivery of vaccine formulations via the TC route has the advantage of a safe and non-invasive administration method of vaccine antigens through the skin, that has a cell composition rich in antigen-presenting cells, such as the Langerhans cells. The present study evaluated the antibody responses generated in mice after TC immunization with virus particles of dengue virus serotype 2 (DENV2). The antigens were combined with a recombinant form of the heat-labile toxin (LT), used as a vaccine adjuvant and originally produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains. The results indicate that the inactivated virus vaccine administered via the TC pathway was immunogenic, but only a small fraction of the antibodies were directed against the ectodomain III (EDIII) of the viral envelope protein, which is responsible for the binding of the virus to host cells. Incorporation of LT resulted in increased production of specific antibodies and modulation of the immune responses. Antibodies produced after the immunizations showed a prevalence of the IgG1 subclass, with the IgG1/IgG2a ratio being modified after the introduction of LT. When compared with a parenteral route, the TC route was capable to induce similar protection levels to a lethal challenge. The present study demonstrates that the TC route can efficiently induce virus-specific serological responses when used for administration of DENV vaccines based on viral particles. Further studies should explore different dengue vaccines using the TC route as an alternative to parenteral administration routes.

Keywords: Transcutaneous. Dengue. Vaccine. Inactivated virus. Heat-labile toxin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representações esquemáticas do DENV.....	23
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da imunização pela via TC.....	35
<b>Figura 3</b> - Antígenos e adjuvante incluídos nas análises e vacinas anti-DENV2.....	42
<b>Figura 4</b> - Resposta humoral sistêmica desencadeada pela administração pela via TC de EDIII em associação com LT como adjuvante.....	43
<b>Figura 5</b> - Resposta humoral sistêmica desencadeada após administração pela via TC de partículas inativadas da cepa JHA1 em associação com LT como adjuvante.....	45
<b>Figura 6</b> - Caracterização da resposta humoral de camundongos imunizados pela via TC com partículas de JHA1 inativadas coadministradas ou não com LT.....	47
<b>Figura 7</b> - Soroneutralização <i>in vivo</i> e curva de sobrevivência de camundongos imunizados pela via TC com partículas inativadas da cepa JHA1 em associação ou não com LT e desafiados com a mesma cepa JHA1.....	49
<b>Figura 8</b> - Avaliação da indução do fenômeno de ADE pelas amostras de soros obtidos de animais imunizados pela via TC.....	50
<b>Figura 9</b> - Purificação das partículas virais de JHA1 por cromatografia de troca iônica.....	51
<b>Figura 10</b> - Resposta humoral sistêmica desencadeada pela administração pela via TC de partículas purificadas de JHA1 em associação com LT como adjuvante.....	52
<b>Figura 11</b> - Caracterização da resposta humoral de camundongos imunizados pela via TC com partículas purificadas de JHA1 coadministradas com LT.....	54
<b>Figura 12</b> - Ensaio de soroneutralização <i>in vivo</i> e curva de sobrevivência de camundongos imunizados pela via TC com partículas purificadas da cepa JHA1 e submetidos a desafio letal com a cepa JHA1.....	56
<b>Figura 13</b> - Avaliação dos soros obtidos quanto à indução do fenômeno de ADE.....	57
<b>Figura 14</b> - Respostas humorais sistêmicas desencadeadas após administração pela via TC e ID de partículas de NGC em associação com LT como adjuvante.....	59
<b>Figura 15</b> - Caracterização das respostas humorais de camundongos imunizados pelas vias TC e ID com partículas de NGC, coadministradas ou não, com LT.....	61
<b>Figura 16</b> - Curvas de sobrevivência e morbidade em camundongos imunizados pelas vias TC e ID com partículas de NGC, em associação ou não com LT, após desafio com NGC.....	63

**Figura 17** - Avaliação de possíveis efeitos adversos após a administração das formulações vacinais com NGC pelas vias TC e ID.....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estudos clínicos envolvendo administração de vacinas e fármacos em humanos pela via TC.....	25
<b>Tabela 2</b> - Diferentes tipos de estratégias vacinais baseadas na via TC que empregaram antígenos virais.....	28
<b>Tabela 3</b> - Determinação dos níveis neutralizantes de anticorpos (PRNT <sub>50</sub> ) obtidos após o protocolo vacinal utilizando partículas inativadas de JHA1 pela via TC.....	48
<b>Tabela 4</b> - Determinação in vitro dos níveis neutralizantes de anticorpos (PRNT <sub>50</sub> ) obtidos após o regime vacinal com partículas purificadas de JHA1 após imunização pela via TC.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB5	Uma subunidade A e cinco subunidades B
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i> (Aumento mediado de anticorpo)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de Variância simples)
AMPC	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (monofosfato cíclico de adenosina)
APCs	<i>Antigen presenting cells</i> (Células apresentadoras de antígeno)
CD4 <sup>+</sup>	<i>Cluster of differentiation 4<sup>+</sup></i> (grupo de diferenciação)
CD207	<i>Cluster of differentiation 207</i> (grupo de diferenciação)
CMC	Carboximetilcelulose
CPG	dinucleotídeo de bases citosina (C) e guanina (G) por meio de ligações fosfato (p)
CT	<i>Cholera toxin</i> (toxina colérica)
DL	Dose letal
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% dos animais
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade óptica
DO492	Densidade óptica obtida em comprimento de 492 nm
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> ( <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
GM-1	<i>Monosialotetrahexosylganglioside receptor</i> (receptor monosialotetrahexosilglicosídeo)
GTU	<i>Gene Transport Unit</i> (unidade transportadora de gene)
HBsAg	<i>Hepatitis B virus surface antigen</i> (antígeno de superfície do vírus da hepatite B)



HBV	<i>Hepatitis B virus</i> (vírus da hepatite B)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
HSV	<i>Herpes simplex virus</i> (vírus simples da herpes)
i.c.	Intracraniana
ICB	Instituto de ciências biomédicas
ID	Intradérmica
IFN $\gamma$	<i>Interferon gamma</i> (interferon gama)
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2a de imunoglobulina G
i.m.	Intramuscular
IPTG	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1 thiogalactopyranoside</i> (isopropil $\beta$ -D-1 tiogalactopiranosideo)
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i> (vírus da encefalite japonesa)
L-15	Leibovitz 15
LB	Luria bertani
LCs	<i>Langerhans cells</i> (células de Langerhans)
LDH	Lactato desidrogenase
LDV	Laboratório de desenvolvimento de vacinas
LT	<i>Heat-labile toxin</i> (toxina termolábil)
MDP	<i>Muramyl dipeptide</i> (muramildipeptídeo)
MEM	<i>Minimum essential media</i> (Meio Mínimo Essencial)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (multiplicidade de infecção)
ND	Não determinado

NGC	<i>New guinea C</i> (Nova Guiné C)
OPD	<i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i> (dicloridrato de o-fenilenodiamina)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PBST	PBS + 0,05% de TWEEN 20%
PRNT	<i>Plaque reduction neutralization test</i> (teste de neutralização por redução de placa)
PRNT <sub>50</sub>	PRNT com redução de 50% das placas
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (meio Roswell Park Memorial Institute)
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i> (vírus sincicial respiratório)
SBCAL	Sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (dodecil-sulfato de sódio em eletroforese de gel de poliacrilamida)
SFB	Soro fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TC	Transcutânea
TH1	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 1)
TH2	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 2)
UFP	Unidade formadora de placa
USP	Universidade de São Paulo
VC	Volume de coluna
YFV	<i>Yellow fever virus</i> (vírus da febre amarela)
ZIKV	<i>Zika virus</i> (vírus da zika)

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
kB	kilobases
°C	Grau Celsius
µg/ml	Micrograma/mililitro
RPM	Rotação por minuto
nm	Nanômetros
mM	Milimolar
h	Horas
min	Minutos
g	Força gravitacional
pH	Potencial de hidrogênio
L	Litros
ml/min	Mililitros/minutos
µm	Micrômetros
µl	Microlitros
µg	Microgramas
n	Número por grupo
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
ug/poço	Micrograma/poço
:	Diluição
M	Molar
x	Multiplicação
mg/kg	Miligramas/Quilogramas
µl/poço	Microlitros/poço
p	Probabilidade de efeito
kDa	Kilodaltons
µg/dose	Microgramas/dose

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 OBJETIVOS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIOS</b> .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1 Ética no uso de Animais.....	31
3.2 Camundongos.....	31
3.3 Linhagens celulares e cepas virais.....	31
3.4 Expressão e purificação da proteína recombinante EDIII de DENV2.....	32
3.5 Expressão e purificação da LT recombinante.....	33
3.6 Purificação viral.....	33
3.7 Avaliação da infectividade das partículas virais purificadas.....	33
3.8 Ensaio de Imunização.....	34
3.8.1 Imunização pela via TC.....	34
3.8.2 Imunização pela via intradérmica (ID).....	36
3.9 Análise da resposta imunológica humoral.....	36
3.10 Teste de soroneutralização <i>in vitro</i> – PRNT <sub>50</sub> .....	37
3.11 Teste de soroneutralização <i>in vivo</i> .....	38
3.12 Ensaio para a avaliação do fenômeno de ADE.....	38
3.13 Desafios letais (DL) com o isolado e a cepa NGC.....	39
3.14 Avaliação de possíveis efeitos deletérios associados às imunizações.....	40
3.15 Análises estatísticas.....	40
<b>4 RESULTADOS</b> .....	41
4.1 Expressão dos antígenos vacinais e adjuvante.....	41
4.2 Indução de resposta humoral específica contra partículas de JHA1 em camundongos submetidos à imunização pela via TC.....	42
4.3 Caracterização da resposta humoral de camundongos submetidos à imunização pela via TC com partículas virais de JHA1.....	45
4.4 Avaliação da imunidade protetora em camundongos submetidos à imunização pela via TC com partículas de JHA1.....	47
4.5 Purificação de partículas virais do isolado JHA1.....	51

4.6	Indução de resposta humoral específica contra partículas purificadas de JHA1 em camundongos submetidos à imunização pela via TC.....	52
4.7	Caracterização da resposta humoral de camundongos submetidos à imunização pela TC com partículas virais de JHA1 purificadas.....	53
4.8	Avaliação da imunidade protetora em camundongos submetidos à imunização pela via TC com partículas de JHA1 purificadas.....	54
4.9	Indução de respostas contendo anticorpos séricos específicos contra partículas purificadas de DENV2 NGC em camundongos submetidos à imunização pelas vias TC e ID.....	57
4.10	Caracterização da resposta humoral de camundongos submetidos à imunização pelas vias TC e ID com partículas virais de NGC.....	59
4.11	Avaliação da imunidade protetora conferida a camundongos submetidos à imunização pelas TC ou ID com partículas virais da cepa NGC.....	61
4.12	Avaliação de possíveis efeitos adversos decorrentes das imunizações pelas via TC ou ID com partículas de NGC.....	63
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICES – Artigos Periódicos e Patente.....</b>	<b>79</b>
<b>A</b>	<b>- Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in a mouse encephalitis model.....</b>	<b>80</b>
<b>B</b>	<b>- Production of a recombinant Dengue virus 2 NS5 protein and the potential use as a vaccine antigen. Clinical and Vaccine Immunology.....</b>	<b>81</b>
<b>C</b>	<b>- Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection.....</b>	<b>82</b>
<b>D</b>	<b>- SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, ANTÍGENO RECOMBINANTE, KITS DE DIAGNÓSTICO, E USOS DOS MESMOS.....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A presença de doenças virais acometendo humanos é datada desde a antiguidade, porém o termo arbovírus somente passou a ser empregado em 1881, quando o Dr. Carlos Finlay propôs a transmissão do vírus da febre amarela (YFV) por mosquitos (1). Dentre esses vetores destacam-se os mosquitos do gênero *Aedes*, em especial o *Aedes aegypti*, responsáveis pela transmissão de uma das arboviroses de maior importância no cenário nacional e mundial, causada pelo vírus da dengue (DENV) (2). Uma característica marcante da dengue é a subnotificação de casos, o que normalmente “esconde” boa parte das epidemias, já que uma grande parte dos infectados é assintomática ou desenvolve quadros leves de sintomas que não são suficientes para levá-los a procurar ajuda médica (3).

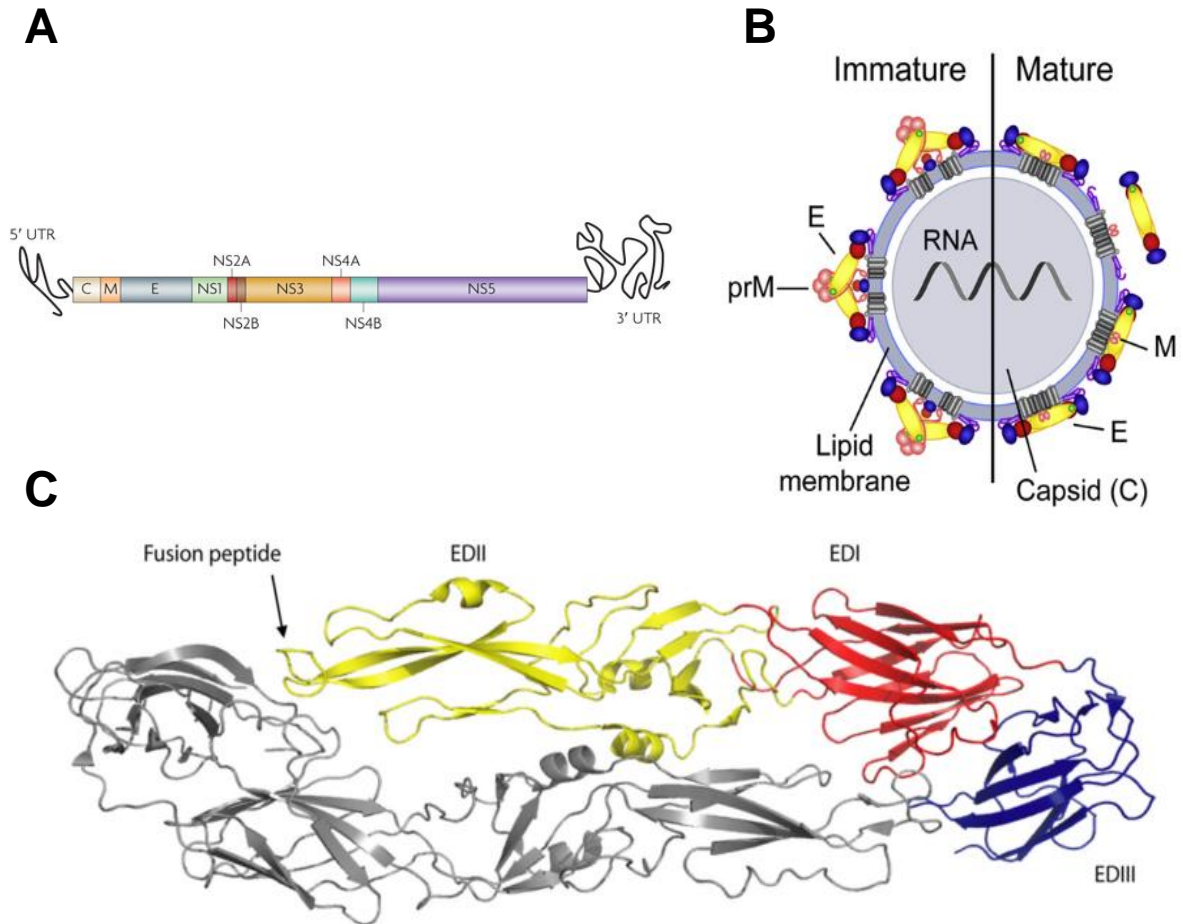
A primeira epidemia de DENV no Brasil foi reportada em 1845, muito provavelmente decorrente da epidemia asiática e das regiões do pacífico em 1779-1780 associada com mudanças geográficas que permitiram a expansão do vetor globalmente (3). Atualmente a dengue é uma de suas representantes de maior relevância econômica e epidemiológica, sendo que o Brasil apresentou a quinta maior incidência na América latina entre 1995 e 2009, e a maior incidência na América do Sul (juntamente com o Uruguai) em 2014, com cerca de 294 casos a cada 100.000 habitantes (4). No cenário global estima-se 390 milhões de infecções por ano, sendo que destas aproximadamente 96 milhões apresentam algum grau de severidade que evoluem para cerca de 30 mil mortes anuais (5–7).

A sintomatologia mostra-se decorrente de uma resposta imunológica anômala, a qual envolve múltiplos aspectos como imunocomplexos, leucócitos e citocinas que podem culminar em manifestações clínicas que variam desde sintomas brandos como a febre da dengue a sintomas severos que podem levar à morte (dengue severa), previamente conhecidos como síndrome de choque da dengue e/ou febre hemorrágica da dengue (8–10). Tais infecções concentram-se nas faixas tropicais e subtropicais do globo, representando a abrangência da presença dos vetores responsáveis por sua transmissão (10).

O DENV é pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, no qual também estão classificadas outras importantes arboviroses como a febre amarela e a encefalite japonesa. No ciclo urbano, o DENV circula na forma de quatro tipos imunologicamente distinguíveis

(sorotipos): DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que apresentam aproximadamente 30% de divergência na sequência de nucleotídeos dos seus genomas (11–15). Tal espécie viral apresenta vírions esféricos e envelopados possuidores de RNA fita simples de orientação positiva como material genético (16). O genoma viral codifica uma poliproteína que sofre clivagem em dez proteínas distintas, dentre as quais sete não participam da composição da partícula viral, sendo caracterizadas como não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) e três compõem as partículas formadas, sendo caracterizadas como estruturais (E, prM e C) (FIG 1A). O envelope de um vírion maduro é em sua grande maioria composto pela proteína do envelope (E), mas também possui em sua composição a proteína M – resultante da clivagem da proteína precursora de membrana pela proteína furina (17) (FIG 1B).

A proteína E apresenta-se em dímeros no envelope viral e pode ser subdividida em três ectodomínios que possuem funções distintas durante o processo de adsorção e entrada em células infectadas (FIG 1C), destacando-se o ectodomínio III (EDIII), o qual é responsável pela ligação inicial do vírus aos receptores celulares. Devido ao fato do DENV infectar uma grande variedade de células, tanto de mosquitos quanto de humanos, a EDIII reconhece moléculas ubíquas nas membranas de superfície, como heparan sulfato e outras moléculas que medeiam a internalização em células hospedeiras (18). De forma específica, as partículas de DENV se ligam à proteína de choque térmico 70 em células de mosquito (18,19), ICAM3 em células dendríticas (DCs) imaturas, integrina na maioria das células de mamífero e resíduos de manose expressos na superfície de macrófagos (18,20). Tais características incentivam o extensivo estudo da EDIII como possível alvo de bloqueio da infecção viral em formulações vacinais (21,22).



**Figura 1 - Representações esquemáticas do DENV.** (A) Genoma de RNA de fita simples, com orientação positiva, do DENV. A fita de RNA possui aproximadamente 11 kB e que codifica 10 proteínas, sendo três estruturais: Capsídeo (C), Membrana (M) e Envelope (E) e sete não estruturais (NS): NS1, NS2 A e B, NS3, NS4 A e B e NS5. (B) Modificação estrutural no vírion após a clivagem da proteína precursora de membrana (prM) em proteína M pela enzima furina, tornando a partícula madura. (C) Organização da proteína E em dímeros após a maturação da partícula viral e representação dos três diferentes domínios presentes na proteína: Domínio 1 (EDI), domínio 2 (EDII) e domínio 3 (EDIII). Referências modificadas: Wahala, 2012; Guzman, 2010; Heinz 2012 (21,108,109).

A busca por formulações vacinais que produzam respostas eficientes contra uma infecção gerada por partículas virais viáveis do DENV já foi feita com a utilização de diversos tipos de antígeno alvo (8,23). As principais abordagens vacinais em desenvolvimento incluem vírus vivos atenuados e vacinas baseadas em vírus quiméricos atenuados recombinantes e apresentam-se em estudos de fase clínica e liberadas para uso em humanos, respectivamente. Contudo, o desenvolvimento de tais formulações vacinais envolve necessidades logísticas e operacionais que elevam o custo de produção, armazenamento e distribuição dos lotes, o que dificultam a utilização em locais de difícil acesso. Outro ponto importante consiste na evasão da vacinação por parte de indivíduos que temem procedimentos invasivos (injeções), bem como os riscos de



acidentes e transmissão de agentes infecciosos a que a manipulação desses materiais perfurocortantes está sujeita. Tais fatos abrem caminho para estudos que tem por objetivo a utilização de diferentes vias de inoculação vacinal, destacando-se a vias de administração não invasivas, como a via transcutânea (TC).

A epiderme representa a porção mais externa da pele, consiste no sítio de inoculação TC, e pode ser dividida em duas partes. O *stratum corneum* consiste na porção em contato direto com o meio externo, possuindo desta forma propriedades únicas de impermeabilidade que o tornam fundamental na proteção contra agentes invasores (24,25). A composição do *stratum corneum* consiste de corneócitos mortos ligados por desmossomos e complexos de proteínas celulares. Logo abaixo do *stratum corneum* localiza-se a epiderme viável, composta principalmente de queratinócitos e abundantes quantidades de células dendríticas como melanócitos e Células de Langerhans (LCs) (26).

Apesar de sua grande extensão a pele pode ser considerada um sítio ativo e eficaz na proteção do organismo. A função de imunidade inata é feita principalmente pelos queratinócitos presentes na epiderme, os quais possuem capacidade de produzir citocinas, quimiocinas e fatores antimicrobianos responsáveis pelo controle de invasões e recrutamento de células do sistema imunológico para o local, de forma a erradicar o agente causador de alerta (24,26). As células dendríticas imaturas presentes na camada basal da epiderme e na derme formam uma rede que cobre a extensão da pele e possuem ação crítica na iniciação de respostas contra organismos invasores (27). Tais células podem sofrer ativação por meio da detecção de seres estranhos ou estimulação feita pelas células do tecido e compõem o elo de ligação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. As LCs diferenciam-se de outras células dendríticas pela sua capacidade de expressar langerinas (CD207) e são capazes de reconhecer oligossacarídeos e formar grânulos visíveis no citoplasma celular (grânulos de Birbeck) (28). O reconhecimento das LCs por células do sistema imunológico após sua migração para órgãos linfóides pode ser feito por antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I e II, o que permite o desenvolvimento de respostas completas, com a predominância de anticorpos ou de respostas celulares citotóxicas. A via TC tem sido explorada como alternativa para administração de vacinas e drogas em seres humanos, como demonstram uma série de testes clínicos conduzidos ou andamento em diversas partes do mundo (Tabela 1).

