

RAIZA SALES PEREIRA BIZERRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE CONTRA  
O SOROTIPO 2 DO VÍRUS DENGUE BASEADA NO DOMÍNIO  
HELICASE DA PROTEÍNA NS3**

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  
2014

RAIZA SALES PEREIRA BIZERRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE CONTRA  
O SOROTIPO 2 DO VÍRUS DENGUE BASEADA NO DOMÍNIO  
HELICASE DA PROTEÍNA NS3**

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  
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Bizerra, Raíza Sales Pereira.

Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra o sorotipo 2 do vírus dengue baseada no domínio helicase da proteína NS3 / Raíza Sales Pereira Bizerra. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Vacina contra a dengue.

Versão do título para o inglês: Development of a subunit vaccine against dengue virus serotype 2 based on the NS3 helicase domain.

1. Dengue 2. Vírus dengue 3. NS3 4. Helicase 5. Vacinas 6. Adjuvantes I. Ferreira, Prof. Dr. Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0108/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Raíza Sales Pereira Bizerra.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra o sorotipo 2 do vírus dengue baseada no domínio helicase da proteína NS3.

Orientador(a): Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **041** nas fls. **127** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luiz Carlos de Souza Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra o sorotipo 2 do vírus dengue baseada no domínio helicase da proteína NS3*" do qual participam o(s) alunos(s) **Raíza Sales Pereira Bizerra, Jaime Henrique Amorim, Rubens Prince dos Santos Alves, Denicar Lina Nascimento Fabris**, 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 **17.04.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 18 de abril de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER  
Secretário  
CEUA – ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Essa dissertação é um fruto não só da minha dedicação, mas também de diversas colaborações. Muito obrigada aos que contribuíram para a conclusão dessa etapa:

Prof. Luís, por me aceitar em seu laboratório, pelos ensinamentos e pela preocupação quanto ao meu aprendizado e bem-estar.

Jaime, por ter me recebido no laboratório, por ter me ensinado com exigência e paciência, pela convivência amistosa.

Rúbens, pela parceria na bancada e fora dela, por ter me mostrado um jeito mais divertido de encarar as situações.

Meus pupilos, Sara e Lennon, com quem tive oportunidade de dividir o conhecimento e aprender com suas curiosidades.

Andrea Balan, pela disponibilidade e sensibilidade nas conversas.

André Silva, pela acessibilidade e tranquilidade na realização dos experimentos.

Bete Sbrogio, pelos treinamentos no manuseio de animais de laboratório, pelo carinho e por acolher todos do grupo.

FAPESP, pelo amparo financeiro.

Monica, funcionária da biblioteca, pela pronta disposição em me auxiliar na formatação desse documento.

Bete e Gisele, meninas da secretaria da pós que tanto me ajudaram nas minhas solicitações diversas.

Sandra, Juliane, Daniele, Luís e Anderson pelo cuidado com os meus camundongos no biotério do departamento de parasitologia.

Eduardo Gimenes, Carolina Bertelli e Loren da Silva pelo apoio mais que técnico.

Profa. Rita, Rafa, Milene, Wilson, Juliana, Roberto, Rogério e Mari Diniz pelas ideias para solucionar os problemas que enfrentei no mestrado.

Naína, Mônica, Naty, Caroline, Mari Cintra, Mari Waligora, Luana, Marcinha, Giuliana, Débora, Priscila e Aline, meninas batalhadoras que dividiram comigo um pouco da sua história.

Cariri, Ewerton, Renatinha e Bruna que foram mais que colegas de laboratório, agradeço a vocês pelas conversas pessoais e profissionais.

Camila, pelo acolhimento em casa, pela disponibilidade sempre reforçada, por não me deixar quieta sozinha.

Carolina Rivillas, por ter se tornado parte da minha família, pelo carinho, pelos braços sempre abertos.

Denizinha, minha comadre do coração, pela amizade, pela preocupação, pela dedicação, por tudo que sempre fez por mim durante todo esse tempo, por simplesmente ser quem você é. Sou grata a Deus por ter te recebido em minha vida.

Spencer e Galileu, amigos queridos, pelo amor apesar da distância, pelo seu tempo precioso dado a mim.

Max, pelo incentivo para que eu busque a satisfação que faça juz ao meu esforço.

Meus pais, Robson e Rita, pela confiança em mim depositada, pela alegria e pelo auxílio financeiro.

Meu irmão Raí, pelo amparo de sempre, por ser o amor da minha vida.

Minha vovó Olga, por todas as orações e palavras que me enchem de carinho.

Minha Dindinha Clemilda, que sempre foi tão afetuosa, firme na fé e atenciosa comigo.

Minha vovó Mariinha (*in memoriam*) que estaria feliz por me ver crescer.

Gideon e Sônia, pelas palavras de motivação, pela certeza de que tudo sempre dá certo.

Ló e Neto que ficaram mais próximos, apoiaram-me sem questionamentos e geraram minha preciosa pequerrucha Heleninha.

Babalu, minha preta, minha filha, por me resgatar e fazer com que eu me sinta sempre amada.

Nossa Senhora por ter estado comigo e passado à frente dos meus passos.

Espírito Santo por ter sempre me iluminado e me afastado da presença do inimigo.

Deus, por sempre ter me abençoado com conquistas maravilhosas, por ter cuidado de mim e dos meus em todos os momentos e por comandar de forma excepcional todos os rumos e decisões da minha vida.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.*

*Martin Luther King*

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da FAPESP.

## RESUMO

BIZERRA, R. S. P. **Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra o sorotipo 2 do vírus dengue baseada no domínio helicase da proteína NS3.** 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A dengue é uma doença endêmica nas regiões tropicais e subtropicais e o desenvolvimento de uma vacina para o controle da mesma é uma prioridade em todo o mundo. A proteína não estrutural 3 (NS3) do vírus dengue (DENV) é considerada essencial para a replicação e montagem virais. O seu domínio helicase (NS3H) alberga epítomos reconhecidos por linfócitos T citotóxicos, os quais tem papel importante na eliminação de células infectadas. Nesse sentido, esse trabalho propôs a obtenção de uma forma recombinante, produzida em linhagens de *Escherichia coli*, da NS3H do DENV2 com características similares à proteína nativa e sua utilização como um potencial antígeno vacinal. Inicialmente, a proteína recombinante foi obtida em uma forma insolúvel, mas a otimização das condições de cultivo e da expressão da proteína recombinante permitiu a obtenção da proteína na forma solúvel. A proteína foi utilizada para gerar anticorpos específicos capazes de reconhecer a proteína nativa do vírus expressa em células infectadas. Além disso, a NS3H foi reconhecida por anticorpos de camundongos desafiados por uma linhagem de DENV2 e de humanos infectados. A proteína NS3H foi capaz de interagir com o RNA viral, de forma semelhante ao que ocorre com a proteína nativa. Camundongos imunizados com NS3H coadministrada com diferentes adjuvantes desenvolveram respostas imunológicas específicas, no entanto, não foram protegidos após desafio com uma linhagem de DENV2 capaz de matar camundongos imunocompetentes. Em conjunto, os resultados indicam que a proteína NS3H recombinante preserva conformação e determinantes antigênicos da proteína viral nativa e pode ser útil em estudos sobre a biologia do vírus e na busca de estratégias anti-virais voltadas para o controle da dengue.

**Palavras-chave:** Dengue. Vírus dengue. NS3. Helicase. Vacinas. Adjuvants.

## ABSTRACT

BIZERRA, R. S. P. **Development of a subunit vaccine against dengue virus serotype 2 based on the NS3 helicase domain.** 2014. 71 p. Master thesis (Microbiology) – Biomedical Science Institute, University of São Paulo, 2014.

Dengue fever is an endemic disease in tropical and subtropical regions and the development of a vaccine is a worldwide priority. The nonstructural 3 protein (NS3) of dengue virus (DENV) is considered essential for replication and assembly of virus particles. The NS3 helicase domain (NS3H) preserves epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes, which plays an important role in the elimination of infected cells. Accordingly, this study aimed the generation of a recombinant NS3H form of a type 2 dengue virus (DENV2) lineage, in *Escherichia coli* strains, with properties similar to the native protein and its use as a potential vaccine antigen. Initially, the recombinant protein was detected as an insoluble protein and attempts to solubilize it were unsuccessful. Optimization of bacterial growth and protein induction conditions resulted in the generation of a soluble NS3H form. The protein was employed to generate specific antibodies capable of recognizing the native virus protein in infected cells. Furthermore, the recombinant NS3H was recognized by antibodies from mice challenged with a DENV2 strain and infected human subjects. The NS3H protein interacted with the viral RNA, similarly to the native viral protein, and showed RNA relaxation activity as indirectly demonstrated in amplification reactions. Mice immunized with NS3H combined with different adjuvants developed specific immune responses but did not confer protection to a lethal challenge carried out with a DENV2 strain capable to kill immunocompetent mice. Altogether, the results indicate that the recombinant NS3H protein preserves conformational and antigenic determinants of the native protein and may be a useful tool for studies dealing with the DENV biology and the search for anti-virus approaches.