**Tabela 1 - Estudos clínicos envolvendo administração de vacinas e fármacos em humanos pela via TC.**

Estado	Nome do estudo	Condição	Intervenção
Desconhecida	Imunogenicidade de três HIV GTU® MultiHIV imunizações de DNA administradas via rotas i.m., ID e TC	HIV	GTU®- multi HIV clado B
Finalizado	Estudo de segurança comparando a administração de vacinas pela via TC com a via i.m.	Voluntários saudáveis; HIV	Administrações TC e i.m.
Finalizado	Imunização transcutânea com vetor vicinal de <i>Listeria Monocytogenes</i>	Voluntários saudáveis	BMB72 (actA/plcB-deleted <i>Listeria monocytogenes</i> expressando nucleoproteína de influenza A)
Finalizado	Ensaio logístico de ETEC	Diarreia	Toxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> (LT); Placebo
Finalizado	Vias de imunização e respostas imunológicas contra Influenza	Influenza	INTANZA® 15; Vaxigrip®; INTANZA® 15 T
Finalizado	A segurança e a imunogenicidade da vacina DNA-GTU administrada em pacientes infectados por HIV em regime ART vs placebo	HIV	Vacina GTU®-MultiHIV Clado B; Cloreto de sódio
Finalizado	Terapia vicinal e resiquimod no tratamento de pacientes com estágio II, III ou IV de melanoma completamente removido cirurgicamente	Melanoma (pele)	Resiquimod
Finalizado	Estudo de segurança de vacina recombinante para prevenção de diarreia provocada por ETEC	Infecção por <i>Escherichia Coli</i>	Adesina fimbrial recombinante dscCfaE; LT modificada LTR192G
Finalizado com resultados	Estudo de autoadministração de adesivo vicinal de LT	Prevenção da diarreia do viajante	LT
Ativo, sem recrutamento	Estudo de segurança de vacina quimérica para prevenção de diarreia provocada por ETEC	Infecção por <i>Escherichia Coli</i>	Adesina fimbrial recombinante dsc14CfaE-sCTA2/LTB5; dscCfaE; LT modificada LTR192G
Finalizado com resultados	Processo automatizado da diarreia do viajante	Prevenção da diarreia do viajante	LT; Placebo
Finalizado com resultados	Estudo de segurança estratificado por gênero e estudo de imunogenicidade	Diarreia	LT; Placebo

**Tabela 1 - Estudos clínicos envolvendo administração de vacinas e fármacos em humanos pela via TC.**

Finalizado com resultados	Respostas imunológicas da vacinação contra YFV em adultos com dermatite atópica	Dermatite atópica	Vacina da febre amarela (YFV-17D); YFV-17D Placebo
Finalizado	Estudo de imunoterapia específica contra alérgeno com administração epicutânea em alérgicos a pólen de grama	Rinoconjuntivite alérgica	Adesivo; Adesivo placebo

O vencimento da barreira inicial imposta pelo *stratum corneum* é um importante fator a ser considerado em imunizações pela via TC e por isso foi amplamente estudado no âmbito da criação de novas tecnologias que permitam a passagem dos antígenos alvo e entrega ao sistema imunológico. Diversas alternativas foram desenvolvidas para tal propósito e envolvem o emprego do rompimento ou permeabilização da camada superficial de células, a utilização de métodos de entrega de antígenos ou microagulhas. O rompimento das camadas superficiais de células pode ser feito por abrasão superficial e consiste no principal meio de entrada de organismos estranhos, podendo ser utilizado para ultrapassar a barreira do *stratum corneum* (29). A permeabilização pode ser feita com a utilização de adesivos contendo antígenos, os quais ficam expostos a longos períodos no tecido (30). Os métodos de entrega de antígenos possuem variações quanto aos modelos utilizados, sendo já caracterizados para o uso em imunizações pela via TC sistemas baseados em lipossomas e vetores virais, como os adenovírus e os vírus ankara (31,32). A criação das microagulhas foi proposta como forma para promover a ruptura local das camadas iniciais da pele o suficiente para não causarem dor e ao mesmo tempo apresentarem antígenos aderidos às camadas da epiderme que contenham células do sistema imunológico (32,33).

Dentre os candidatos vacinais estudados nas imunizações pela via TC, inicialmente predominavam os antígenos bacterianos, o que permitiu o estabelecimento da via como promissora na geração de respostas imunológicas. Além disto, diversos estudos vacinais têm explorado a utilização de partículas virais, e seus derivados, aplicados via TC utilizando diferentes métodos para a transposição da barreira representada pelo *stratum corneum* na tentativa de apresentar o antígeno com uma melhor qualidade e eficiência para o sistema imunológico (29–35).

Os vírus mostraram-se promissores como desencadeadores de respostas imunológicas devido ao tamanho, apresentando grande facilidade de apresentação ao sistema imunológico (29,36).

Vacinas de DNA administradas de forma tópica induziram respostas de anticorpos e células produtoras de IFN- $\gamma$  contra o vírus sincicial respiratório (RSV) (37). A proteína hexon (principal proteína de capsídeo em adenovírus) induziu proteção em camundongos imunizados com adesivos vacinas (38). Partículas virais inteiras inativadas ou proteínas recombinantes do vírus simples herpes (HSV) geraram respostas humorais no soro e nas fezes e fortes respostas celulares, respectivamente, em camundongos após vacinação via TC (35). Diversas plataformas de administração obtiveram resultados positivos contra Influenza quando utilizada a via TC, o que resultou na realização de testes clínicos (Tabelas 1, 2). Antígenos do vírus Hepatite B (HBV) mostraram-se promissores na geração de respostas imunológicas em diferentes estratégias de apresentação do antígeno pela via TC (Tabela 2). Vacina de DNA contra o vírus da Encefalite Japonesa (JEV) promoveu a geração de resposta de anticorpos protetores contra a infecção após administração tópica (39). Contudo, mesmo com a utilização de diferentes métodos para entrega antigênica pela via TC, foi confirmada a necessidade de utilização de adjuvantes vacinais para obtenção de uma resposta imunológica mais robusta e direcionada (40).

**Tabela 2 - Diferentes tipos de estratégias vacinais baseadas na via TC que empregaram antígenos virais.**

Candidato Vacinal	Estratégia	Referências
RSV	DNA total encapsulado com transferossomo	(37)
Adenovírus	Adenovírus-luciferase em almofada de hidrogel	(38)
HSV	Vírus inteiro ou proteínas virais coadministrados com Toxina de Cólera (CT)	(35)
Influenza	Vírus inteiro inativado coadministrado com CT	(41)
	Vacina de DNA codificando proteína M Coadministrada com CPG ou CT	(42)
	Vacina de DNA codificando proteína M em diferentes formulações com ou sem tratamento da pele ou adição de lipossomas	(43)
	Peptídeo de Influenza direcionado para células T auxiliares coadministrado com CT	(44)
	Glicoconjugado com reatividade cruzada de <i>Haemophilus influenzae b</i> coadministrado com diferentes LT e CT	(45)
	Vacina Agripal contendo proteínas hemaglutinina e neuraminidase	(46)
	Comparação de vacinas tetravalentes inativadas de Influenza	(47)
HBV	Associação do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) juntamente com lipossomas	(48)
	Plasmídeos fluorescentes expressando HBsAg encapsulados em lipossomas	(49)
	Plasmídeo codificando HBsAg complexado com lipossomas catiônicos	(50)
	Comparação de ethosomas e lipossomas contendo HBsAg encapsulado	(51)
	HBsAg encapsulado em lipossomas coadministrados com MDP	(52)
	HBsAg encapsulados em niossomas	(53)
JEV	Plasmídeos codificando as proteínas M e E encapsulados em lipossomas catiônicos	(39)

No contexto das imunizações pela via TC, as toxinas termolábeis (LTs) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) representam uma alternativa promissora e eficaz na potencialização da resposta direcionada ao antígeno alvo. Estas são proteínas heterohexaméricas que consistem de uma subunidade A e cinco subunidades B (AB<sub>5</sub>) e que apresentam grande efeito adjuvante, tanto no que se refere às respostas humorais quanto celulares, para antígenos administrados por via parenteral ou de mucosa (54). O efeito adjuvante das LTs deve-se à capacidade da subunidade B em ligar-se a receptores GM-1 presentes nas células epiteliais, de forma a facilitar sua internalização. Por processos ainda não muito bem conhecidos essa internalização leva a um aumento de AMP cíclico (AMPc) no citoplasma das células, uma reação associada à subunidade A, que resulta na produção de citocinas pró inflamatórias (26,29). Dessa forma um ambiente propício ao aumento das respostas direcionadas aos antígenos alvo é formado.

Diante de todas as alternativas apresentadas, combinações de antígenos derivados do DENV em combinação com LT, em formulações vacinais administradas pela via TC, podem representar uma alternativa promissora para a administração de vacinas para a prevenção da dengue.

## 2 OBJETIVOS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIOS

Foram estabelecidos como metas experimentais as seguintes etapas de trabalho:

- A. Obter estoques virais por meio da propagação *in vitro* em células eucarióticas e adaptar o método de inativação térmica dos vírus de forma a torná-los aptos a compor formulações vacinais.
- B. Expressar e purificar a LT utilizando sistema de expressão baseado em *E.coli* e purificação por meio de cromatografia de afinidade com D-galactose imobilizada.
- C. Expressar e purificar uma forma recombinante do domínio III da proteína do envelope viral (EDIII) utilizando sistema de expressão baseado em *E.coli* e purificação por meio de cromatografia de afinidade em coluna de níquel.
- D. Realizar ensaios de imunização pela via TC de camundongos Balb/C utilizando formulações compostas por partículas virais inativadas ou a proteína EDIII coadministradas com LT e caracterizar as respostas imunológicas específicas induzidas, avaliando os perfis de produção de anticorpos e ativação de linfócitos T.
- E. Avaliar possíveis efeitos colaterais gerados pela imunização.
- F. Avaliar a eficácia protetora das formulações vacinais testadas perante um desafio letal, pela via intracranial (i.c.), com a cepa de DENV2 JHA1.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Ética no uso de Animais

Todos os ensaios com animais foram realizados de acordo com os princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), e os protocolos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (Nº: 34, folha 030, livro 03, 2015).

#### 3.2 Camundongos

O modelo murino escolhido para o estudo foi a linhagem de camundongos BALB/c. Camundongos machos com idade entre 6 e 8 semanas foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Parasitologia do ICB da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram considerados como livre de patógenos devido à monitorização rotineira feita pelo biotério.

#### 3.3 Linhagens celulares e cepas virais

Células C6/36 oriundas de *Aedes albopictus* foram crescidas livres da adição de CO<sub>2</sub>, em meio Leibovitz (L-15) (L5520, Sigma Aldrich) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil), a 28 °C, e usadas para as propagações virais. Células VERO, oriundas de rim de *Cercopithecus aethiops*, foram crescidas em meio Minimum Essential Medium (MEM) (M0644, Sigma Aldrich) suplementado com 5% de SFB, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, e utilizadas para os ensaios de formação de placas (itens 3.7 e 3.10). A linhagem celular U937, derivada de linfoblasto de pulmão humano, foi crescida em meio Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) (1640, Vitrocell, Brasil) suplementado com L-glutamina e 5% de SFB, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, e usada em ensaios para a avaliação do aumento de infecção mediada por anticorpos (item 3.12).

A cepa de DENV2 JHA1 foi previamente isolada de humano infectado e caracterizada como naturalmente infectante e letal a camundongos imunocompetentes após administração i.c. (55). A cepa adaptada de DENV2 New Guinea C (NGC), previamente caracterizada (56), foi gentilmente



cedida pela Dra. Laura Gil (FIOCRUZ Pernambuco), sendo também letal em desafio de animais imunocompetentes pela via i.c.. Estoques celulares e de vírus infectivos foram mantidos a -80 °C. Para uso vacinal, as partículas virais foram inativadas termicamente por manutenção das mesmas a -20 °C por pelo menos 30 dias, sendo feito o acompanhamento de viabilidade por meio de ensaios de titulação viral (item 3.7).

### 3.4 Expressão e purificação da proteína recombinante EDIII de DENV2

A produção do domínio EDIII de DENV2 baseada na sequência da cepa viral de NGC foi padronizada previamente no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) do ICB da USP (dados não publicados). O protocolo de purificação consistiu na cultura de bactérias *E.coli* previamente transfectadas com o plasmídeo do tipo pET28a(+) codificando a sequência da EDIII. A cultura foi crescida em meio Luria Bertani (LB) contendo 50 µg/ml de canamicina, com condição de aeração de 1/3 do volume do recipiente utilizado, em uma temperatura de 37 °C, sob constante agitação de 200 rotações por minuto (RPM) até a fase de crescimento exponencial bacteriano (valores de absorvância na faixa de 0,5 a 0,6) com medido pela densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 600 nm.

Durante a fase de crescimento exponencial foi adicionado ao meio 0,5 mM de IPTG (Sigma) e mantidas as condições de cultura por 4 h, após os quais as células foram centrifugadas por 30 min a uma rotação de 10,000 g, ressuspensas no tampão A (100 mM de fosfato de sódio e 500 mM de NaCl, em pH 6,5) e lisadas por sonicação. Após uma nova centrifugação o sobrenadante foi coletado e o lisado sólido contendo corpúsculos de inclusão foi ressuspendido no tampão B (100 mM de fosfato de sódio, 500 mM de NaCl e 8 M de uréia, em pH 6,5) para solubilização, por 18 h a 4 °C. O extrato foi então centrifugado e o sobrenadante contendo proteínas foi submetido ao processo de renaturação da proteína por diluição direta em 2 L de tampão A, em um fluxo de 0,25 ml/min. Após a renaturação, a amostra foi centrifugada para retirada de possíveis complexos precipitados e filtrada em aparato de filtração utilizando filtros de acetato de celulose com poros de 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech, Germany). A purificação da EDIII foi realizada por meio de cromatografia de afinidade em coluna Histrap™ FF (GEHealthcare Life Sciences). A proteína purificada foi analisada por SDS-PAGE, quantificada e armazenada a -20 °C.

### 3.5 Expressão e purificação da LT recombinante

A LT foi purificada a partir de uma linhagem bacteriana de *E.coli* BL21 (DE3) transformada com o vetor pBSKPS- codificando a LT originalmente expressa por linhagens de ETEC, conforme descrito anteriormente (54). As condições de cultivo utilizadas foram semelhantes às condições da EDIII, sendo os sobrenadantes celulares obtidos após o processo de sonicação e filtração em aparato de filtração utilizando filtros de acetato de celulose contendo poros de 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech, Germany). Posteriormente, a purificação da LT foi realizada por meio de cromatografia de afinidade com coluna contendo D-galactose imobilizada (Pierce). A proteína purificada foi analisada por SDS-PAGE, quantificada e armazenada a -20 °C.

### 3.6 Purificação viral

A purificação de vírions da cepa JHA1 foi realizada por cromatografia de troca iônica com utilização do cromatógrafo AKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando coluna de troca aniônica HiTrap<sup>TM</sup> ANX (high sub) de 1 ml previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 60mM (pH 7,2). Dez mililitros de sobrenadante de cultura celular infectada (célula VERO infectada previamente por 7 dias com o JHA1 em multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1) foram utilizados para purificação do vírus, sendo o procedimento de eluição realizado mediante a aplicação de um gradiente linear de 60mM até 600 mM de fosfato de sódio (pH 7,2) em 15 volumes de coluna (VC). Aliquotas das frações eluídas (10µl) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). As frações contendo vírus foram reunidas, acrescidas de 5% de glicerol estéril e estocadas à -80 °C para posterior utilização.

### 3.7 Avaliação da infectividade das partículas virais purificadas

A avaliação da infectividade das partículas virais após a purificação foi feita pelo método de titulação viral com a observação de placas de lise virais, conforme descrito anteriormente (57). Primeiramente, 250.000 células VERO foram adicionadas por poço em placas de 6 poços (Jet BIOFIL, China) e acondicionadas em meio MEM suplementado com 2% de SFB. Estoques virais foram diluídos de forma seriada em meio MEM, num volume final de 1000 µl, e passagem de

100 µl entre as diluições (diluição de  $\log_{10}$ ). O meio de cultura dos poços foi então substituído pelas diluições, em volume final de 200 µl, durante 1 h a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, com agitação a cada 15 min. Após a adsorção as células foram mantidas por 7 dias em 1.000 µl de meio MEM contendo carboximetilcellose (CMC) a 1% e suplementado com 2% de SFB. Após esse período, o meio de cultura foi removido seguido por fixação celular por 15 min, utilizando-se solução de formaldeído 4% diluído em água destilada. Posteriormente os poços foram novamente lavados e corados com violeta genciana (LABORCLIN, Brasil) por 15 min. O corante foi então retirado e as placas de lise formadas foram contadas para determinação do título viral em unidades formadoras de placa (UFP).

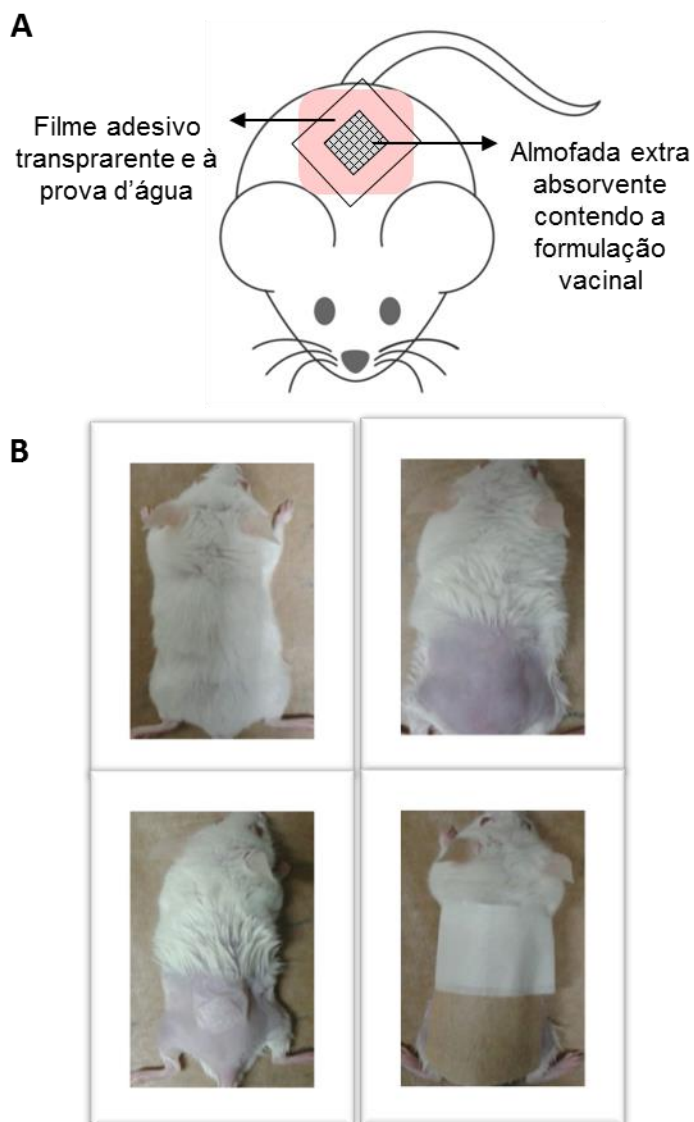
### 3.8 Ensaio de Imunização

#### 3.8.1 Imunização pela via TC

Camundongos machos da linhagem BALB/c, com idade de 6 a 8 semanas, foram imunizados pela via TC com as seguintes formulações vacinais: A) 10 µg de DENV2 (n=10); B) 10 µg de DENV2 coadministrado com 10 µg da LT (n=10); C) solução salina apirogênica (n=5). Todas as formulações vacinais foram preparadas com a adição de 40 µg/ml de polimixina B. O regime vacinal consistiu de três doses com intervalos de duas semanas entre as mesmas (dias 0, 14 e 28), sendo as colheitas de sangue realizadas pelo plexo submandibular um dia antes de cada imunização e 13 dias após a última imunização (dias -1, 13, 27, 41).

Para realização do procedimento de imunização pela via TC, os dorsos dos animais foram previamente depilados com auxílio de aparelho eléctrico Basic Precision WAHL (USA), e remoção final dos pêlos com creme depilatório. Com a pele exposta, realizou-se procedimento de abrasão do *stratum corneum* (área aproximada de 2.5 cm<sup>2</sup>) utilizando lixa fina Smooth Legs. Para imunização, adesivos foram preparados com película adesiva impermeável de dupla face (Opsite, Flexgrid) com área de aproximadamente 2.5 cm<sup>2</sup> à qual foi fixada, em sua porção central, com um retalho de gaze estéril absorvente (~1 cm<sup>2</sup>) (FIG 2A). As formulações vacinais foram gotejadas sobre a gaze dos adesivos, sendo o adesivo fixado sobre o dorso tratado dos animais juntamente com proteções de papel. Após um período de 24 h, os adesivos foram removidos e o

dorso dos animais foi lavado com água destilada em abundância. As etapas de imunização estão resumidas na FIG 2B, conforme descrito anteriormente (58).



**Figura 2 - Representação esquemática da imunização pela via TC.** (A) Esquema evidenciando a composição dos adesivos utilizados para a entrega dos antígenos vacinais ao sistema imunológico pela via TC. (B) Fotos demonstrando as etapas da imunização pela via TC em camundongos BALB/c. Primeiramente foi feita a depilação do dorso dos animais, seguida pelo tratamento da pele, administração da vacina e proteção do adesivo por 24 h. Referência: Santos, 2014 (58).

### 3.8.2 Imunização pela via intradérmica (ID)

Camundongos machos da linhagem BALB/c, com idade de 6 a 8 semanas, foram imunizados pela via ID com as seguintes formulações vacinais: A) 10 µg do vírus NGC (n=5); B) 10 µg do vírus NGC coadministrado com 10 µg de LT (n=5); C) 50 µg do vírus NGC (n=5); D) 50 µg do vírus NGC coadministrado com 10 µg de LT; E) solução salina apirogênica (n=5). O procedimento de imunização consistiu na administração de 30 µl da formulação vacinal na região dorsal dos camundongos, sem a necessidade de aplicação de anestésicos. Todas as formulações vacinais foram preparadas com a adição de 40 µg/ml de polimixina B. O regime vacinal consistiu de três doses com intervalos de duas semanas entre as mesmas (dias 0, 14 e 28), sendo as colheitas de sangue realizadas pelo plexo submandibular um dia antes de cada imunização e 13 dias após a última imunização (dias -1, 13, 27, 41).

### 3.9 Análise da resposta imunológica humoral

Os soros dos camundongos foram testados por ensaio imunoenzimático (ELISA) quanto à presença de anticorpos específicos para vírion e EDIII de DENV2, conforme descrito anteriormente (59). Poços de placas MaxiSorp (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizados com 100 µl de tampão salino-fosfato (PBS) contendo 1,4 µg/poço de partículas virais de DENV2 inativadas ou purificadas ou 1 µg/poço de proteína EDIII, por um período de 16-18 h, a 4 °C.

A sensibilização foi seguida por etapa bloqueadora utilizando 200 µl por poço de solução de gelatina a 3% diluída em PBS, a 37 °C, por um período de 2 h. Após a incubação, a solução de bloqueio foi removida e as amostras de soro foram diluídas serialmente nos poços com volume final de 100 µl, em solução de gelatina a 1% diluída em PBS-Tween 0,05% (PBST), e incubadas a 37 °C durante 1,5 h. Os poços foram lavados por 3 vezes com PBST e tratados com 100 µl de solução de anticorpos de cabra anti-IgG, anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongos (nas diluições finais de anti-IgG 1: 6000, anti-IgG1 de 1: 3000 e anti-IgG2a de 1: 2000) conjugados com peroxidase de rábano (Sigma Aldrich), em mesma solução em que os soros foram diluídos, e mantidos a 37 °C, durante 1,5 h. Os poços foram novamente lavados por 3 vezes com solução de PBST e as reações foram reveladas com a adição de 100 µl de tampão citrato-fosfato em pH 5.8 acrescido de ortho-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As reações foram paradas

após 15 min com a adição 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1 M. Os valores de concentração dos anticorpos foram calculados por comparação com uma curva padrão de referência de IgG em concentrações definidas adicionadas a cada placa.

A avaliação da integridade estrutural dos epítomos no reconhecimento de anticorpos gerados durante as imunizações foi feita por ELISA com a utilização de antígenos fervidos a 100 °C durante 10 min. Para uma correlação com a proteína não desnaturada os soros foram avaliados nas mesmas diluições para os dois antígenos, com o intuito de se observar diferenças na reatividade. Para esse ensaio foram utilizadas combinações dos soros dos animais de cada grupo coletados após a última dose da vacina.

A avidéz dos anticorpos por seus respectivos antígenos foi determinada com amostras de soro coletadas após a última dose da vacina, sendo o procedimento semelhante ao ELISA convencional, mas com a inclusão de um passo adicional, como descrito anteriormente (60). Após a sensibilização e bloqueio, as placas foram incubadas com concentrações normalizadas de anticorpos em todos os poços pelo período de 1,5 h. Os poços foram então lavados três vezes com PBST e expostos pelo período de 15 min, à temperatura ambiente, às concentrações 0 / 0,025 / 0,05 / 0,1 / 0,2 / 0,4 / 0,6 / 0,8 / 1,0 / 2 / 4M de tiocianato de amônio (agente desnaturante) diluído em PBS. Concluído o tempo de exposição, os poços foram lavados três vezes com PBST e revelados em seguida. A afinidade ao antígeno foi calculada como: DO 492 nm da reação presença de tiocianato de amônio x 100 / DO 492 nm da reação na ausência de tiocianato de amônio. Os valores foram expressos como porcentagens em relação à amostra não submetida ao tratamento com tiocianato de amônio.

### 3.10 Teste de soroneutralização *in vitro* – PRNT<sub>50</sub>

Para avaliar os efeitos da neutralização *in vitro* de diferentes amostras de soro foi utilizado método previamente descrito (61). Primeiramente, 100.000 células VERO foram adicionadas por poço em placas de 24 poços (Jet BIOFIL, China) e acondicionadas em meio MEM suplementado com 2% de SFB. Misturas de amostras de soro de cada grupo vacinal tiveram o complexo do complemento inativado por calor seco a 56 °C durante 30 min e diluídas em log<sub>2</sub> de forma seriada em proporções de 1:10 até 1:5120, em volume final de 75 µl. Posteriormente, 100 UFP do NGC, em volume final de 75 µl foram adicionados às diluições das amostras de soros e incubados por

30 min para opsonização. Duplicatas dos poços contendo células foram então expostas a alíquotas contendo 100UFP/poço (60 µl da mistura incubada) de NGC intactos (controle positivo) ou previamente opsonizadas, sendo o volume final corrigido para 200 µl com a adição de meio MEM, por 1 h a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub>. A etapa de adsorção teve um volume final de infecção de 200 µl e durou 1 h a 37 °C em 5% CO<sub>2</sub>.

Após a adsorção as células foram mantidas por 7 dias em 1000 µl de meio MEM contendo CMC a 1% e suplementado com 2% de SFB. O meio foi removido dos poços por lavagem seguida pela fixação celular, por 15 min, com formaldeído 4% diluído em água destilada. Posteriormente os poços foram novamente lavados e corados com violeta genciana (LABORCLIN, Brasil) por 15 min. O corante foi retirado e as placas de lise formadas nos poços contendo os soros dos camundongos foram contadas. Foram consideradas positivas para PRNT<sub>50</sub> amostras que apresentaram diluições com redução da quantidade de placas de lise em pelo menos 50% em relação aos controles.

### 3.11 Teste de soroneutralização *in vivo*

Os ensaios de neutralização viral *in vivo* foram conduzidos com partículas virais viáveis de JHA1 (50 UFP) incubadas a 37 °C por 30 min juntamente com uma diluição de 1:10 de misturas de soros (com complemento inativado) oriundos dos diferentes grupos de imunização. Camundongos não imunizados ou expostos a infecções foram então anestesiados pela via i.m. com 50 µl de uma mistura de ketamina (Dopalen, 100 mg/kg) e xilazina (Anasedan, 10 mg/kg) e, subsequentemente, desafiados pela via i.c. com as partículas virais incubadas com soro, em volume final de 40 µl, e observados por 21 dias quanto à sobrevivência.

### 3.12 Ensaio para a avaliação do fenômeno de ADE

Para a avaliação do fenômeno de ADE em células possuidoras de receptores para a porção Fc dos anticorpos, inicialmente plaqueou-se 100.000 células da linhagem U937 em placas com 96 poços em volume final de 200 µl de meio RPMI por poço suplementado com 5% SFB e L-glutamina, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em placa estéril foram feitas as diluições em log<sub>2</sub> de forma seriada em proporções de 1:10 até 1:1.0240 das misturas de soro de cada grupo

vacinal (com complemento inativado), em volume final de 50 µl/poço. Acrescentou-se aos anticorpos 50 µl/poço de partículas virais de NGC em MOI 1.0 em relação às células U937, e incubou-se a mistura por 30 min a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células U937 foram centrifugadas por 5 min a 1.500 RPM e o meio de cultura foi substituído pela alíquota de NGC opsonizado com o monoclonal anti-DENV 2H2 (controle positivo da geração de ADE), PBS (controle negativo) ou misturas de anticorpos e partículas virais, em volume final de 100 µl/poço. As amostras foram novamente incubadas por 2 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao fim da incubação, as células foram novamente centrifugadas e o meio de cultura foi substituído por RPMI suplementado com 10% SFB e L-glutamina, em volume final de 200 µl/poço, sendo incubadas por 36 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente à incubação, as células foram lavadas por 3 vezes, o meio de cultura foi substituído por PBS estéril em pH 7.2, e as células fixadas por 10 min a 4 °C com 100 µl/poço de PBS + 4% de paraformaldeído em pH 7.4. As células fixadas foram permeabilizadas pela repetição do procedimento de lavagem utilizando-se o tampão com saponina e bloqueadas com a adição de 100 µl/poço de saponina + 10% de SFB, por 30 min a temperatura ambiente (TA).

A marcação das células foi feita, em primeiro lugar com solução bloqueadora seguida por centrifugação e incubação com 100 µl/poço do monoclonal 4G2. As células foram novamente incubadas por 30 min a TA e, em seguida, tratadas com 100 µl/poço de saponina. Após novo ciclo de lavagem com saponina, iniciou-se a segunda marcação, com 50 µl/poço de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à FITC com posterior incubação por 30 min a TA. Novamente foram adicionados 100 µl/poço de saponina seguidos por centrifugação e novo ciclo de lavagem com saponina. Por fim, as células foram ressuspensas em 200 µl/poço de PBS + 2% SFB e leitura em citometro de fluxo.

### 3.13 Desafios letais (DL) com o isolado e a cepa NGC

Camundongos imunizados foram desafiados duas semanas após a administração da última dose vacinal, como descrito anteriormente (55). Para o procedimento, os animais foram anestesiados pela via i.m. com 50 µl de uma mistura de ketamina (Dopalen, 100 mg/kg) e xilazina (Anasedan, 10 mg/kg) e, subsequentemente, desafiados pela via i.c. com 4 x a dose letal de 50% (DL<sub>50</sub>) (50 UFP) de JHA1 e 100 x DL<sub>50</sub> (1x10<sup>6</sup> UFP) de NGC, em volume final de 40 µl,



e observados por 21 dias para a determinação da sobrevivência. De forma paralela, durante os 21 dias do desafio foram observados sinais característicos de morbidade (fraqueza muscular, paralisia de membros, arqueamento da coluna, paralisia total), conforme previamente definido na literatura (62). Ao início de fraqueza muscular os animais foram considerados positivos para o aspecto de morbidade.

### 3.14 Avaliação de possíveis efeitos deletérios associados às imunizações

Para avaliar possíveis efeitos colaterais gerados em imunizações pela via TC utilizando partículas virais e LT, primeiramente foram feitas análises hematológicas utilizando amostras de sangue total dos animais imunizados. A colheita de sangue foi feita pelo plexo submandibular 48 h após da última imunização (dia 30) (63). As amostras foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio (7,8%) e utilizadas para confecção de hemogramas com auxílio de aparelho de hematologia (Auto Hematology Analyzer – BC2800vet - MINDRAY). Adicionalmente, também foram avaliados possíveis danos hepáticos por meio da mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH). Para estes ensaios foram utilizados kits analíticos seguindo as instruções do fabricante (Bioclin, Brasil).

### 3.15 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram calculadas utilizando o programa Prism 5 (GraphPad Software Inc, LA Jolla, CA) e diferenças com  $p \leq 0,05$  foram consideradas significantes. Para comparações de resultados observados em diferentes grupos foi utilizado o teste estatístico 2way ANOVA em associação com o pós-teste de Bonferroni. A comparação de resultados entre 3 grupos foi feita com a utilização do teste oneway ANOVA em associação com o pós-teste de Bonferroni. A significância entre as curvas de mortalidade foi determinada pelo teste de Mantel-cox.

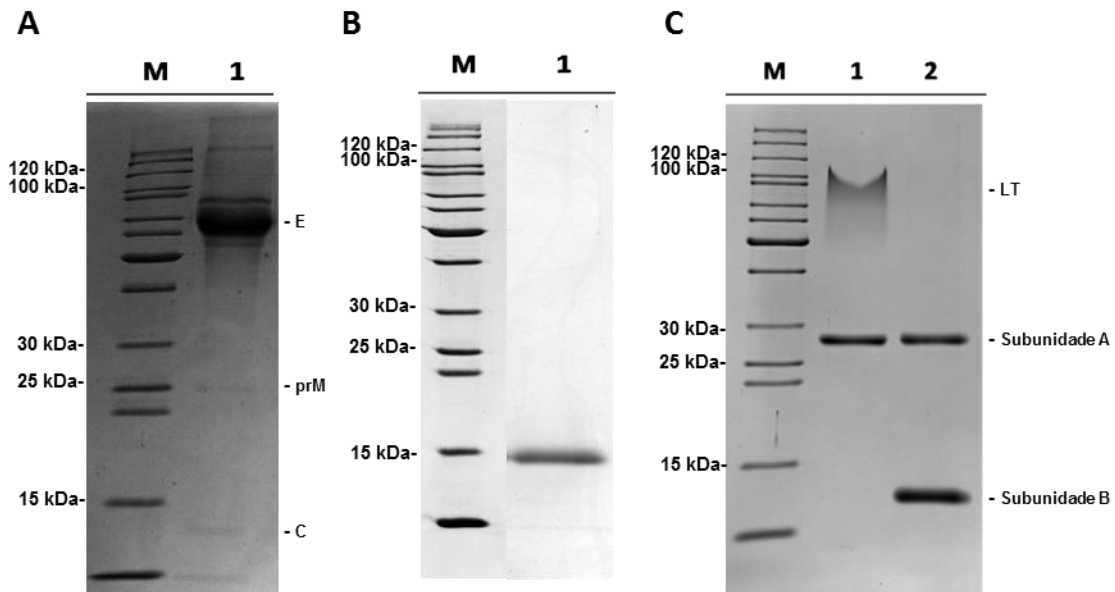
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Expressão dos antígenos vacinais e adjuvante

Diante da proposta de imunização de camundongos pela via TC com antígenos de DENV2, a primeira etapa do trabalho consistiu na produção de antígenos (partículas virais inativadas e domínio EDIII recombinante) e do adjuvante LT. Primeiramente, partículas virais foram coletadas de sobrenadantes de cultura de células C6/36 infectadas por 7 dias, a 28 °C, pelo vírus JHA1 e, posteriormente, submetidas à inativação a -20 °C por 15 a 30 dias, sendo a inativação confirmada por ensaios de titulação viral (ver métodos, seção 3.7). Após a confirmação da inativação das partículas virais, foi feita a avaliação da presença das proteínas estruturais do DENV2 por meio da observação do padrão de bandas em SDS-PAGE, na qual se destaca a proteína de envelope viral (E), com ~53 kDa, e menores quantidades das proteínas de capsídeo (C) e de pré-membrana (prM), com ~12,55 kDa e ~20kDa kDa, respectivamente (FIG 3A).

A obtenção do EDIII recombinante foi feita em *E. coli* transformada com plasmídeo contendo a região codificadora da proteína de interesse. Nas condições empregadas, o EDIII, recombinante concentra-se em corpúsculos de inclusão na fração insolúvel do extrato bacteriano (dados não publicados). Segui-se, portanto, com protocolo de *refolding* proteico por meio de diluição pulsada, seguido por cromatografia de afinidade em coluna cromatográfica contendo resina de níquel. Após o *refolding* e purificação, a proteína mostrou-se pura e com o tamanho esperado de ~15 kDa em SDS-PAGE (FIG 3B).

A LT recombinante foi produzida em *E. coli* seguido por purificação por cromatografia de afinidade em coluna contendo D-galactose imobilizada (64). A estrutura da LT permite a identificação dos monômeros da subunidade A (28 kDa) (FIG 3C) e a subunidade B na sua forma de pentâmero (sem desnaturação) ou monômero, após desnaturação (11,5 kDa) (FIG 3C). Após produção e purificação, a LT mostrou com grau de pureza elevada em SDS-PAGE (FIG. 3C).

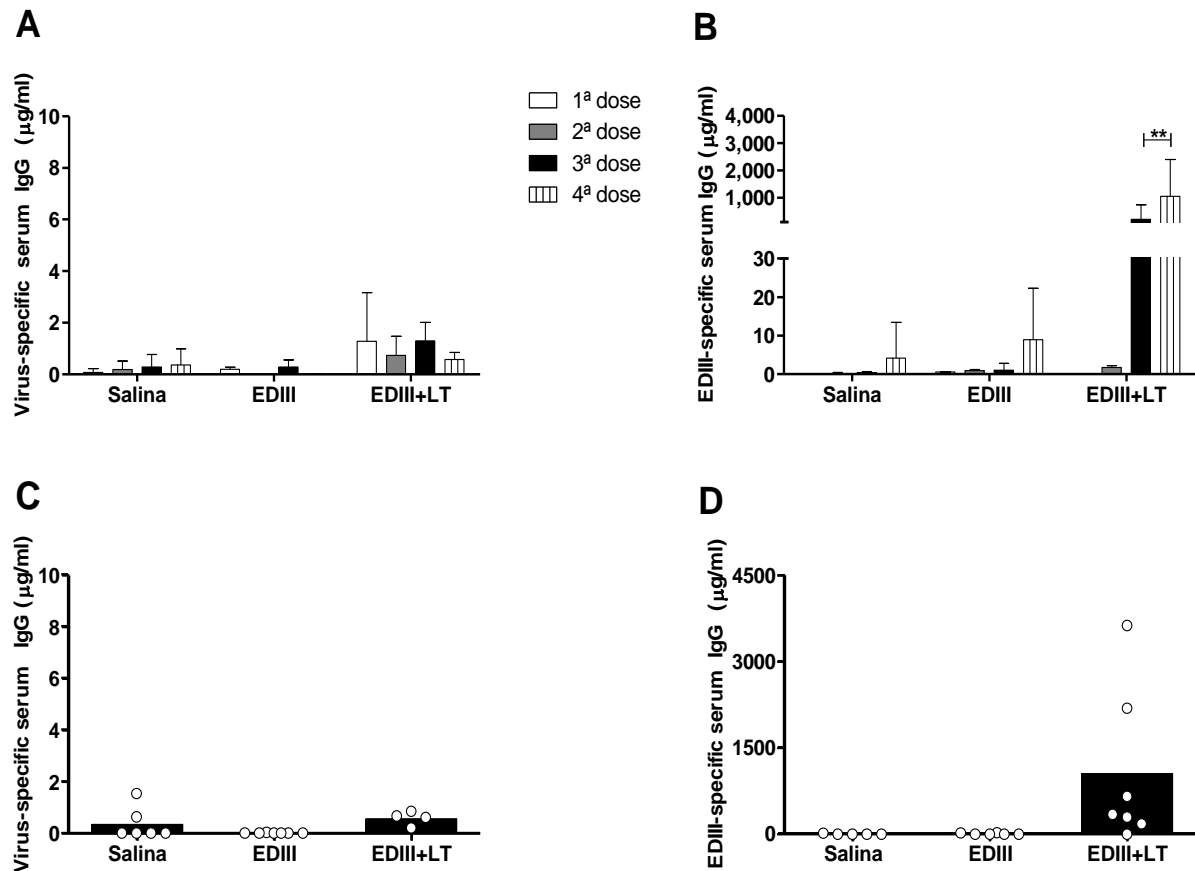


**Figura 3. Antígenos e adjuvante incluídos nas análises e vacinas anti-DENV2.** A) Partículas inativadas de DENV2 coletadas a partir de sobrenadantes de cultura de células C6/36 após 7 dias de infecção com a cepa de DENV2 JHA1. A amostra (2 µg de proteína total) foi submetida à corrida em SDS-PAGE utilizando gel de 15% de poliacrilamida e corada com comassie blue. Amostras: M, marcador de peso molecular; canaleta 1: Partículas de DENV2 JHA1 inativadas. Posições correspondentes à proteína de envelope (~55 kDa), proteína de pré-membrana (~20 kDa) e proteína de capsídeo (~12,55 kDa) são indicadas na figura. B) Proteína EDIII recombinante purificada (0,5 µg) corrida em SDS-PAGE utilizando gel de 15% de poliacrilamida e corada com comassie blue. Amostras: M, marcador de peso molecular; canaleta 1: proteína EDIII purificada. C) Proteína LT recombinante (1 µg) produzida por *E. coli* recombinante e corrida em SDS-PAGE utilizando gel de 17,5% de poliacrilamida e corada em comassie blue. Amostras: M, marcador de peso molecular; canaleta 1: proteína corrida sem tratamento térmico; canaleta 2: proteína corrida após desnaturação por calor (100 °C por 10 min). Posições correspondentes aos pentâmeros da subunidade B e aos monômeros das subunidades A e B são indicadas na figura.

#### 4.2 Indução de resposta humoral específica contra partículas de JHA1 e proteínas EDIII em camundongos submetidos à imunização pela via TC

As primeiras imunizações foram realizadas para avaliar a imunogenicidade do EDIII recombinante pela via TC (FIG 4). Para isto foi estabelecemos um regime de imunização composto por 4 doses intercaladas por 14 dias, sendo coletadas amostras de sangue pelo plexo submandibular um dia antes de cada dose e 14 dias após a última dose (ver métodos, seção 3.8). Após 4 doses do antígeno sem o adjuvante não se observou aumento na resposta humoral estatisticamente significativa (FIG 4A). Na vacina com LT o pico de resposta humoral contra o antígeno foi atingido na quarta dose (FIG 4B), mas os valores forma baixos quando comparados com imunizações que utilizam a proteína LT por outras vias (54). Além disso, quando comparadas às respostas entre os grupos que receberam ou não o adjuvante LT, não foi possível observar diferença estatística significativa, seja contra partículas virais (FIG 4C) ou o antígeno

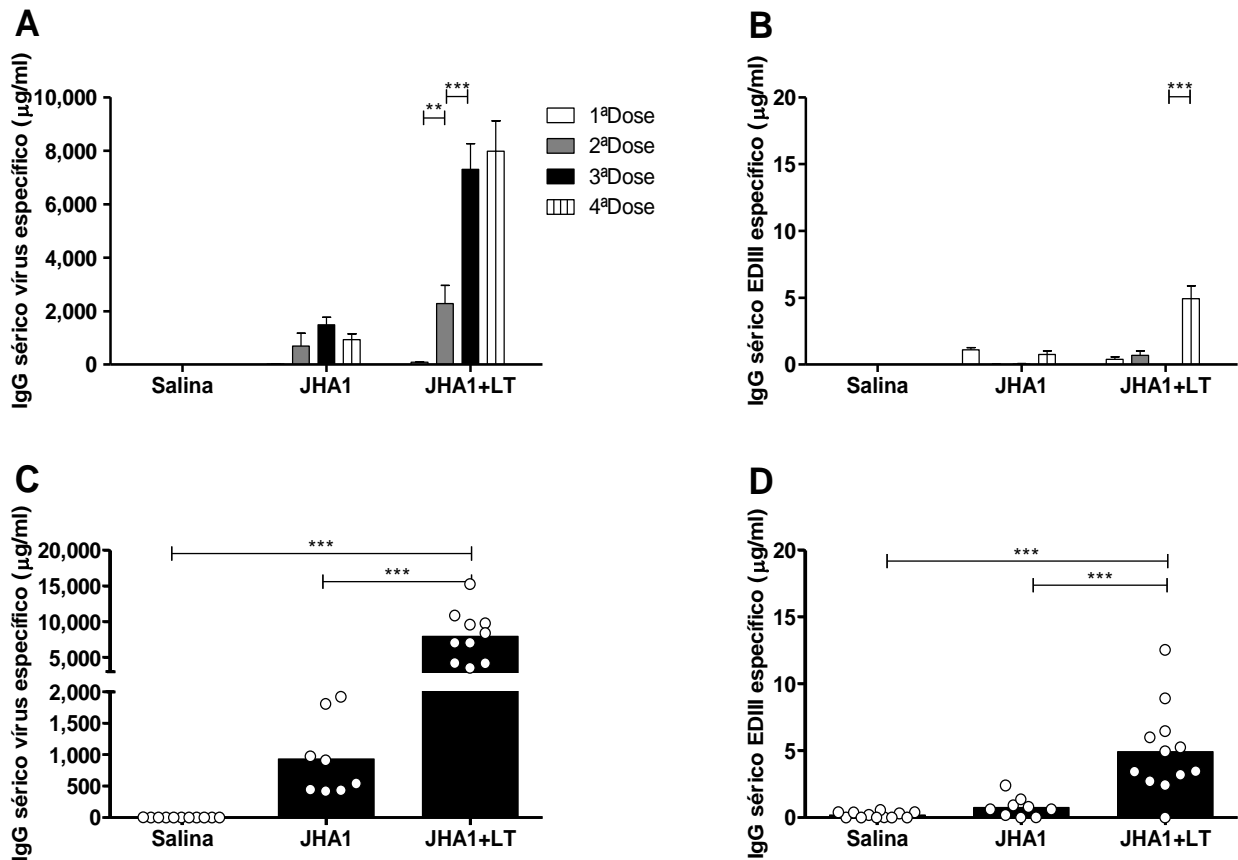
EDIII (FIG 4D). Os dados indicam que a via TC não se mostrou apropriada para as imunizações com a proteína recombinante purificada, o que nos levou a trabalhar na administração de partículas virais de JHA1 inativadas.