**Key words:** Dengue fever. Dengue virus. NS3. Helicase. Vaccines. Adjuvants.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

‰: porcentagem

(-) ssRNA: RNA de fita simples com polaridade negativa.

(+) ssRNA: RNA de fita simples com polaridade positiva

°C: graus celsius

ADE: *antibody dependent enhancement* (aumento dependente de anticorpos)

ANOVA: *analysis of variance* (análise de variância simples)

APC: célula apresentadora de antígeno

ATP: trifosfato de adenosina

bar: unidade de pressão

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

C: proteína do capsídeo do vírus dengue

CD: *circular dichroism* (dicroísmo circular)

CpG: oligonucleotídeos ricos nos aminoácidos C e G

CTL: *Cytotoxic T lymphocyte* (linfócito T citotóxico)

DAPI: *4'6-diamidino-2-phenylindole* (4,6-diamidino-2-fenilindol)

DENV: *Dengue virus* (vírus dengue)

DENV1: sorotipo 1 do vírus dengue

DENV2: sorotipo 2 do vírus dengue

DENV3: sorotipo 3 do vírus dengue

DENV4: sorotipo 4 do vírus dengue

DEPC: dietilpirocarbonato

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxorribonucléico)

DO: densidade ótica

E: proteína do envelope do vírus dengue

EIII: domínio III da proteína do envelope (E)

ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)

FHD: febre hemorrágica da dengue

FITC: *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

g: força centrífuga relativa

h: hora

ICS: *intracellular cytokine staining* (marcação intracelular de citocina)

IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$

IgG: Imunoglobulina G

IgA: imunoglobulina A

IgG1: subclasse 1 da imunoglobulina G

IgG2a: subclasse 2<sup>a</sup> da imunoglobulina G

IPTG: *isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*

kDa: quilodalton

L: litro

LB: Meio Luria-Bertani

LDH: lactato desidrogenase ou desidrogenase láctica

LTK63: mutante de LT com substituição de uma serina por uma lisina na posição 63 da subunidade A

LTs: toxinas termo-lábeis

m/v: razão massa/volume

M: molar

mg: miligrama

MHC: *major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

mL: mililitro

mM: milimolar

MOI: *multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (EUA)

ng: nanograma

nm: nanômetro

NS: *non-structural* (não estrutural)

NS1: proteína não estrutural 1 do vírus dengue

NS2a: proteína não estrutural 2a do vírus dengue

NS2b: proteína não estrutural 2b do vírus dengue

NS3: proteína não estrutural 3 do vírus dengue

NS3H: porção helicase da proteína NS3

NS4a: proteína não estrutural 4a do vírus dengue

NS4b: proteína não estrutural 4b do vírus dengue

NS5: proteína não estrutural 5 do vírus dengue

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

PAMPs: padrões moleculares associados ao patógeno

PBS: *phosphatase buffered saline* (tampão salina fosfato)

PCR: *polymerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)

PE: ficoeritrina

pH: potencial hidrogeniônico

prM: proteína precursora da membrana do vírus dengue

RER: retículo endoplasmático rugoso

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: transcrição reversa para síntese de DNA complementar com subsequente reação em cadeia da polimerase

SCD: síndrome do choque da dengue

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

TA: temperatura ambiente

TCD8+: linfócitos T CD8 positivos

Th: T *helper*

TM: temperatura média

UFC: unidades formadoras de colônia

UFP: unidades formadoras de placa

UV: ultravioleta

v/v: razão volume/volume

vc: volumes de coluna

WBC: *white blood cell* (células sanguíneas brancas ou leucócitos)