**Figura 4 - Resposta humoral sistêmica desencadeada pela administração pela via TC de EDIII em associação com LT como adjuvante.** Misturas de soros de camundongos BALB/c imunizados ( $n=7/\text{grupo}$ ) com EDIII ( $10 \mu\text{g}/\text{dose}$ ), coadministradas ou não a LT ( $10 \mu\text{g}/\text{dose}$ ), foram utilizadas para detecção de IgG específico em ELISA. Os dados apresentados representam os níveis de IgG antivírus e anti-EDIII encontrados duas semanas após cada uma das doses do regime vacinal. (A) Resposta humoral específica anti-JHA1. (B) Resposta humoral específica anti-EDIII. (C) Valores médios (barras pretas) e individuais (círculos brancos) de IgG sérico anti-DENV2 duas semanas após a última dose do regime vacinal (dia 56). (D) Valores médios (barras pretas) e individuais (círculos brancos) de IgG sérico anti-EDIII duas semanas após a última dose do regime vacinal (dia 56). O regime vacinal consistiu de 4 doses, administradas com intervalo de 2 semanas (dias 0, 14, 28 e 42).  $**p < 0,001$ . (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni).

Em seguida, foi realizada uma nova imunização com mesmo regime vacinal, mas substituindo-se o antígeno EDIII por vírions inativados, contidos no sobrenadante de células infectadas com JHA1. Após a obtenção das amostras de soro, os anticorpos gerados foram quantificados por meio de ELISA. Observou-se que apenas três doses vacinais administradas pela via TC foram suficientes para induzir a produção máxima de anticorpos (FIG 5A), não sendo

encontrada diferença estatística para a presença de IgG DENV2-específico entre as amostras de soro da terceira e quarta doses (FIG 5A). A quantidade de anticorpos EDIII-específicos presentes em camundongos imunizados com partículas virais inativadas foi baixa e quantificável com diferença estatística apenas no grupo adjuvantado, após a quarta dose vacinal (FIG. 5B). A incorporação de LT mostrou-se essencial na geração de uma resposta imunológica robusta, aumentando significativamente os níveis de anticorpos produzidos entre os grupos vacinais (FIG 5C), mesmo quando quantificados para a presença de anticorpos EDIII-específicos (FIG 5D). Portanto, os resultados da imunização confirmaram o potencial antigênico de partículas virais inativadas de DENV2 quando administradas pela via TC. Os resultados também indicaram claramente que a coadministração de LT é essencial para a indução de respostas imunológica robustas.



**Figura 5 - Resposta humoral sistêmica desencadeada após administração pela via TC de partículas inativadas da cepa JHA1 em associação com LT como adjuvante.** Soros individuais de camundongos BALB/c imunizados (n=12/grupo) com partículas inativadas da cepa JHA1 (10 µg/dose), coadministradas ou não a LT (10 µg/dose), foram utilizadas para detecção de IgG específico em ELISA. Os dados representam os níveis de IgG antivírus e anti-EDIII encontrados duas semanas após cada uma das doses do regime vacinal. (A) Resposta humoral específica anti-DENV2 JHA1. (B) Resposta humoral específica anti-EDIII. (C) Valores médios (barras pretas) e individuais (círculos brancos) de IgG sérico anti-DENV2 duas semanas após a última dose do regime vacinal (dia 56). (D) Valores médios (barras pretas) e individuais (círculos brancos) de IgG sérico anti-EDIII duas semanas após a última dose do regime vacinal (dia 56). O regime vacinal consistiu de 4 doses administradas com intervalo de 2 semanas (dias 0, 14, 28 e 42). \*\*\* $p < 0,001$ . (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni).

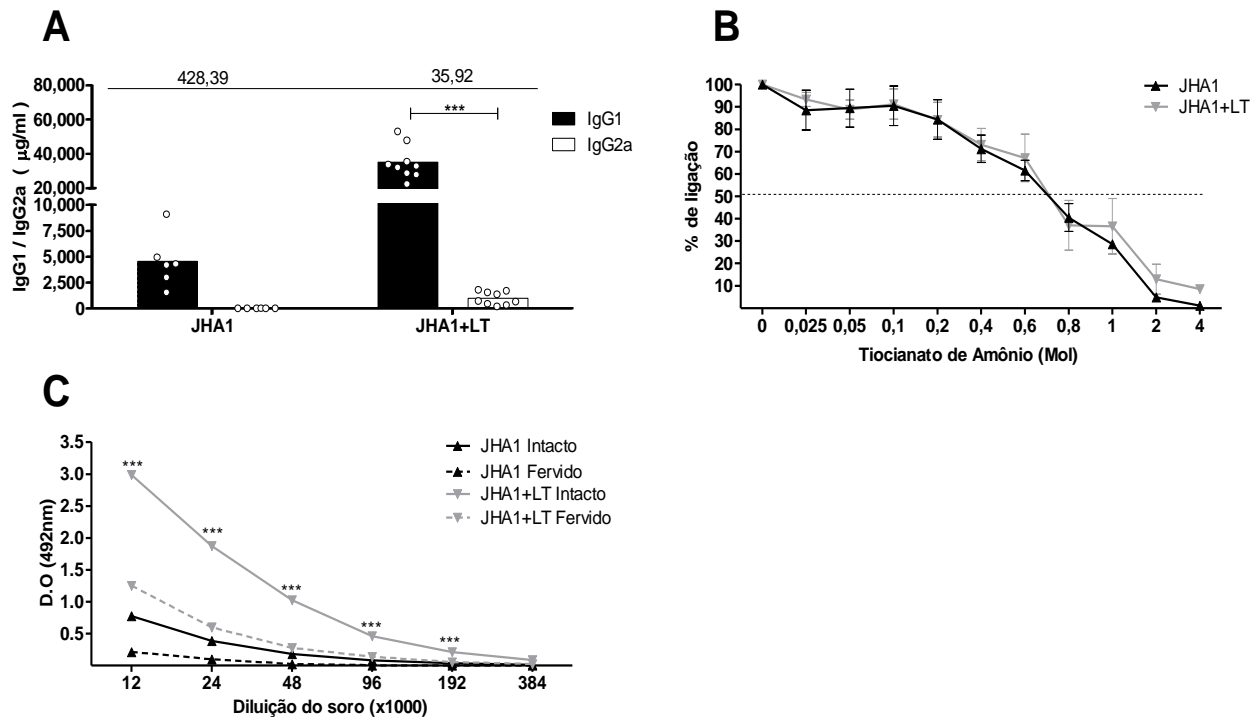
#### 4.3 Caracterização da resposta humoral de camundongos submetidos à imunização pela via TC com partículas virais de JHA1

Para a caracterização da resposta humoral gerada após as imunizações, foi avaliado o balanço de IgG1/IgG2a presente nos soros colhidos após a última dose vacinal. Observou-se uma predominância de anticorpos da subclasse IgG1 nos animais imunizados com aumento das respostas no grupo imunizado com LT (FIG 6A). A razão de IgG1/IgG2a detectada nas amostras colhidas após a quarta dose de imunização sem adjuvante foi de 428,4, enquanto que as amostras colhidas a partir de camundongos imunizados com LT apresentaram uma resposta de subclasses cerca de 10 vezes mais balanceada, com uma razão de IgG1/IgG2a de 35,9 (FIG. 6A). Pode ser

percebida a ação do adjuvante em elevar respostas de subclasse de IgG com tendência balanceada.

Adicionalmente às respostas de subclasses de IgG, foi avaliada a avidéz dos anticorpos anti-DENV ao antígeno. Para isso, foram feitos ensaios de ELISA com a adição de tiocianato de amônio como agente desnaturante após a ligação dos anticorpos aos seus antígenos (FIG 6B). Observou-se que a avidéz dos anticorpos manteve-se próxima sem diferenças estatísticas em nenhum ponto da curva de dissociação (FIG 6B). A concentração de tiocianato de amônio necessária para desprender 50% dos anticorpos do grupo imunizado com apenas vírus foi de 0,69M e para o grupo imunizado com vírus + LT foi de 0,719M (FIG 6B), o que demonstra que o adjuvante não levou ao aumento da força de ligação do anticorpo ao antígeno.

Ainda em uma avaliação qualitativa dos anticorpos, foi observada a preferência de ligação dos anticorpos gerados a epítomos conformacionais da proteína do envelope viral. Para tal, foi avaliada a redução das reatividades após desnaturação do antígeno usado sensibilização das placas. Soros recolhidos dos diferentes grupos de imunização reagiram menos (uma redução superior a 50%) com partículas de JHA1 após a desnaturação do antígeno tanto em amostras colhidas de animais que receberam o antígeno como aqueles que receberam o antígeno combinado ao adjuvante (FIG 6C). Os resultados indicam que, com as formulações vacinais testadas, a coadministração do adjuvante influenciou na quantidade de anticorpos, mas não alterou a avidéz dos anticorpos ao antígeno.



**Figura 6 - Caracterização da resposta humoral de camundongos imunizados pela via TC com partículas de JHA1 inativadas coadministradas ou não com LT.** (A) Subclasses de IgG sérico em camundongos submetidos à imunização pela via TC. As barras representam a média e os círculos os valores individuais dos níveis de subclasses de IgG detectados em soros colhidos duas semanas após a última dose de imunização (dia 56). Os valores na parte superior da figura representam a relação de IgG1/IgG2a de cada grupo de imunização. (B) Avidoz dos anticorpos contra seus antígenos determinada em placas de ELISA com 1,4 µg de partículas de JHA1 inativadas e submetidas, posteriormente, a um passo de dissociação com diferentes concentrações de tiocianato de amônio (0,025M – 4M). A linha pontilhada indicada do ponto em que a quantidade de tiocianato de amônio dissocia 50% dos anticorpos ligados às partículas DENV2. (C) Os anticorpos produzidos em camundongos submetidos à TC se ligam preferencialmente a epítomos conformacionais das partículas de DENV2. As placas de ELISA foram preparadas com partículas de vírus submetidas, ou não, a um tratamento de desnaturação por calor (100 °C durante 10 min). Misturas de soros de cada um dos grupos de imunização, colhidos duas semanas após a última dose de vacina, foram testadas (dia 56). A análise estatística foi realizada por ANOVA 2way em associação com pós-teste de Bonferroni \* p <0,05.

#### 4.4 Avaliação da imunidade protetora em camundongos submetidos à imunização pela via TC com partículas de JHA1

Após a caracterização da resposta humoral gerada pelas imunizações, avaliou-se a capacidade neutralizante *in vitro* de tais anticorpos. Para isso utilizamos a cepa NGC de DENV2 e amostras de soros obtidas após a última dose vacinal em ensaios de neutralização viral. A redução da quantidade de placas de lise formadas foi avaliada em relação a poços controle que não foram expostos a soro hiperimunes. Não se observou neutralização viral para nenhum dos soros gerados a partir das formulações vacinais testadas, diferente do observado com o anticorpo monoclonal



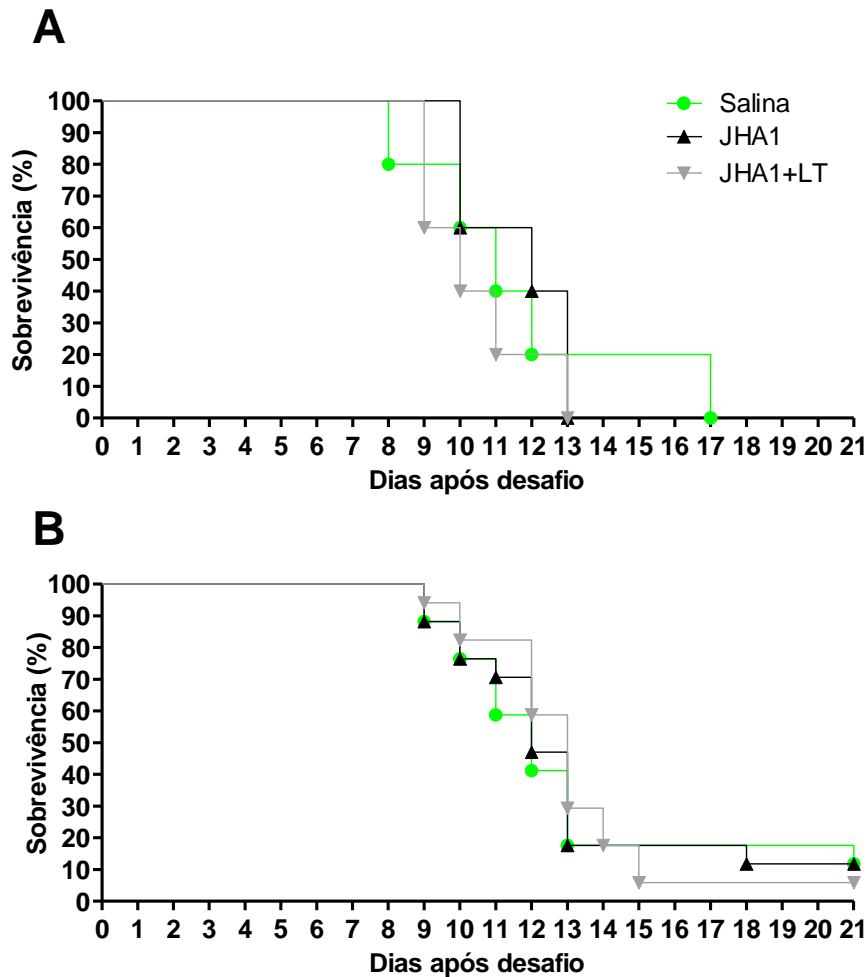
neutralizante 1A10, utilizado como controle positivo de neutralização (TAB 3). A ausência de efeito neutralizante *in vitro* nos levou a testar *in vivo* os soros obtidos após as imunizações.

**Tabela 3 - Determinação dos níveis neutralizantes de anticorpos (PRNT<sub>50</sub>) obtidos após o protocolo vacinal utilizando partículas inativadas de JHA1 pela via TC.**

Grupos de imunização	Cepa viral	Título de IgG	Cepa viral	Título de IgG	PRNT <sub>50</sub> <sup>1</sup>
Vírus+LT 4 <sup>a</sup> dose	JHA1	129772	NGC	44375	ND <sup>2</sup>
Vírus 4 <sup>a</sup> dose	JHA1	30021	NGC	9267	ND
Salina 4 <sup>a</sup> dose	JHA1	17	NGC	6,73	ND
Controle positivo (1A10)	JHA1	ND	NGC	ND	2560 <sup>3</sup> (~0,04 µg)

<sup>1</sup> Valores obtidos após a comparação da quantidade de placas de lise formadas após incubação com soros em relação aos valores obtidos em amostras não submetidos ao tratamento. Foram utilizados soros da última dose vacinal das imunizações feitas com o vírus inativado, coadministrado ou não com o adjuvante LT. <sup>2</sup> Valor não determinado. <sup>3</sup> Diluição neutralizante máxima.

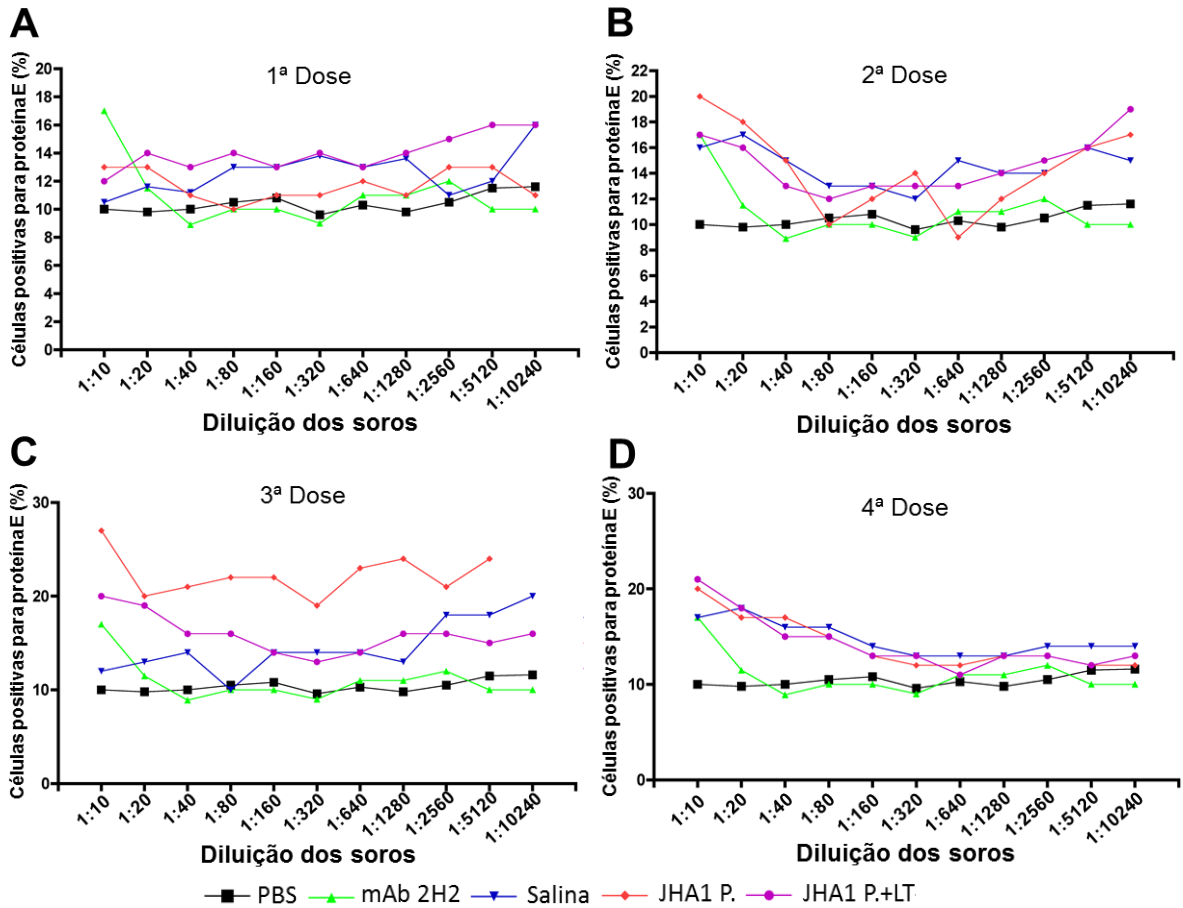
Foram feitos dois ensaios de neutralização *in vivo*: um baseado na incubação das partículas virais viáveis com amostras dos soros testadas e posterior inoculação em camundongos não vacinados e, na segunda abordagem, foram feitos desafios letais pela via i.c. com animais previamente submetidos à imunização pela via TC. Nos ensaios de neutralização *in vivo* foi utilizada a cepa JHA1 de DENV2 que se mostra letal após desafios pela via i.c. em camundongos imunocompetentes (AMORIM et al., 2012a). Tanto a soroneutralização *in vivo* (n=5) (FIG 7A) quanto o ensaio desafio (FIG 7B) demonstraram que os anticorpos não possuem capacidade neutralizante contra a cepa JHA1.



**Figura 7 - Soroneutralização *in vivo* e curva de sobrevivência de camundongos imunizados pela via TC com partículas inativadas da cepa JHA1 em associação ou não com LT e desafiados com a mesma cepa JHA1.** (A) Curva de sobrevivência de camundongos não imunizados e desafiados com a cepa JHA1 previamente incubada com soro de animais imunizados pela via TC. Grupos de camundongos BALB/c (n=5) foram desafiados pela via i.c. com uma mistura contendo vírus viáveis (50 UFP) previamente incubados na presença de soro obtido de animais imunizados pela via TC com diluição 1/10. Para esse ensaio foram utilizadas alíquotas de soro obtidas no dia 55 do regime vacinal e que correspondem a duas semanas após a última dose. (B) Duas semanas após a última dose do protocolo vacinal (dia 56) os grupos de animais imunizados (n=17) foram desafiados pela via i.c. com 50 UFP do JHA1. A sobrevivência dos animais foi avaliada ao longo de 21 dias. (Mantel-Cox).

Também foram feitos ensaios *in vitro* para avaliar a capacidade dos anticorpos gerados em promover o efeito de ADE. O ponto chave do ensaio consiste na utilização de células possuidoras de receptores contra a porção Fc dos anticorpos, sendo capazes de reconhecê-los e fagocitar imunocomplexos (partículas virais opsonizadas). Na hipótese da geração de respostas humorais subneutralizantes, as partículas opsonizadas permanecem infectantes, provocando um aumento de

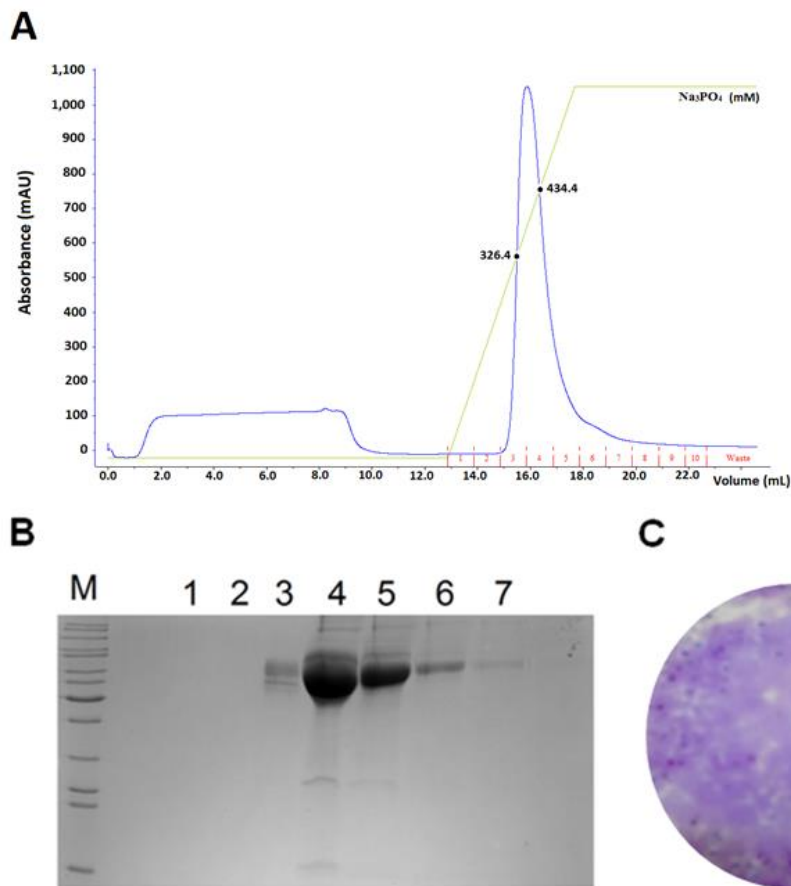
infecção quando comparadas com o grupo controle. O ensaio foi realizado com misturas de soros das 1ª (FIG 8A), 2ª (FIG 8B), 3ª (FIG 8C) e 4ª doses (FIG 8D). Mais uma vez, não foi observada redução no índice de infecção das células após incubação com as amostras de soro testadas (FIG 8C). Por outro lado, constatamos que os soros testados promoveram o efeito de ADE, funcionando como potencializadores da infecção.



**Figura 8 - Avaliação da indução do fenômeno de ADE pelas amostras de soros obtidos de animais imunizados pela via TC.** Misturas de soros das 1ª, 2ª, 3ª e 4ª doses (A-D) foram diluídas em  $\log_2$  para a avaliação do perfil neutralizante dos anticorpos gerados após a imunização de camundongos BALB/c (n=5) pela via TC com partículas inativadas de JHA1. Células U937, possuidoras de receptores para a porção Fc de anticorpos, foram infectadas com a cepa NGC de DENV2 opsonizada com os soros obtidos durante o protocolo vacinal. O anticorpo monoclonal 2H2 foi utilizado como controle positivo de aumento de infecção. Partículas virais expostas ao tampão PBS foram utilizadas para estabelecer a infecção de referência (controle negativo). As células foram permeabilizadas e marcadas para a presença da proteína E de DENV com a utilização de anticorpos monoclonais 4G2, específicos para flavivírus.

#### 4.5 Purificação de partículas virais do isolado JHA1

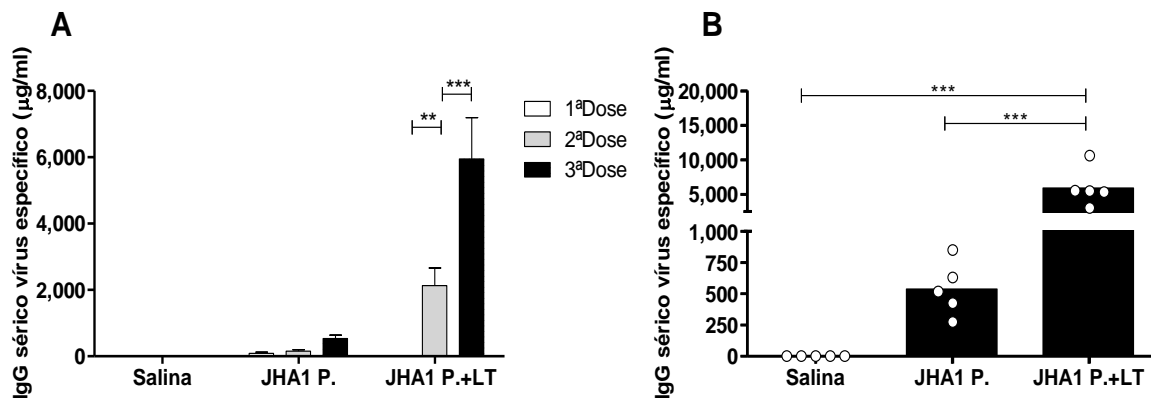
Em uma segunda etapa avaliamos o uso de partículas de DNV2 purificadas como antígeno vacinal administrado pela via TC. A purificação das partículas virais resultou em um único pico protéico de eluição, contido entre 326,4 mM e 434,4 mM de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (FIG 9A). As frações com partículas virais foram analisada em SDS-PAGE e três bandas características das proteínas estruturais de DENV (E, prM e C) foram observadas (FIG 9B). As partículas virais permaneceram viáveis após o procedimento de purificação, sendo capazes de replicar e causar lise em células permissivas à infecção (FIG 9C). O antígeno obtido foi utilizado em novas imunizações pela via TC.



**Figura 9 - Purificação das partículas virais de JHA1 por cromatografia de troca iônica.** Partículas virais do DENV2 foram passadas por coluna trocadora de cátions em concentração de 60 mM de tampão fosfato de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) e eluídas por gradiente de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  até a concentração máxima de 600 mM. (A) Cromatograma obtido após a purificação viral, contendo pico de eluição entre os níveis 326,4 mM e 434,4 mM de ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ). (B) SDS-PAGE das frações eluídas na purificação. (C) Foto representativa de poço referente a ensaios de titulação utilizando partículas virais purificadas.

#### 4.6 Indução de resposta humoral específica contra partículas purificadas de JHA1 em camundongos submetidos à imunização pela via TC

Com os vírus purificados, foi feita uma imunização pela via TC com 3 doses vacinais, sendo os grupos vacinados com 10 µg de vírus purificado não inativado, coadministrado ou não a LT (n=10), ou apenas salina apirogênica (n=5). A escolha por utilizar os vírus na forma viável ocorreu em função da preocupação de que os vírus inativados poderiam ser apresentados ao sistema imunológico com epítomos diferentes da realidade da partícula viral nativa, e que isso, somado às proteínas antes presentes no sobrenadante de cultura celular, impediria a obtenção de uma resposta protetora. A obtenção de soro foi feita da mesma forma que nas imunizações utilizando vírus inativados. Observou-se níveis de IgG específico semelhantes aos encontrados na 3ª dose vacinal com vírus inativados (FIG 10A). Também comprovamos o efeito adjuvante de LT na elevação dos níveis de anticorpos específicos (FIG 10B).

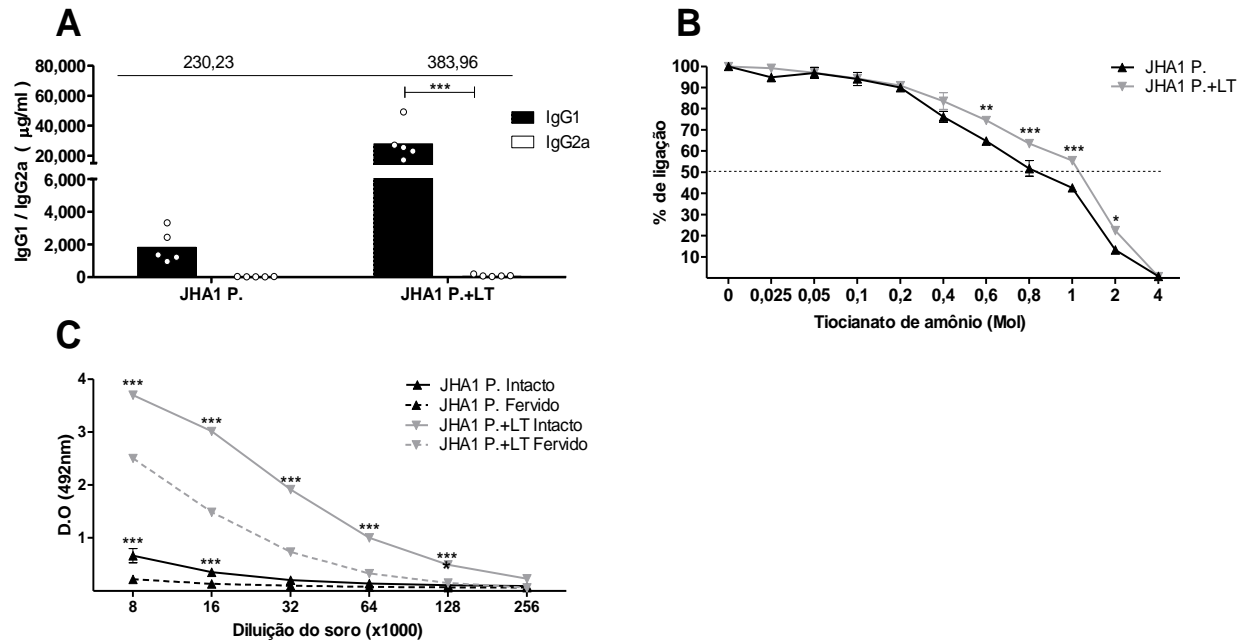


**Figura 10 - Resposta humoral sistêmica desencadeada pela administração pela via TC de partículas purificadas de JHA1 em associação com LT como adjuvante.** Soros individuais de camundongos BALB/c imunizados (n=5/grupo) com partículas purificadas de JHA1 (10 µg/dose), coadministradas ou não a LT (10 µg/dose), foram utilizadas para detecção de IgG específico em ELISA. (A) Os dados apresentados representam os níveis de IgG anti-DENV2 encontrados duas semanas após cada uma das doses do regime vacinal. (B) Valores médios (barras pretas) e individuais (círculos brancos) de IgG sérico anti-DENV2 duas semanas após a última dose do regime vacinal (dia 42). O regime vacinal consistiu de 3 doses, administradas com intervalo de 2 semanas (dias 0, 14 e 28). \*\*\*p<0,001. (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni).

#### 4.7 Caracterização da resposta humoral de camundongos submetidos à imunização pela TC com partículas virais de JHA1 purificadas

A caracterização foi feita de forma semelhante à utilizada nas imunizações anteriores, com a modificação dos antígenos de fase sólida utilizados na sensibilização das placas de ELISA, mas com a substituição dos vírus inativados por vírus purificados. Foi possível observar que a administração de partículas virais purificadas induziu uma menor quantidade de anticorpos da subclasse IgG2a quando comparadas com a imunização utilizando partículas inativadas em sobrenadante de cultura, alcançando diferença estatística apenas no grupo com adjuvante (FIG 11A). Além disso, notou-se que a razão IgG1/IgG2a foi modificada com a mudança de formulação vacinal, pois a introdução da LT, ao contrário do que fora visto com vírus não purificados, acabou por aumentar a razão IgG1/IgG2a.

Outra diferença observada nesta nova imunização foi a avidéz dos anticorpos gerados entre os diferentes grupos de imunização. Observou-se que a avidéz pelos antígenos foi aumentada após a coadministração de LT, atingindo diferença estatística em relação ao grupo imunizado apenas com partículas virais (FIG 11B). Para o grupo imunizado com apenas partículas virais purificadas, o valor de tiocianato de amônio necessário para reduzir a reatividade do soro pela metade foi de 0,85M, enquanto que para o grupo imunizado com partículas virais purificadas coadministradas com LT o valor encontrado foi de 1,09M. Em relação à reatividade a epítomos conformacionais, observamos resultados semelhantes aos encontrados em imunizações feitas com partículas virais inativadas com queda acentuada da reatividade dos anticorpos frente ao antígeno desnaturado (FIG 11C). No entanto, a incorporação de LT aumentou a reatividade dos anticorpos gerados após imunização pela via TC com partículas virais purificadas tanto para o antígeno intacto como para o antígeno desnaturado (FIG 11C). A mudança da formulação vacinal, portanto, melhorou em parte o efeito adjuvante proporcionado pela LT, aumentando o nível de avidéz dos anticorpos pelos seus antígenos seja para epítomos conformacionais como para lineares.



**Figura 11 - Caracterização da resposta humoral de camundongos imunizados pela via TC com partículas purificadas de JHA1 coadministradas com LT.** (A) Subclasses de IgG sérico em camundongos submetidos à imunização pela via TC. As barras representam a média e os círculos os valores individuais dos níveis de subclasses de IgG detectados em soros colhidos duas semanas após a última dose de imunização (dia 42). Os valores na parte superior da figura representam a relação de IgG1 / IgG2a de cada grupo de imunização. (B) Avidéz dos anticorpos contra seus antígenos determinada em placas de ELISA com 1,4 µg de partículas DENV2 JHA1 purificadas e submetidas, posteriormente, a um passo de dissociação com diferentes concentrações de tiocianato de amônio (0,025M – 4M). A linha pontilhada indicada do ponto em que a quantidade de tiocianato de amônio dissocia 50% dos anticorpos ligados às partículas DENV2. (C) Os anticorpos produzidos em camundongos submetidos à imunização pela via TC se ligam preferencialmente a epítopos conformacionais das partículas de DENV2. As placas de ELISA foram preparadas com partículas de vírus submetidas, ou não, a um tratamento de desnaturação por calor (100 °C durante 10 min). Misturas de soros de cada um dos grupos de imunização, colhidos duas semanas após a última dose de vacina (dia 42), foram testadas. A análise estatística foi realizada por ANOVA 2way em associação com pós-teste de Bonferroni \* p <0,05.

#### 4.8 Avaliação da imunidade protetora em camundongos submetidos à imunização pela via TC com partículas de JHA1 purificadas

Para o esclarecimento da capacidade neutralizante dos soros gerados após a imunização com formulações vacinais contendo JHA1 purificado, foram feitos ensaios de soroneutralização *in vitro* utilizando a cepa NGC de DENV2. De forma semelhante aos ensaios utilizando vírus inativados, foi utilizado o anticorpo monoclonal 1A10 como controle positivo de neutralização (TAB 4). De forma semelhante aos experimentos anteriores, não se observou níveis de redução de placas virais em nenhuma das amostras de soro testadas (TAB 3). A deficiência dos anticorpos em neutralizar partículas virais *in vitro* nos levou a avaliar o potencial neutralizante dos

anticorpos em condições *in vivo* tanto em ensaios de soroneutralização com animais não imunizados como em ensaios de proteção com animais vacinados.

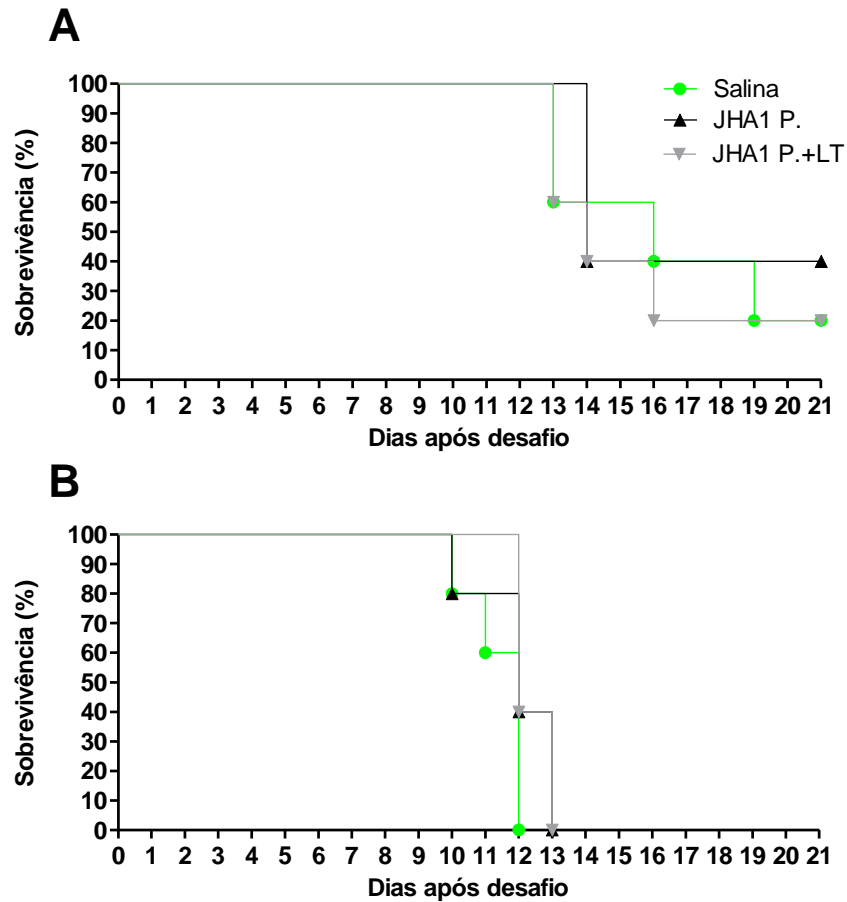
**Tabela 4 - Determinação *in vitro* dos níveis neutralizantes de anticorpos (PRNT<sub>50</sub>) obtidos após o regime vacinal com partículas purificadas de JHA1 após imunização pela via TC.**

Grupos de imunização	Cepa viral	Título de IgG	Cepa viral	Título de IgG	PRNT <sub>50</sub> <sup>1</sup>
V.P+LT 3 <sup>a</sup> dose	JHA1	145913	NGC	60815	ND <sup>2</sup>
V.P. 3 <sup>a</sup> dose	JHA1	12731	NGC	9012	ND
Salina 3 <sup>a</sup> dose	JHA1	14	NGC	14	ND
Controle positivo (1A10)	JHA1	ND	NGC	ND	2560 <sup>3</sup> (~0,04 µg)

<sup>1</sup>Valores obtidos após a comparação da quantidade de placas de lise em relação aos valores obtidos em amostras não submetidas ao tratamento com os anticorpos. Foram utilizadas amostras de soro da última dose vacinal das imunizações feitas com o vírus purificado, coadministrado ou não com o adjuvante LT. <sup>2</sup> Valores não determinados. <sup>3</sup> Diluição neutralizante máxima.

Os dois ensaios *in vivo* realizados confirmaram a falta de proteção observada nos experimentos anteriores e não conferiram proteção a animais BALB/c e submetidos a desafios letais com o JHA1. Novamente, tanto a soroneutralização *in vivo* (n=5) (FIG 12A), quanto o ensaio de desafio (FIG 12B) demonstraram que os anticorpos gerados com partículas purificadas viáveis não possuem capacidade neutralizante contra a cepa JHA1.

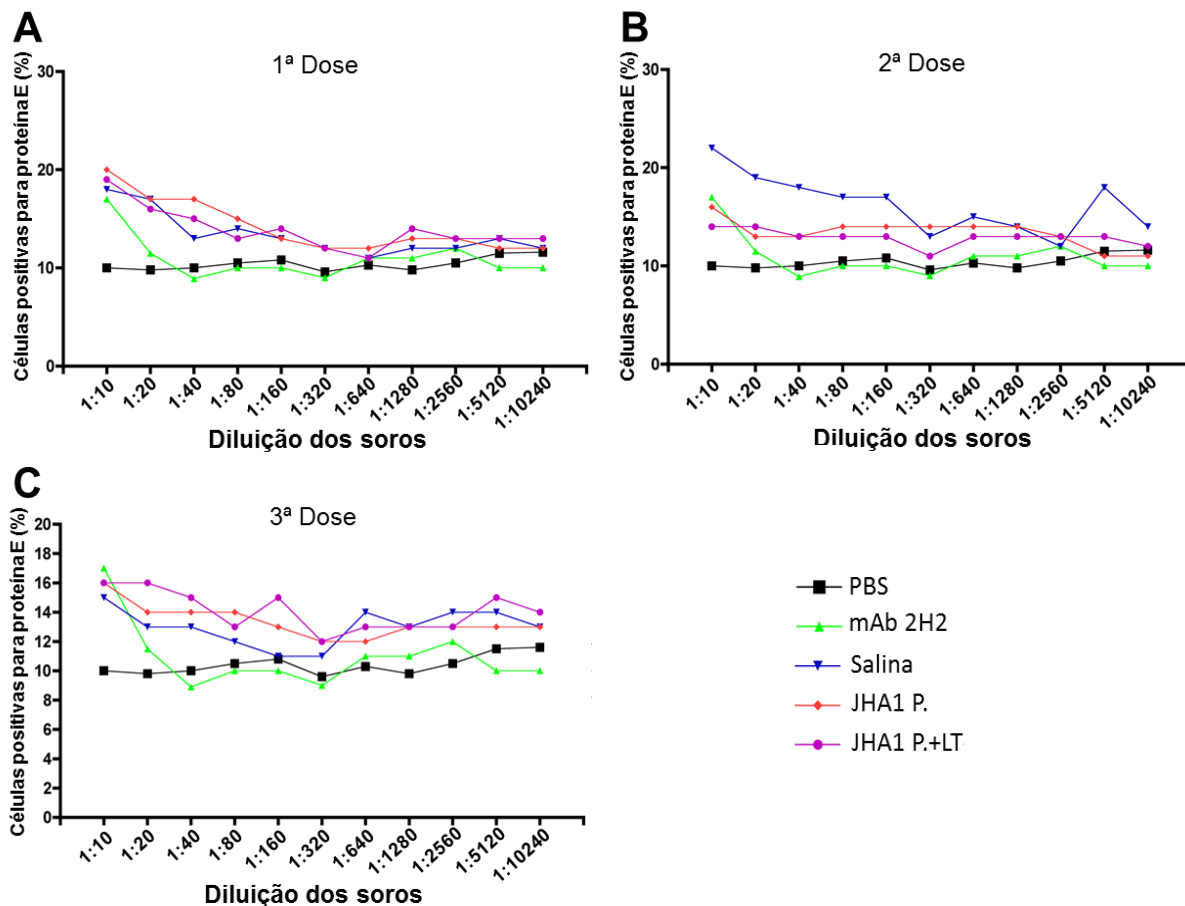




**Figura 12 - Ensaio de soroneutralização *in vivo* e curva de sobrevivência de camundongos imunizados pela via TC com partículas purificadas da cepa JHA1 e submetidos a desafio letal com a cepa JHA1.** (A) Curva de sobrevivência de camundongos não imunizados e desafiados com a cepa JHA1 previamente incubada com soro de animais imunizados pela via TC. Grupos de camundongos BALB/c (n=5) foram desafiados pela via i.c. com uma mistura contendo vírus DENV2 (50 UFP) previamente incubado na presença de soro obtido de animais imunizados pela via TC na diluição 1/10. Para esse ensaio foram utilizadas alíquotas de soro obtidas no dia 42 do regime vacinal e que correspondem à resposta imunológica humoral induzida duas semanas após a última dose. (B) Duas semanas após a última dose do regime vacinal (dia 42) os grupos de animais imunizados (n=10) foram desafiados pela via i.c. com 50 UFP do vírus JHA1. A sobrevivência dos animais foi avaliada ao longo de 21 dias. (Mantel-Cox).

Para avaliar se a mudança da pureza das formulações vacinais afetou o potencial de infecção de células possuidoras de receptores para a porção Fc dos anticorpos, repetimos o ensaio de ADE com amostras de soro da imunização feita com vírus viáveis purificados. Ainda em busca de possíveis janelas de proteção, foram avaliadas misturas de soros das 1<sup>a</sup> (FIG 13A), 2<sup>a</sup> (FIG 13B) e 3<sup>a</sup> doses (FIG 13C) do protocolo vacinal. Como observado na Figura 13, mais uma vez observamos que as amostras de soro testadas promoveram a exacerbação da infecção em relação

à amostra de soro do grupo controle negativo. Concluímos que os anticorpos gerados não apresentam potencial neutralizante e apresentam potencial para levar ao fenômeno de ADE.

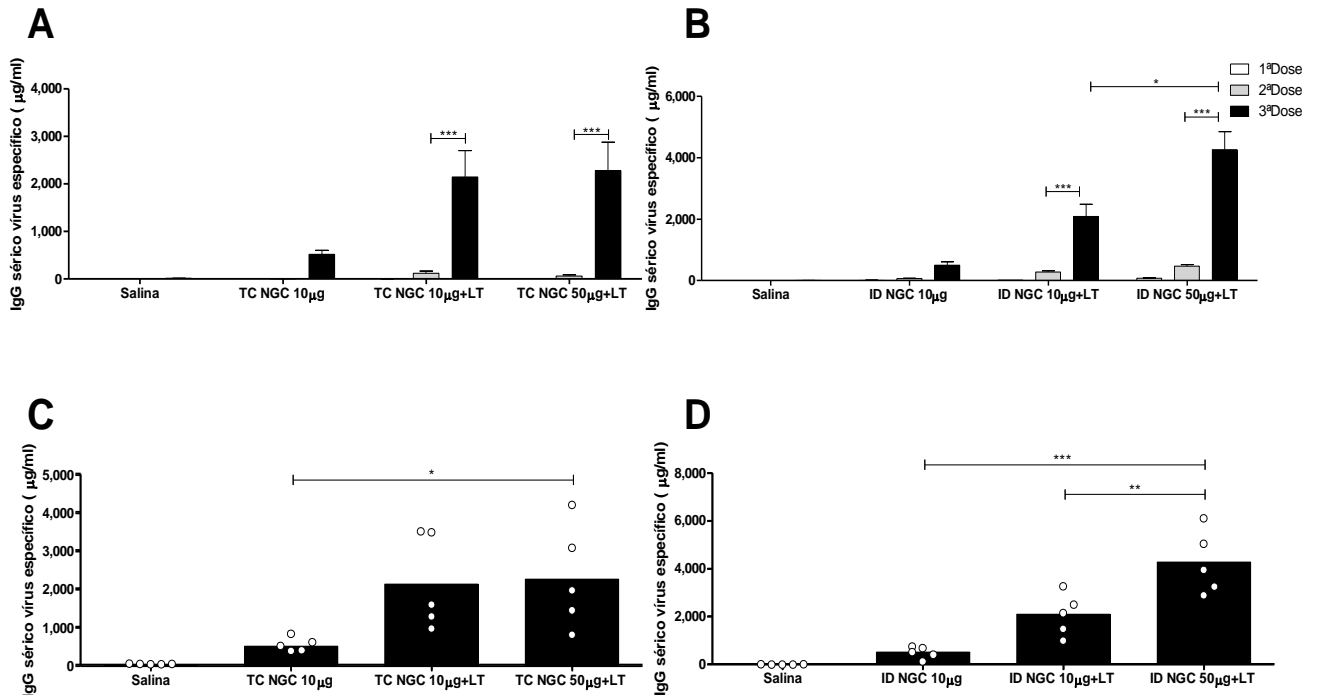


**Figura 13 - Avaliação dos soros obtidos quanto à indução do fenômeno de ADE.** Misturas de soros das 1ª, 2ª e 3ª doses (A-C) foram diluídas em  $\log_2$  para a avaliação do perfil neutralizante dos anticorpos gerados após a imunização de camundongos BALB/c (n=5) pela via TC com partículas purificadas de JHA1. Células U937 foram infectadas com NGC opsonizados com os soros obtidos durante o protocolo vacinal. O anticorpo monoclonal 2H2 foi utilizado como controle positivo de aumento de infecção. Partículas virais expostas ao tampão PBS foram utilizadas para estabelecer a infecção de referência (controle negativo). As células foram permeabilizadas e marcadas para a presença da proteína E de DENV com a utilização de anticorpos monoclonais 4G2, específicos para flavivírus.

#### 4.9 Indução de respostas contendo anticorpos séricos específicos contra partículas purificadas de DENV2 NGC em camundongos submetidos à imunização pelas vias TC e ID

Para avaliarmos se o isolado viral poderia influenciar na geração de respostas protetoras após imunização pela via TC, realizamos um novo ensaio de imunização com partículas virais da cepa NGC de DENV2 como antígeno vacinal (n=5). Além disso, para aumentamos testamos um novo grupo de imunização que recebeu 50  $\mu$ g de partículas virais. O novo ensaio foi baseado em

grupos imunizados com LT visto que nos experimentos anteriores ficou claro o papel importante do adjuvante na indução de respostas imunológicas. Paralelamente, testamos uma via parenteral (ID) como forma de comparar os resultados obtidos em camundongos BALB/c submetidos à imunização pela via TC. Os grupos de imunização passaram por tratamento idêntico e foram submetidos ao mesmo regime vacinal. Os resultados revelaram que as respostas de IgG DENV2-específicas foram maiores com o JHA1 (FIGS 5 e 10A) do que com o NGC (FIG 14A) após imunização pela via TC. A comparação das imunizações feitas pelas duas vias (TC e ID) indicou que ambas as vias de imunização necessitam de 3 doses vacinais para elevar quantidades significativas de anticorpos específicos contra as partículas virais (FIGS 14A e 14B). Além disto, os valores finais de IgG específico foram um pouco maiores nos animais imunizados pela via ID (FIG 14B). Adicionalmente, foi observada a saturação das respostas humorais específicas induzidas após imunização pela TC com a menor quantidade de antígeno testada, uma vez que não observamos aumento na produção de anticorpos quando comparados os grupos que receberam 10  $\mu$ g e 50  $\mu$ g de partículas virais (FIG 14C). O mesmo não se observou na imunização pela via ID na qual o aumento da quantidade de antígeno levou a aumento significativo na resposta de anticorpos específicos (FIG 14D). De um modo geral, o resultado demonstra que as duas vias de imunização levaram a respostas imunológicas semelhantes, em termos quantitativos, contra os antígenos administrados.



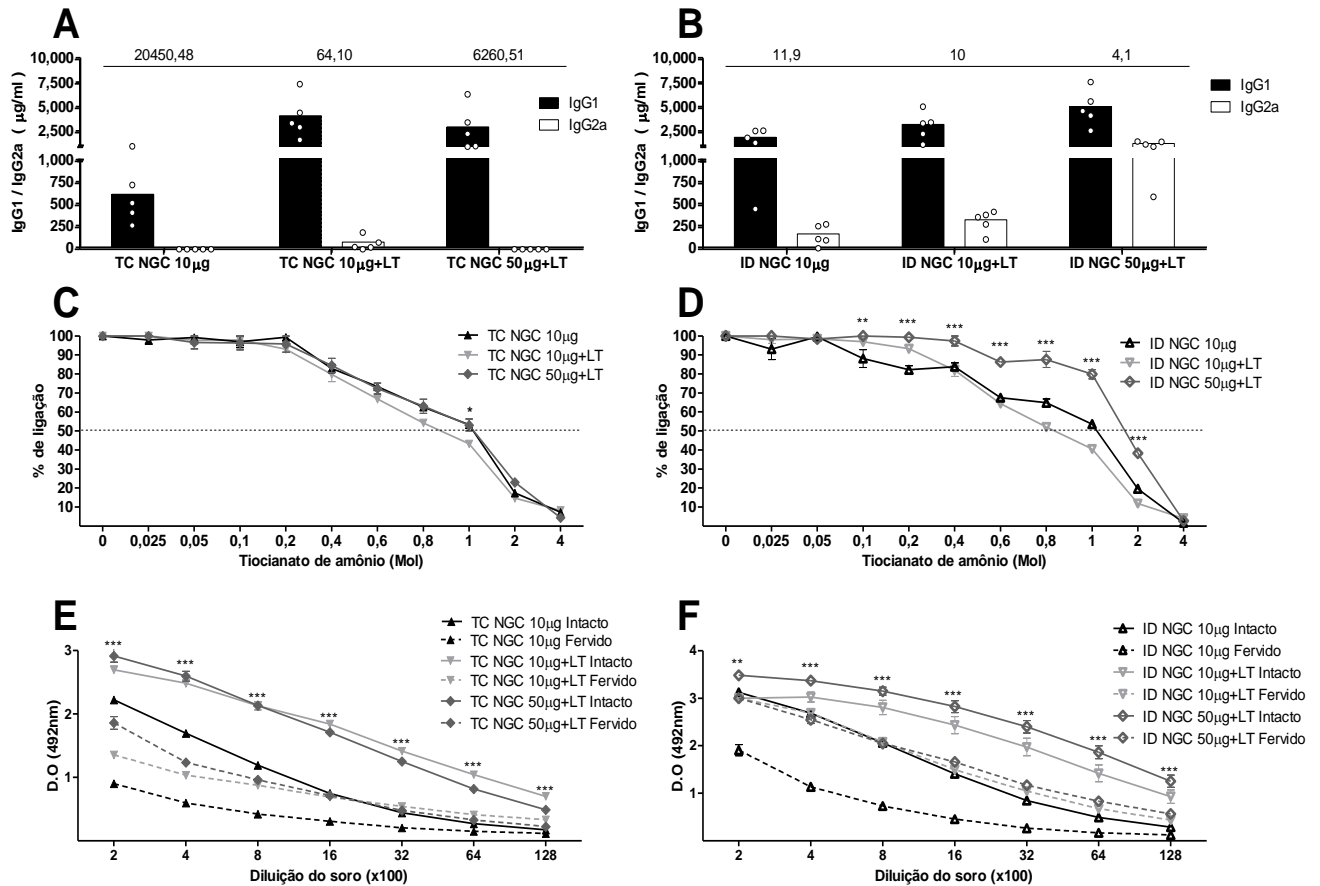
**Figura 14 - Respostas humorais sistêmicas desencadeadas após administração pela via TC e ID de partículas de NGC em associação com LT como adjuvante.** Soros individuais de camundongos BALB/c imunizados (n=5/grupo) com partículas de NGC (10 µg ou 50 µg /dose), coadministradas ou não a LT (10 µg/dose), pelas vias TC ou ID foram utilizadas para detecção de IgG específico em ELISA. (A) Níveis de IgG anti-DENV2 NGC encontrados duas semanas após cada uma das doses do regime vacinal aplicado pela via TC. (B) Níveis de IgG anti-DENV2 NGC encontrados duas semanas após cada uma das doses do regime vacinal aplicado via ID. (C) Valores médios (barras pretas) e individuais (círculos brancos) de IgG sérica DENV2-específico duas semanas após a última dose vacinal (dia 42) aplicada pela via TC. (D) Valores médios (barras pretas) e individuais (círculos brancos) de IgG sérico DENV2-específico duas semanas após a última dose do regime vacinal (dia 42) aplicado pela via ID. Os regimes vacinais consistiram de 3 doses, administradas com intervalo de 2 semanas (dias 0, 14 e 28). \*\*\*p<0,001. (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni).

#### 4.10 Caracterização da resposta humoral de camundongos submetidos à imunização pelas vias TC e ID com partículas virais de NGC

A caracterização das respostas humorais obtidas após imunização com vírus da cepa NGC seguiu a mesma metodologia utilizada nas imunizações com o isolado JHA1. As respostas de subclasses de IgG nos animais submetidos à TC variaram de forma surpreendente (FIG 15A). As maiores variações foram observadas no grupo sem adjuvante e entre os grupos que receberam 10 µg e 50 µg na presença de LT. Em geral, as respostas de IgG2a foram muito baixas ou ausentes. Os animais imunizados pela via ID apresentaram respostas mais balanceadas, mas ainda com padrão Th2, sendo a razão IgG1/IgG2a diminuída à medida que se aumentou a quantidade de antígeno (FIG 15B).

O padrão de resposta dos camundongos submetidos à imunização pela via TC, no que se diz à avididade dos anticorpos ao antígeno, se mostrou semelhante entre os grupos sendo que a introdução do adjuvante não mostrou qualquer efeito (FIG 15C). A reatividade dos anticorpos gerados pelos animais que não receberam adjuvante necessitou de 0,97M para ser reduzida em 50%, enquanto os resultados nos grupos que receberam 10 µg e 50 µg do antígeno coadministrado com LT necessitaram de 1,13M e 1,25M respectivamente. Nos animais imunizados pela via ID nota-se o papel importante de LT na elevação da avididade dos anticorpos IgG-específicos ao antígeno (FIG 15D). Esse aumento pode também ser observado com a mudança da quantidade de antígeno administrado, sendo necessário adicionar 0,85M de tiocianato de amônio no grupo sem adjuvante e 1,10M e 1,67M nos grupos que receberam o adjuvante e 10 µg ou 50 µg de antígeno, respectivamente.

O reconhecimento preferencial de epítomos conformacionais foi marcante em ambas as vias (FIGS 15E e 15F), sendo observadas reduções de reatividades quando o antígeno utilizado nas placas de ELISA era desnaturado. A diferença estatística esteve presente desde a primeira até a última diluição dos soros de camundongos imunizados tanto pela via TC quanto pela via ID (FIGS 15E e 15F). Os dados obtidos nas duas vias confirmaram que a mudança de antígeno reproduziu os dados obtidos com o isolado JHA1, mas com alterações interessantes na qualidade da resposta, como demonstrado pelas respostas de subclasses de IgG e avididade ao antígeno.



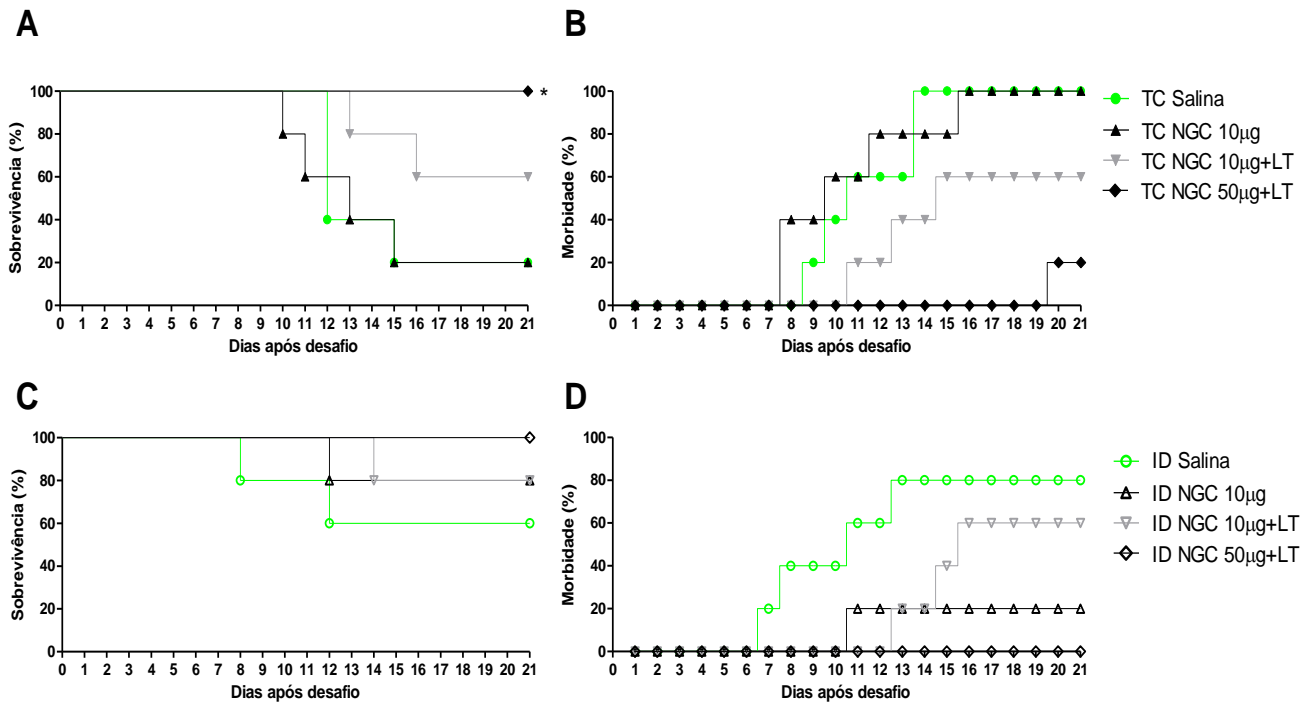
**Figura 15 - Caracterização das respostas humorais de camundongos imunizados pelas vias TC e ID com partículas de NGC, coadministradas ou não, com LT.** (A e B) Subclasses de IgG sérico em camundongos submetidos à imunização pela via (A) TC ou (B) ID. As barras representam a média e os círculos os valores individuais dos níveis de subclasses de IgG detectados em soros colhidos duas semanas após a última dose de imunização (dia 42). Os valores na parte superior da figura representam a razão de IgG1/IgG2a de cada grupo de imunização. (C e D) Avidéz dos anticorpos de camundongos submetidos à imunização pela via (C) TC ou (D) ID contra seus antígenos. A determinação de avidéz foi feita em placas de ELISA com 1,4 µg de partículas DENV2 NGC submetidas, posteriormente, a um passo de dissociação com diferentes concentrações de tiocianato de amônio (0,025M – 4M). A linha pontilhada indica o ponto em que a quantidade de tiocianato de amônio dissocia 50% dos anticorpos ligados às partículas DENV2. (E e F) Os anticorpos produzidos em camundongos submetidos à imunização pela via (E) TC ou (F) ID se ligam preferencialmente a epítomos conformacionais das partículas de DENV2. As placas de ELISA foram preparadas com partículas de vírus submetidas, ou não, a um tratamento de desnaturação por calor (100 °C durante 10 min). Foram testadas misturas de soros de cada um dos grupos de imunização colhidos duas semanas após a última dose de vacina (dia 42). A análise estatística foi realizada por ANOVA 2way em associação com pós-teste de Bonferroni \* p < 0,05.

#### 4.11 Avaliação da imunidade protetora conferida a camundongos submetidos à imunização pelas TC ou ID com partículas virais da cepa NGC

A determinação da capacidade protetora das respostas geradas frente às imunizações pelas vias TC ou ID com NGC foi feita por meio de desafio letal com o mesmo vírus. Para isso foi utilizada a dose letal definida previamente para camundongos BALB/c. A mudança do antígeno

vacinal e do vírus empregado no desafio possibilitou a obtenção de respostas protetoras de forma significativa quando comparadas com o grupo controle de imunização (FIG 16A). Apenas os grupos que receberam o adjuvante LT apresentaram níveis de proteção elevados em relação ao controle mesmo não havendo diferença significativa entre as respostas geradas pelos grupos que receberam diferentes quantidades de antígeno, o grupo que recebeu 50 µg de partículas virais apresentou 100% de sobrevivência, seguido por apenas 60% do que recebeu 10 µg (FIG 16A).

Foi possível observar diferentes graus de morbidade nos camundongos desafiados. No grupo controle, 80% dos animais sucumbiram ao desafio letal, porém 100% dos camundongos apresentaram pelo menos grau 1 de morbidade (FIGS 16A e 16B). De forma concordante, o grupo que recebeu 50 µg de antígeno apresentou o menor índice de morbidade, com apenas um animal positivo (20%) no dia 20 após o desafio. O grupo que recebeu 10 µg de antígeno teve morbidade exatamente igual ao valor de mortalidade (60%). O desafio feito nos animais imunizados pela via ID apresentou comportamento semelhante ao observado nos camundongos imunizados pela via TC, porém, o grupo controle apresentou apenas 40% de mortalidade (FIG 16C). Foi observado 100% de sobrevivência no grupo que recebeu 50 µg de antígeno e 80% no que recebeu 10 µg de antígeno coadministrado com LT, mas não houve diferença estatística devido à grande proporção de sobreviventes do grupo controle (FIG 16C). Em termos de morbidade 100% do grupo controle apresentou algum grau de resposta após o desafio, enquanto que todos os camundongos do grupo de 50 µg de antígeno foram protegidos (FIG 16D). Por outro lado, os animais que receberam LT e 10 µg de vírus apresentaram 60% de morbidade contra 20% do grupo em que o adjuvante não foi administrado (FIG 16D).



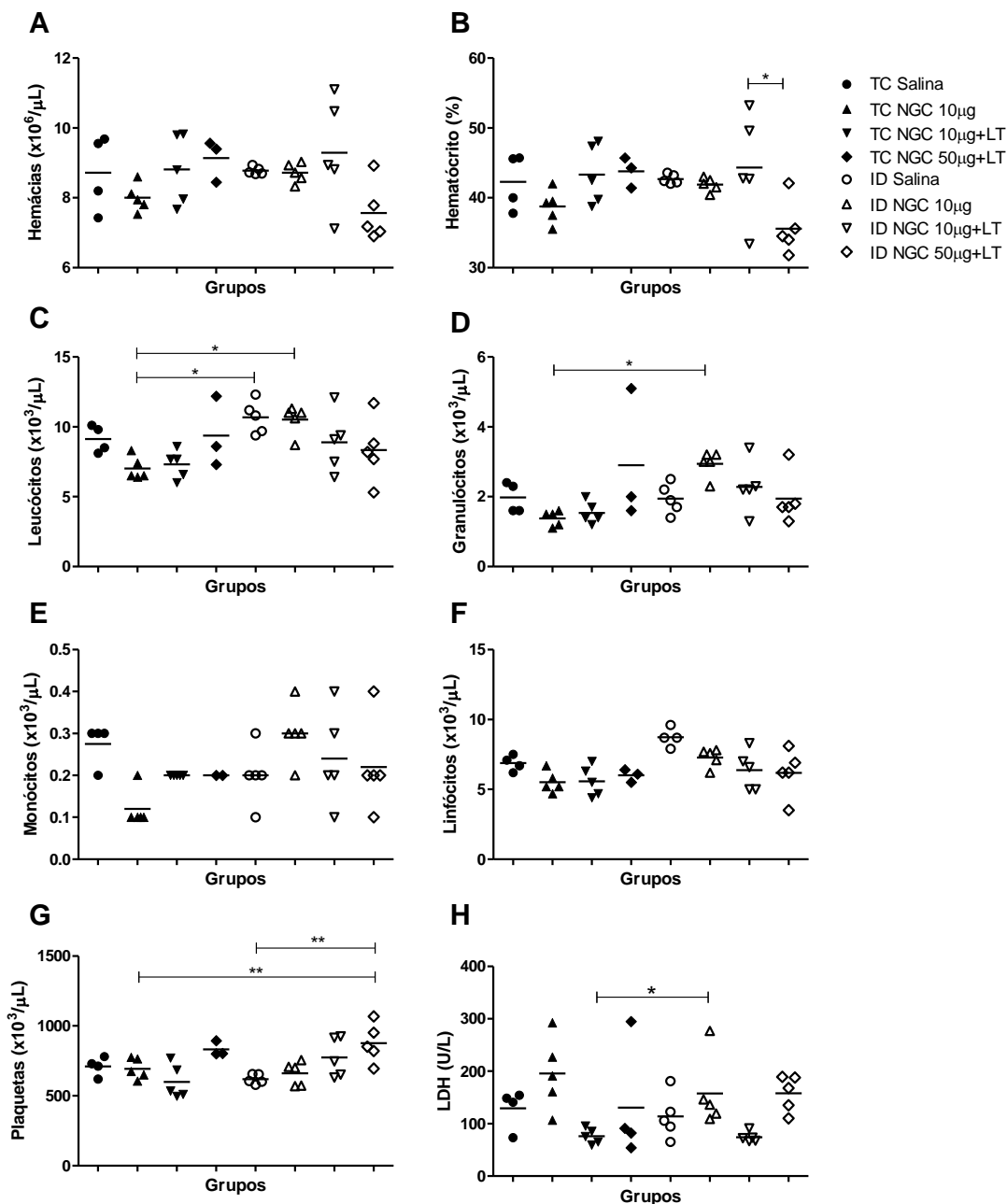
**Figura 16 - Curvas de sobrevivência e morbidade em camundongos imunizados pelas vias TC e ID com partículas de NGC, em associação ou não com LT, após desafio com NGC.** (A e B) Curvas de sobrevivência e morbidade de camundongos imunizados pela via TC e desafiados com NGC. Duas semanas após a última dose do regime vacinal (dia 42) os grupos de animais imunizados (n=5) foram desafiados pela via i.c. com  $1 \times 10^6$  UFP de DENV2 NGC. (A) A sobrevivência dos animais foi avaliada ao longo de 21 dias. (B) A evolução de fraqueza muscular, paralisia de membros, arqueamento da coluna e paralisia total foi observada durante o mesmo período. (C e D) Curvas de sobrevivência e morbidade de camundongos imunizados pela via ID e desafiados com NGC. Duas semanas após a última dose (dia 42) os grupos de animais imunizados (n=5) foram desafiados pela via i.c. com  $1 \times 10^6$  UFP do NGC. (C) A sobrevivência dos animais foi avaliada ao longo de 21 dias. (D) A evolução de fraqueza muscular, paralisia de membros, arqueamento da coluna e paralisia total foi observada durante o mesmo período. (Mantel-Cox).

#### 4.12 Avaliação de possíveis efeitos adversos decorrentes das imunizações pelas vias TC ou ID com partículas de NGC

Foram avaliadas alterações no hemograma completo ou nas concentrações séricas da enzima LDH nos camundongos imunizados. A avaliação de todos os parâmetros testados não mostrou nenhuma característica deletérea decorrente das imunizações, seja pela via TC ou ID (FIG 17A-H). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos de administração, sendo algumas discrepâncias encontradas nos animais que se submeteram a imunizações por diferentes vias, mas todos os valores observados mantiveram-se abaixo dos valores considerados relevantes clinicamente (FIGS 17C, 17D, 17G e 17H). Conclui-se que as formulações utilizadas não



apresentaram efeito deletéreo após administração acamundongose, portanto, podem ser consideradas seguras.



**Figura 17 - Avaliação de possíveis efeitos adversos após a administração das formulações vacinais com NGC pelas vias TC e ID.** Amostras de sangue e soro de camundongos imunizados pelas vias TC ou ID (n=5) foram coletadas 48h após a administração da última dose do protocolo de imunização (dia 30). Foram avaliados parâmetros de hemograma (A-G), além do marcador de lesão tecidual LDH. (H). A análise estatística foi realizada por ANOVA 2way em associação com pós-teste de Bonferroni \* p < 0,05.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar do elevado número de publicações que reportaram o uso da via TC para a imunização com diferentes antígenos bacterianos e virais (30–35,66–74), não há relatos publicados sobre a utilização desta via para a administração de formulações vacinais com antígenos de DENV. O presente trabalho mostra que respostas imunológicas podem ser geradas contra antígenos de DENV por meio da utilização de um método não invasivo de aplicação tópica. Observamos que a aplicação do método mostrou resultados promissores com partículas virais inativadas em relação à formulação contendo uma proteína recombinante (EDIII). Os resultados obtidos demonstram que houve aumento na resposta humoral específica contra o DENV. Confirmamos a necessidade da administração de um número mínimo de 3 doses vacinais para elevar a resposta humoral a níveis máximos em modelo experimental, o que está de acordo com outros trabalhos que utilizaram a via TC com antígenos virais (31,33,35,75). Também confirmamos a necessidade de incorporar-se um adjuvante de mucosa (LT) aos adesivos vacinais para a correta estimulação do sistema imunológico dos animais. Adicionalmente, quando comparada com uma via parenteral, a via TC mostrou-se capaz de induzir níveis semelhantes de proteção frente a desafio letal (cepa de DENV2 NGC). Em suma, o presente estudo confirma a viabilidade da via TC como alternativa para a administração de vacinas contra a dengue.

Relatos prévios mostraram que a imunização com partículas inativadas de DENV induzem respostas imunológicas em camundongos quando administrados por vias parenterais (76,77). Além disto, apenas uma pequena fração dos anticorpos gerados é direcionada contra o domínio III da proteína E (21,78–81). Foi observado que a depleção de anticorpos direcionados contra esse ectodomínio é irrelevante para a neutralização viral, e por vezes, estes podem até mesmo induzir o fenômeno de ADE (dados não publicados), o qual resulta em uma maior carga de infecção viral dentro das células infectadas devido a presença de partículas opsonizadas, mas subneutralizadas, para o interior de células com receptores do tipo  $FC\gamma$  (82). Tais achados podem explicar a falta de proteção encontrada nos ensaios feitos com partículas virais em alguns dos testes feitos.

Os estudos que utilizam partículas virais como antígeno, normalmente possuem doses vacinais contendo de 5  $\mu$ g a 10  $\mu$ g de vírus como dose padrão (76,83). Porém, como a

absorção de antígenos de DENV pela via TC não havia sido caracterizada, investigamos o uso de quantidades maiores na formulação (50 µg/dose). A via ID teve a resposta potencializada com o aumento da quantidade de antígeno, demonstrando a grande capacidade de sinergia na ativação das células em linfonodos drenantes, seja pela migração do antígeno, seja pela apresentação via células apresentadoras de antígenos (APCs) (como as LCs) (84). O mesmo não foi observado nos grupos imunizados via TC, que apresentaram respostas de menor magnitude, contrastando com relato anterior de comparação entre as vias TC e i.m. (85). Ambas as vias mostraram-se dependentes da adição de adjuvantes para atingir o nível máximo da produção de anticorpos, corroborando observações anteriores (40). Contudo, quando avaliados os grupos que receberam apenas 10 µg de antígeno, os níveis de anticorpos produzidos pelas duas vias foram comparáveis demonstrando que, na dose padrão de estudo, a via TC é capaz de induzir respostas imunológicas antígeno-específicas de magnitude semelhante ao que pode ser obtidos por meio de vias parenterais.

Associada à magnitude das respostas de anticorpos está a modulação das respostas imunológicas provocada pela administração dos antígenos. Para isso, foram analisados os níveis das subclasses de IgG1 e IgG2a presentes no soro dos camundongos imunizados, como indicativo de uma tendência de modulação para respostas do tipo Th2 ou Th1, respectivamente. Os resultados obtidos são consistentes com a literatura ao se observar os altos níveis de IgG1 e de IgG2a após administração pela via ID (86,87). Ficou clara tendência de modulação para perfil Th2 quando utilizada a via TC, com altos níveis de IgG1 sendo produzidos, o que indica que a TC modula preferencialmente respostas humorais com um perfil Th1 (30,88–90). O papel da LT pôde ser observado na diminuição das razões de IgG1/IgG2a observadas, confirmando sua característica de induzir respostas imunológicas mais balanceadas em termos de ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (54). Adicionalmente, a capacidade da via TC em levar à apresentação cruzada de antígenos virais (91), o que pode explicar a ação da LT na geração de IgG2a em uma menor quantidade. Portanto, a LT se mostrou necessária para um maior desenvolvimento da resposta do tipo Th1, decorrente da vacinação pela via TC, envolvimento esse já apontado como possível fator chave no controle da infecção por DENV (92).

As respostas de anticorpos anti-DENV são usualmente estudadas no que se diz à capacidade de neutralização viral. Há relatos que mostram a relação entre a avidéz dos

anticorpos e sua eficiência no controle de infecções (93), bem como casos nos quais um maior índice de severidade da doença se correlacionou com anticorpos com menor avidéz pelas partículas de DENV (94). Também foram feitos relatos recentes sobre anticorpos anti-DENV que podem se ligar com baixa avidéz ao vírus Zika (ZIKV) e provocar o fenômeno de ADE (95). A TC utilizando JHA1 inativado coadministrado com LT não levou a diferenças na avidéz dos anticorpos específicos quando comparada com os grupos imunizados sem adjuvante, o que contrasta com relatos anteriores LT mutantes (96,97). Contudo, os resultados obtidos a partir da imunização com partículas de JHA1 purificadas e partículas de NGC mostraram um aumento significativo na avidéz dos anticorpos gerados, mesmo pela via ID, o que evidencia o papel da qualidade do antígeno na melhora da resposta humoral e a importância da incorporação de LT. O aumento da avidéz dos anticorpos produzidos por vacinação é um importante aspecto para o controle da dengue e deve ser um dos fatores acompanhados durante a avaliação vacinal.

Entre os flavivírus, os anticorpos direcionados contra a proteína E aparentam ter uma especificidade dependente da conformação da proteína (78,98–100). Isso explicaria a diminuição da reatividade dos anticorpos específicos em placas de ELISA sensibilizadas com partículas de JHA1 ou NGC desnaturadas pelo calor, independente da via de administração. A literatura mostra também que a integridade do antígeno é essencial para a elevação de respostas imunológicas (69). Portanto, a inativação dos vírus a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  possivelmente tem uma melhor apresentação antigênica ao sistema imunológico quando comparada com a inativação por aumento da temperatura, enquanto que a apresentação das partículas virais íntegras e/ou purificadas de vírus atenuados seria ainda mais adequada. Isso se comprova na observação das vacinas mais em evidencia para a prevenção da dengue, seja aquela disponível para uso em humanos (101) seja aquela em estágio de teste clínico fase 3 (102), as quais são baseadas na administração de vírus com a estrutura antigênica preservada.

Observamos que tanto partículas inativadas quanto viáveis de JHA1 não foram capazes de induzir proteção frente ao desafio letal em camundongos imunizados pela via TC. O JHA1 consiste em um isolado viral contendo várias populações distintas de vírus, com diversas modificações entre elas (dados não publicados). Essas variações poderiam levar à geração de anticorpos contra regiões conservadas do vírus, como já observado em respostas

celulares (103), mas que não são necessariamente neutralizantes. Nesse caso, uma grande quantidade de anticorpos subneutralizantes permitiria a entrada dos vírus em células possuidoras de receptores FC $\gamma$ , exacerbando a infecção, o que foi observado e confirmado pelos ensaios de ADE. Uma segunda hipótese se baseia na neurovirulência acentuada da cepa JHA1 (55), que poderia constituir uma barreira significativa para se atingir níveis de proteção vacinal. Outros trabalhos evidenciaram que imunizações utilizando partículas virais de cepas de DENV por diferentes vias de administração induzem proteção (65,77,104,105), indicando que o vírus JHA1 como vírus de desafio possivelmente subestima os níveis protetores das vacinas testadas.

Como avaliação das hipóteses levantadas, partimos para mudanças nas formulações vacinais e no vírus para uso no desafio letal, como resultado obtivemos resultados positivos no quadro de proteção observado após as imunizações. A utilização de um vírus que provoca doença de forma menos abrupta nos camundongos permitiu a observação de quadros de morbidade que corroboraram os observados na literatura (106). A escolha da dose desafio também seguiu a literatura, visto que o NGC é característico por apresentar uma variação na sobrevivência nos animais não imunizados submetidos a desafio letal (104,106,107). Os resultados demonstraram que o percentual de sobrevivência do grupo controle varia de 20% a 60%, porém, com o aspecto de morbidade todos os camundongos apresentaram-se afetados. De forma interessante, mesmo não sendo observada nenhuma diferença entre os níveis de resposta, ou qualidade da resposta humoral gerada, apenas o grupo que recebeu 50  $\mu$ g de vírus pela via TC foi capaz de atingir 100% de sobrevivência frente ao desafio, o que indica que provavelmente algum componente da resposta celular pode ter sido melhor ativado com o aumento da quantidade de antígeno. Novamente, a via TC mostrou ser eficiente na geração de respostas DENV-específicas e com capacidade de induzir imunidade protetora, podendo ser considerada uma alternativa válida em relação à imunização por outras vias.

Monitoramos diferentes parâmetros fisiológicos na busca de evidências sobre a indução de efeitos adversos associados à formulação vacinal testada. Para isso, coletou-se sangue e soro dos camundongos 48h após a administração das vacinas, período no qual há a maior reação inflamatória, particularmente estudos com LT (63). Não foram encontradas alterações hematológicas e enzimáticas que apontassem a incidência de efeitos deletérios

entre os grupos de imunização pela via TC, o que demonstra a capacidade da via em expressar o poder adjuvante da LT sem sofrer com eventuais efeitos inflamatórios. De forma interessante, a via ID apresentou também efeitos colaterais reduzidos com a administração do adjuvante, porém, a redução do hematócrito atingiu diferença estatística e, em alguns aspectos, pode-se notar uma tendência de possíveis alterações.

## 6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos pôde-se concluir que a via TC é capaz de gerar respostas imunológicas humorais em níveis elevados contra antígenos de dengue, sendo o adjuvante LT fundamental na potencialização e modulação das respostas geradas. Adicionalmente, vacinas baseadas em DENV2 NGC e desafiadas com o mesmo vírus induziram proteção em camundongos BALB/c imunocompetentes quando administradas pela via TC, porém, o mesmo não foi observado quando utilizado DENV2 JHA1. As vias TC e ID mostraram-se comparáveis em termos de proteção, sendo maior a robustez da resposta observada na via ID, e os menores efeitos deletérios causados pelas vacinas administradas pela via TC. Desta forma, o presente estudo demonstra que a utilização da via TC com antígenos de DENV é válida. Além disso, o emprego desta via de imunização traz vantagens econômicas e psicológicas, para o usuário, que devem ser consideradas.

## REFERÊNCIAS\*

1. Chaves-Carballo E. Carlos Finlay and yellow fever: triumph over adversity. *Mil Med.* 2005;170(September 2004):881–5.
2. Gubler DJ. Flaviviruses: Past, Present and Future. In: Shi P-Y, editor. *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*. 1st ed. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2012. p. 1–7.
3. Fares RCG, Souza KPR, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/321873/>
4. Cafferata ML, Bardach A, Rey-Ares L, Alcaraz A, Cormick G, Gibbons L, et al. Dengue Epidemiology and Burden of Disease in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Value Heal Reg Issues* [Internet]. 2013 Dec;2(3):347–56. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212109913001295>
5. Stahl H-C, Butenschoen VM, Tran HT, Gozzer E, Skewes R, Mahendradhata Y, et al. Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies. *BMC Public Health* [Internet]. *BMC Public Health*; 2013;13(1):1048. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195519>
6. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;496(7446):504–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3651993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Constenla D, Garcia C, Lefcourt N. Assessing the Economics of Dengue: Results from a Systematic Review of the Literature and Expert Survey. *Pharmacoeconomics* [Internet]. 2015 Jun 6 [cited 2015 Jun 19]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26048354>
8. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2016 Feb 13];5(7):518–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558424>
9. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):480–96.
10. World Health Organization (WHO). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis* [Internet]. :x, 147. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf)
11. SMITH CEG. Isolation of three strains of type 1 dengue virus from a local outbreak of the disease in Malaya. *J Hyg (Lond).* 1956 Dec;54(4):569–80.
12. DIERCKS FH. Isolation of a type 2 dengue virus by use of hamster kidney cell cultures. *Am J Trop Med Hyg.* 1959 Jul;8(4):488–91.
13. MYERS RM, CAREY DE, RODRIGUES FM, KLONTZ CE. THE ISOLATION OF DENGUE TYPE 4 VIRUS FROM HUMAN SERA IN SOUTH INDIA. *Indian J Med Res.* 1964 Jun;52:559–65.
14. Chan YC, Kanapathipillai K, Chew KS. Isolation of two strains of dengue virus type 3 in Singapore. *Singapore Med J.* 1965 Sep;5(3):127–32.
15. Blok J. Genetic relationships of the dengue virus serotypes. *J Gen Virol.* 1985 Jun;66 ( Pt 6):1323–5.
16. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;5(4):318–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)



17. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010 Aug [cited 2015 Oct 29];67(16):2773–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372965>
18. van der Schaar HM, Rust MJ, Waarts B-L, van der Ende-Metselaar H, Kuhn RJ, Wilschut J, et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol*. 2007;81(21):12019–28.
19. Ren J, Ding T, Zhang W, Song J, Ma W. Does Japanese encephalitis virus share the same cellular receptor with other mosquito-borne flaviviruses on the C6/36 mosquito cells? *Virology* [Internet]. 2007;4(1):83. Available from: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-4-83>
20. Lozach P-Y, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier J-L, et al. Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN)-mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Jun 24;280(25):23698–708. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M504337200>
21. Wahala WMPB, Huang C, Butrapet S, White LJ, de Silva a. M. Recombinant Dengue Type 2 Viruses with Altered E Protein Domain III Epitopes Are Efficiently Neutralized by Human Immune Sera. *J Virol*. 2012;86(7):4019–23.
22. Wan S-W, Lin C-F, Wang S, Chen Y-H, Yeh T-M, Liu H-S, et al. Current progress in dengue vaccines. *J Biomed Sci* [Internet]. *Journal of Biomedical Science*; 2013;20(1):37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3686670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini IM. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;33(29):3293–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X15006313>
24. Kirschner N, Brandner JM. Barriers and more: Functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1257(1):158–66.
25. Madison KC. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’EOE tre” of the Epidermis. *J Invest Dermatol*. 2003;121(2):231–41.
26. Bal SM, Ding Z, Van Riet E, Jiskoot W, Bouwstra J a. Advances in transcutaneous vaccine delivery: Do all ways lead to Rome? *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;148(3):266–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.09.018>
27. Banga AK. Transcutaneous Immunization. In: *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group; 2006. p. 338–40.
28. Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* [Internet]. 2000 Jan;12(1):71–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10661407>
29. Lee MY, Shin MC, Yang VC. Transcutaneous antigen delivery system. *BMB Rep*. 2013;46(1):17–24.
30. Guo L, Qiu Y, Chen J, Zhang S, Xu B, Gao Y. Effective transcutaneous immunization against hepatitis B virus by a combined approach of hydrogel patch formulation and microneedle arrays. *Biomed Microdevices*. 2013;15(6):1077–85.
31. Cheng JY, Huang HN, Tseng WC, Li TL, Chan YL, Cheng KC, et al. Transcutaneous immunization by lipoplex-patch based DNA vaccines is effective vaccination against Japanese encephalitis virus infection. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;135(3):242–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.014>
32. Vrdoljak A, McGrath MG, Carey JB, Draper SJ, Hill AVS, O’Mahony C, et al. Coated microneedle arrays for transcutaneous delivery of live virus vaccines. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;159(1):34–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.026>

33. Matsuo K, Hirobe S, Yokota Y, Ayabe Y, Seto M, Quan YS, et al. Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;160(3):495–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.001>
34. Combadière B, Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Hadam S, Bonduelle O, et al. Preferential amplification of CD8 effector-T cells after transcutaneous application of an inactivated influenza vaccine: A randomized phase I trial. *PLoS One*. 2010;5(5).
35. El-Ghorr A a., Williams RM, Heap C, Norval M. Transcutaneous immunisation with herpes simplex virus stimulates immunity in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;29(4):255–61.
36. Karande P, Mitragotri S. Transcutaneous immunization: an overview of advantages, disease targets, vaccines, and delivery technologies. *Annu Rev Chem Biomol Eng* [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Apr 2];1:175–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22432578>
37. Xu J, Ding Y, Yang Y. Enhancement of Mucosal and Cellular Immune Response in Mice by Vaccination with Respiratory Syncytial Virus DNA Encapsulated with Transfersome. *Viral Immunol* [Internet]. 2008 Dec;21(4):483–90. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vim.2008.0044>
38. Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K, Quan Y-S, et al. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J Control Release* [Internet]. 2008 Oct;131(2):113–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365908003908>
39. Cheng J-Y, Huang H-N, Tseng W-C, Li T-L, Chan Y-L, Cheng K-C, et al. Transcutaneous immunization by lipoplex-patch based DNA vaccines is effective vaccination against Japanese encephalitis virus infection. *J Control Release* [Internet]. 2009 May;135(3):242–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365909000522>
40. Mittal A, Schulze K, Ebbesen T, Weißmann S, Hansen S, Lehr CM, et al. Efficient nanoparticle-mediated needle-free transcutaneous vaccination via hair follicles requires adjuvantation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;11(1):147–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963414004328>
41. Skountzou I, Quan F-S, Jacob J, Compans RW, Kang S-M. Transcutaneous immunization with inactivated influenza virus induces protective immune responses. *Vaccine* [Internet]. 2006 Aug;24(35–36):6110–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X06005731>
42. Ozaki T, Yauchi M, Xin K-Q, Hirahara F, Okuda K. Cross-Reactive Protection Against Influenza A Virus by a Topically Applied DNA Vaccine Encoding M Gene With Adjuvant. *Viral Immunol* [Internet]. 2005 Jun;18(2):373–80. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vim.2005.18.373>
43. Watabe S, Xin KQ, Ihata A, Liu LJ, Honsho A, Aoki I, et al. Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2001 Aug 14;19(31):4434–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483269>
44. Beignon A-S, Briand J-P, Muller S, Partidos CD. Immunization onto bare skin with synthetic peptides: immunomodulation with a CpG-containing oligodeoxynucleotide and effective priming of influenza virus-specific CD4+ T cells. *Immunology* [Internet]. 2002 Feb;105(2):204–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872096>
45. Mawas F, Peyre M, Beignon A, Frost L, Del Giudice G, Rappuoli R, et al. Successful Induction of Protective Antibody Responses against *Haemophilus influenzae* Type b and Diphtheria after Transcutaneous Immunization with the Glycoconjugate Polyribosyl Ribitol Phosphate–Cross-Reacting Material 197 Vaccine. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Sep 15;190(6):1177–82. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/423327>

46. Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol* [Internet]. 2008 Feb 1;180(3):1482–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209043>
47. Frolov VG, Seid RC, Odutayo O, Al-Khalili M, Yu J, Frolova OY, et al. Transcutaneous delivery and thermostability of a dry trivalent inactivated influenza vaccine patch. *Influenza Other Respi Viruses* [Internet]. 2008 Mar;2(2):53–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-2659.2008.00040.x>
48. MISHRA D, DUBEY V, ASTHANA A, SARAF D, JAIN N. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. *Vaccine* [Internet]. 2006 May 29;24(22):4847–55. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X06002763>
49. Liang R, Zhuang F, Meng Z, Deng M, Zheng C, Duan M. A New Potent Route of DNA Vaccine Inoculation: DNA-Liposome Complexes on Bare Skin Induce Antigen-Special Antibody Responses. *Molecules* [Internet]. 2003 Jan 31;8(1):120–6. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/8/1/120/>
50. Wang J, Hu J, Li F, Liu G, Zhu Q, Liu J, et al. Strong cellular and humoral immune responses induced by transcutaneous immunization with HBsAg DNA?cationic deformable liposome complex. *Exp Dermatol* [Internet]. 2007 Sep;16(9):724–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0625.2007.00584.x>
51. Mishra D, Mishra PK, Dabadghao S, Dubey V, Nahar M, Jain NK. Comparative evaluation of hepatitis B surface antigen–loaded elastic liposomes and ethosomes for human dendritic cell uptake and immune response. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2010 Feb;6(1):110–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963409000872>
52. Jain V, Vyas SP, Kohli D V. Well-defined and potent liposomal hepatitis B vaccines adjuvanted with lipophilic MDP derivatives. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2009 Sep;5(3):334–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963409000045>
53. VYAS S, SINGH R, JAIN S, MISHRA V, MAHOR S, SINGH P, et al. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. *Int J Pharm* [Internet]. 2005 May 30;296(1–2):80–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517305001547>
54. Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Sbrogio-Almeida ME, Amorim JH, Cabrera-Crespo J, Balan A, et al. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*: Differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). *J Biol Chem*. 2011;286(7):5222–33.
55. Amorim JH, Pereira Bizerra RS, dos Santos Alves RP, Sbrogio-Almeida ME, Levi JE, Capurro ML, et al. A Genetic and Pathologic Study of a DENV2 Clinical Isolate Capable of Inducing Encephalitis and Hematological Disturbances in Immunocompetent Mice. *PLoS One*. 2012;7(9):1–12.
56. Kapoor M, Zhang L, Mohan PM, Padmanabhan R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). *Gene* [Internet]. 1995 Sep;162(2):175–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037811199500332Z>
57. Ferreira GP, Figueiredo LB, Coelho LFL, S PA, Cecilio AB, Ferreira PCP, et al. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. *Microbes Infect* [Internet]. 2010 Jul [cited 2015 Sep 10];12(7):546–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457910000766>
58. Santos CM dos. Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória. [Internet]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2014. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-15122014-125225/>
59. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*. 2010 Aug;167(2):186–92.

60. Lasaro M a., Mathias-Santos C, Rodrigues JF, Ferreira LCS. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): RESEARCH ARTICLE. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009;55(1):93–9.
61. Timiryasova TM, Bonaparte MI, Luo P, Zedar R, Hu BT, Hildreth SW. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(5):962–70.
62. Henriques HR, Rampazo E V, Gonçalves AJS, Vicentin ECM, Amorim JH, Panatieri RH, et al. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013;7(7):e2330. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3715404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Cintra MJ. Impacto da Imunidade Prévia nos Efeitos Adjuvantes da Toxina Termo-Lábil (LT) de *Escherichia coli* Enterotoxigênica. Universidade de São Paulo; 2015.
64. Lasaro MAS, Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Guth BEC, Régua-Mangia A, Ferreira AJP, et al. Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;48(1):123–31.
65. Putnak R, Barvir D a, Burrous JM, Dubois DR, D’Andrea VM, Hoke CH, 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*. 1996;174(6):1176–84.
66. Glenn GM, Scharton-Kersten T, Vassell R, Mallett CP, Hale TL, Alving CR. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. *J Immunol*. 1998;161(7):3211–4.
67. Glenn GM, Taylor DN, Li X, Frankel S, Montemarano A, Alving CR. Transcutaneous immunization: a human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2000 Dec 1 [cited 2015 Jun 19];6(12):1403–6. Available from: [http://www.nature.com/nm/journal/v6/n12/pdf/nm1200\\_1403.pdf](http://www.nature.com/nm/journal/v6/n12/pdf/nm1200_1403.pdf)
68. Matsuo K, Yokota Y, Zhai Y, Quan YS, Kamiyama F, Mukai Y, et al. A low-invasive and effective transcutaneous immunization system using a novel dissolving microneedle array for soluble and particulate antigens. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;161(1):10–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.033>
69. Zhang J, Shi Z, Kong FK, Jex E, Huang Z, Watt JM, et al. Topical application of *Escherichia coli*-vectored vaccine as a simple method for eliciting protective immunity. *Infect Immun*. 2006;74(6):3607–17.
70. Vogt A, Mahé B, Costagliola D, Bonduelle O, Hadam S, Schaefer G, et al. Transcutaneous anti-influenza vaccination promotes both CD4 and CD8 T cell immune responses in humans. *J Immunol*. 2008;180(3):1482–9.
71. Slifka MK, Leung DYM, Hammarlund E, Raué HP, Simpson EL, Tofte S, et al. Transcutaneous yellow fever vaccination of subjects with or without atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):439–47.
72. Belyakov IM, Ahlers JD. Simultaneous Approach Using Systemic, Mucosal and Transcutaneous Routes of Immunization For Development of Protective HIV-1 Vaccines. *Curr Med Chem*. 2011;18(26):3953–62.
73. Rancan F, Amselgruber S, Hadam S, Munier S, Pavot V, Verrier B, et al. Particle-based transcutaneous administration of HIV-1 p24 protein to human skin explants and targeting of epidermal antigen presenting cells. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;176(1):115–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.022>

74. Hirschberg H, Van Kuijk S, Loch J, Jiskoot W, Bouwstra J, Kersten G, et al. A combined approach of vesicle formulations and microneedle arrays for transcutaneous immunization against hepatitis B virus. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;46(1–2):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.013>
75. Ding Z, Verbaan FJ, Bivas-Benita M, Bungener L, Huckriede a., van den Berg DJ, et al. Microneedle arrays for the transcutaneous immunization of diphtheria and influenza in BALB/c mice. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009;136(1):71–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.025>
76. Raviprakash K, Sun P, Raviv Y, Luke T, Martin N, Kochel T. Dengue virus photo-inactivated in presence of 1,5-iodonaphthylazide (INA) or AMT, a psoralen compound (4'-aminomethyl-trioxsalen) is highly immunogenic in mice. *Hum Vaccines Immunother.* 2013;9(11):2336–41.
77. Maves RC, Castillo Oré RM, Porter KR, Kochel TJ. Immunogenicity of a psoralen-inactivated dengue virus type 1 vaccine candidate in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(2):304–6.
78. Jarmer J, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Vratskikh O, Strauss J, Aberle JH, et al. Variation of the Specificity of the Human Antibody Responses after Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Vaccination. *J Virol* [Internet]. 2014;88(23):13845–57. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02086-14>
79. Midgley CM, Bajwa-Joseph M, Vasanawathana S, Limpitkul W, Wills B, Flanagan A, et al. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. *J Virol.* 2011;85(1):410–21.
80. Moreland NJ, Susanto P, Lim E, Tay MYF, Rajamanonmani R, Hanson BJ, et al. Phage display approaches for the isolation of monoclonal antibodies against dengue virus envelope domain III from human and mouse derived libraries. *Int J Mol Sci.* 2012;13(3):2618–35.
81. Wahala WMPB, Kraus A a., Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM. Dengue virus neutralization by human immune sera: Role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;392(1):103–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.037>
82. Halstead SB. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2014 Dec 10;2(6). Available from: <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014>
83. Putnak JR, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, et al. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine.* 2005;23(35):4442–52.
84. Nicolas J-F, Guy B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2008 Oct;7(8):1201–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18844594>
85. WIDERA G, JOHNSON J, KIM L, LIBIRAN L, NYAM K, DADDONA P, et al. Effect of delivery parameters on immunization to ovalbumin following intracutaneous administration by a coated microneedle array patch system. *Vaccine* [Internet]. 2006 Mar 6;24(10):1653–64. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X05010157>
86. Yasuda T, Ura T, Taniguchi M, Yoshida H. Intradermal Delivery of Antigens Enhances Specific IgG and Diminishes IgE Production: Potential Use for Vaccination and Allergy Immunotherapy. Karagiannis SN, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Dec 14;11(12):e0167952. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0167952>
87. Major AS, Cuff CF. Effects of the route of infection on immunoglobulin G subclasses and specificity of the reovirus-specific humoral immune response. *J Virol* [Internet]. 1996 Sep;70(9):5968–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709219>
88. Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K, Quan YS, et al. A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection. *J Control Release.* 2008;131(2):113–20.

89. Koutsonanos DG, Martin MDP, Zarnitsyn VG, Sullivan SP, Compans RW, Prausnitz MR, et al. Transdermal influenza immunization with vaccine-coated microneedle arrays. *PLoS One*. 2009;4(3).
90. Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, Kamiyama F, Mukai Y, Yoshioka Y, et al. Transcutaneous vaccination using a hydrogel patch induces effective immune responses to tetanus and diphtheria toxoid in hairless rat. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;149(1):15–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.05.012>
91. Combadiere B, Liard C. Transcutaneous and intradermal vaccination. *Hum Vaccin* [Internet]. 2011 Aug 27;7(8):811–27. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/hv.7.8.16274>
92. Flipse J, Smit JM. The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. Simmons CP, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 Jun 11;9(6):e0003749. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003749>
93. Tsai W-Y, Lai C-Y, Wu Y-C, Lin H-E, Edwards C, Jumnainsong A, et al. High-Avidity and Potently Neutralizing Cross-Reactive Human Monoclonal Antibodies Derived from Secondary Dengue Virus Infection. *J Virol* [Internet]. 2013 Dec 1;87(23):12562–75. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00871-13>
94. Lau L, Green AM, Balmaseda A, Harris E. Antibody avidity following secondary dengue virus type 2 infection across a range of disease severity. *J Clin Virol* [Internet]. 2015 Aug;69:63–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653215001870>
95. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol* [Internet]. 2016 Jun 23;17(9):1102–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.3515>
96. Amorim JH, Diniz MO, Cariri F a MO, Rodrigues JF, Bizerra RSP, Gonçalves AJS, et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine*. 2012;30(5):837–45.
97. Batista MT, Souza RD, Ferreira EL, Robinette R, Crowley PJ, Rodrigues JF, et al. Immunogenicity and In Vitro and In Vivo Protective Effects of Antibodies Targeting a Recombinant Form of the *Streptococcus mutans* P1 Surface Protein. *Infect Immun* [Internet]. 2014;82(12):4978–88. Available from: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.02074-14>
98. Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, Zhang X, Dai X, Duangchinda T, et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. 2015;16(2).
99. Smith S a, Kose N, Jadi RS, Silva AM De, Crowe JE, Vanderbilt T. Isolation of Dengue Virus-Specific Memory B Cells with Live Virus Antigen from Human Subjects following Natural Infection Reveals the Presence of Diverse Novel Functional Groups of Antibody Clones. 2014;103038(August):12233–41.
100. Vratskikh O, Stiasny K, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Karrer U, et al. Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. *PLoS Pathog*. 2013;9(6).
101. Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Sep 24;373(13):1195–206. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1506223>
102. Precioso AR, Palacios R, Thomé B, Mondini G, Braga P, Kalil J. Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2015 Dec;33(50):7121–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X1501395X>
103. Weiskopf D, Angelo MA, Bangs DJ, Sidney J, Paul S, Peters B, et al. The Human CD8 + T Cell Responses Induced by a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Are Directed against Highly Conserved Epitopes. Diamond MS, editor. *J Virol* [Internet]. 2015 Jan 1;89(1):120–8. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.02129-14>

104. Putnak R, Cassidy K, Conforti N, Lee R, Sollazzo D, Truong T, 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.* 1996;55(5):504–10.
105. Staropoli I, Frenkiel MP, Mégret F, Deubel V. Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine.* 1997;15(17–18):1946–54.
106. Costa SM, Paes M V., Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM, Queiroz JLS, et al. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* [Internet]. 2006 Jan;24(2):195–205. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X05007358>
107. Alves RP dos S, Pereira LR, Fabris DLN, Salvador FS, Santos RA, Zanotto PM de A, et al. Production of a Recombinant Dengue Virus 2 NS5 Protein and Potential Use as a Vaccine Antigen. Burns DL, editor. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2016 Jun;23(6):460–9. Available from: <http://cvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/CVI.00081-16>
108. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 Dec;8(12):S7–16. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2460>
109. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol* [Internet]. 2012 Dec;55(4):289–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653212003435>

## APÊNDICES – Artigos Periódicos

- APÊNDICE A** - Amorim JH, Alves RPS, Bizerra R, Pereira SA, Pereira LR, Fabris DLN, **Santos RA**, Romano CM, Ferreira LCS. Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in a mouse encephalitis model. *Virology*, 2016;487:41-9
- APÊNDICE B** - Alves RPS, Pereira L, Fabris DLN, Salvador FS, **Santos RA**, Zanotto PMA, Romano, CM, Amorim JH, Ferreira LCS. Production of a recombinant Dengue virus 2 NS5 protein and the potential use as a vaccine antigen. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2016; 23:460-9
- APÊNDICE C** - Oliveira DBL, Almeida FJ, Durigon EL, Mendes ÉA, Braconi CT, Marchetti I, **Andreato-Santos R**, Cunha MP, Alves RPS, Pereira LR, Melo SR, Neto DFL, Mesquita FS, Araujo DB, Favoretto SR, Sáfiadi MAP, Ferreira LCS, Zanotto PMA, Botosso VF, Berezin EN. Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection. *New England Journal of Medicine*, 2016; 375: 1202–04.
- APÊNDICE D** - Ferreira LCDS, Alves RPDS, Pereira LR, **Santos RA**, inventores. Universidade de São Paulo, depositante. SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, ANTÍGENO RECOMBINANTE, KITS DE DIAGNÓSTICO, E USOS DOS MESMOS. BR patente BR1020160113180, 2016 Maio 18.



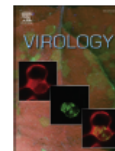
## APÊNDICE A

Virology 487 (2016) 41–49



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

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

## Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in a mouse encephalitis model



Jaime Henrique Amorim<sup>a,\*</sup>, Rúbens Prince dos Santos Alves<sup>a</sup>, Raíza Bizerra<sup>a</sup>, Sara Araújo Pereira<sup>a</sup>, Lennon Ramos Pereira<sup>a</sup>, Denicar Lina Nascimento Fabris<sup>a</sup>, Robert Andreato Santos<sup>a</sup>, Camila Malta Romano<sup>b</sup>, Luís Carlos de Souza Ferreira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, Brasil

<sup>b</sup> Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias (IMHC), Universidade de São Paulo, Brasil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 May 2015

Returned to author for revisions

28 September 2015

Accepted 5 October 2015

#### Keywords:

Dengue

Nonstructural proteins

Immune response

T lymphocytes

Antibodies

### ABSTRACT

Generating neutralizing antibodies have been considered a prerequisite to control dengue virus (DENV) infection. However, T lymphocytes have also been shown to be important in a protective immune state. In order to investigate the contribution of both humoral and cellular immune responses in DENV immunity, we used an experimental model in which a non-lethal DENV2 strain (ACS46) is used to intracranially prime Balb/C mice which develop protective immunity against a lethal DENV2 strain (JHA1). Primed mice generated envelope-specific antibodies and CD8<sup>+</sup> T cell responses targeting mainly non-structural proteins. Immune sera from protected mice did not confer passive protection to naive mice challenged with the JHA1 strain. In contrast, depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes significantly reduced survival of ACS46-primed mice challenged with the JHA1 strain. Collectively, results presented in this study show that a cellular immune response targeting non-structural proteins are a promising way in vaccine development against dengue.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## APÊNDICE B

AMERICAN  
SOCIETY FOR  
MICROBIOLOGYClinical and Vaccine  
Immunology

## Production of a Recombinant Dengue Virus 2 NS5 Protein and Potential Use as a Vaccine Antigen

Rúbens Prince dos Santos Alves,<sup>a</sup> Lennon Ramos Pereira,<sup>a</sup> Denicar Lina Nascimento Fabris,<sup>a</sup> Felipe Scassi Salvador,<sup>b</sup> Robert Andreato Santos,<sup>a</sup> Paolo Marinho de Andrade Zanotto,<sup>c</sup> Camila Malta Romano,<sup>b</sup> Jaime Henrique Amorim,<sup>a\*</sup> Luís Carlos de Souza Ferreira<sup>a</sup>

Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil<sup>a</sup>; Instituto de Medicina Tropical, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil<sup>b</sup>; Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil<sup>c</sup>

Dengue fever is caused by any of the four known dengue virus serotypes (DENV1 to DENV4) that affect millions of people worldwide, causing a significant number of deaths. There are vaccines based on chimeric viruses, but they still are not in clinical use. Anti-DENV vaccine strategies based on nonstructural proteins are promising alternatives to those based on whole virus or structural proteins. The DENV nonstructural protein 5 (NS5) is the main target of anti-DENV T cell-based immune responses in humans. In this study, we purified a soluble recombinant form of DENV2 NS5 expressed in *Escherichia coli* at large amounts and high purity after optimization of expression conditions and purification steps. The purified DENV2 NS5 was recognized by serum from DENV1-, DENV2-, DENV3-, or DENV4-infected patients in an epitope-conformation-dependent manner. In addition, immunization of BALB/c mice with NS5 induced high levels of NS5-specific antibodies and expansion of gamma interferon- and tumor necrosis factor alpha-producing T cells. Moreover, mice immunized with purified NS5 were partially protected from lethal challenges with the DENV2 NGC strain and with a clinical isolate (JHA1). These results indicate that the recombinant NS5 protein preserves immunological determinants of the native protein and is a promising vaccine antigen capable of inducing protective immune responses.

## APÊNDICE C

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

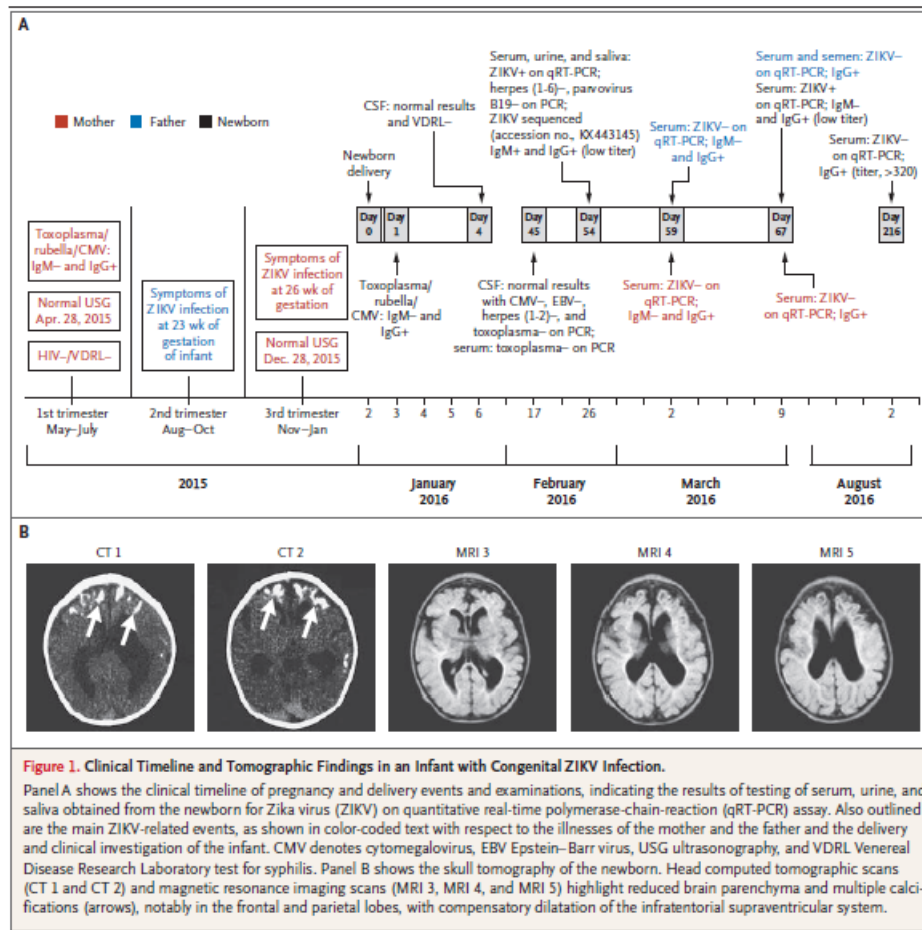
## CORRESPONDENCE

### Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection

**TO THE EDITOR:** The presence of Zika virus (ZIKV) infection has been associated with microcephaly in multiple studies,<sup>1-3</sup> although little is known about ZIKV shedding in congenitally infected in-

fants. We report a case of a newborn who had continued viremia with ZIKV for at least 67 days after birth.

On January 2, 2016, a male child was born with



## APÊNDICE D



18/05/2016 870180021122

18-01



00.000.2.2.15.0804195.9

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2016 011318 0

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 63025530000104

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Rua da Reitoria, 374 - Butantã

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508220

País: Brasil

Telefone: (11) 3091.4474

Fax:

Email: pidireto@usp.br

**Dados do Pedido**

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, ANTÍGENO RECOMBINANTE, KITS DE DIAGNÓSTICO, E USOS DOS MESMOS

Resumo: A presente invenção descreve um antígeno recombinante derivado da proteína não estrutural 1 do ZIKV (deltaN-NS1) capaz de diferenciar, de forma específica, anticorpos gerados após a infecção pelo ZIKV e diferenciá-los de anticorpos gerados após infecção com o vírus dengue (DENV) ou outros flavivírus. Adicionalmente, a presente invenção descreve a montagem de kits de diagnóstico sorológico para a detecção do ZIKV em diferentes plataformas tecnológicas de aplicação, bem como seu uso no diagnóstico diferencial de indivíduos infectados pelo ZIKV.

Figura a publicar: 5