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais do genoma do DENV. ....	19
Figura 2. Mosquito <i>Aedes aegypti</i> , agente transmissor do DENV aos humanos no Brasil. ....	20
Figura 3. Etapas do processo infeccioso e da replicação do DENV em células eucarióticas. ....	21
Figura 4. Casos notificados e internações por dengue no Brasil de 1986 a julho de 2013. ....	22
Figura 5. Teoria da infecção sequencial (ADE). ....	23
Figura 6. Estrutura secundária da NS3H. Cristalografia representando a estrutura em alfa hélices e folhas beta da NS3H.. ....	27
Figura 7. Protocolo vacinal e do desafio.. ....	40
Figura 8. Obtenção do gene codificador da NS3H.. ....	44
Figura 9. Teste para avaliação da expressão da NS3H em diferentes linhagens de <i>E. coli</i> . ....	45
Figura 10. Purificação da NS3H em uréia .....	46
Figura 11. Tentativas de otimização da expressão da proteína NS3H pela linhagem BLNS3H.. ....	48
Figura 12. Purificação da proteína NS3H produzida em <i>E. coli</i> . ....	50
Figura 13. Produção de anticorpos anti-NS3H em camundongos. ....	51
Figura 14. Reconhecimento da NS3H por anticorpos de camundongos e humanos infectados com DENV2. ....	52
Figura 15. Arranjo, estabilidade e interação da NS3H com o RNA viral. ....	53
Figura 16. Avaliação da atividade helicase para RNA com a proteína NS3H recombinante. ....	54
Figura 17. Avaliação da imunogenicidade da proteína NS3H recombinante em camundongos imunizados. ....	56
Figura 18. Proteção induzida pela imunização com a proteína NS3H frente a desafio com a linhagem JHA1 de DENV2. ....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores utilizados na transcrição reversa do gene da NS3H.....	31
Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados no sequenciamento do gene da NS3H.....	32
Tabela 3 – Características das linhagens bacterianas utilizadas nos testes de expressão da NS3H. ....	34
Tabela 4. Descrição dos métodos de renaturação testados para a obtenção da proteína NS3H solúvel .....	47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Extração do RNA viral e transcrição reversa</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Sequenciamento do gene codificador da NS3H</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Amplificação do gene que codifica a proteína NS3H</b>	<b>32</b>
<b>3.4</b>	<b>Clonagem do gene que codifica para a NS3H em vetor de expressão pET28a (Novagen)</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Escolha da linhagem de expressão da proteína recombinante NS3H</b>	<b>33</b>
<b>3.6</b>	<b>Procedimentos para a expressão e purificação da NS3H recombinante</b>	<b>34</b>
<b>3.7</b>	<b>Otimização das condições de cultivo e indução visando obtenção da proteína na forma solúvel.</b>	<b>35</b>
<b>3.8</b>	<b>Procedimentos para a purificação da NS3H recombinante solúvel</b>	<b>35</b>
<b>3.9</b>	<b>Avaliação da função biológica da proteína NS3H</b>	<b>36</b>
<b>3.9.1</b>	<b><i>Western blot</i></b>	<b>36</b>
<b>3.9.2</b>	<b><i>Citometria de fluxo</i></b>	<b>37</b>
<b>3.9.3</b>	<b><i>Imunofluorescência</i></b>	<b>37</b>
<b>3.10</b>	<b>Análise conformacional da proteína NS3H recombinante</b>	<b>37</b>
<b>3.11</b>	<b>Eficiência da síntese de cDNA em presença da NS3H medida por PCR em tempo real</b>	<b>38</b>
<b>3.12</b>	<b>Geração de anticorpos específicos em camundongos</b>	<b>39</b>
<b>3.13</b>	<b>Avaliação dos efeitos fisiológicos associados à imunização com NS3H</b>	<b>39</b>
<b>3.14</b>	<b>Procedimentos de imunização com a proteína recombinante</b>	<b>39</b>
<b>3.15</b>	<b>Desafio dos animais imunizados com a proteína recombinante com um isolado de DENV2</b>	<b>40</b>
<b>3.16</b>	<b>Avaliação da antigenicidade da NS3H frente a soros de humanos e animais infectados.</b>	<b>40</b>

<b>3.17</b>	<b>Detecção de células T CD8+ produtoras de IFN-<math>\gamma</math> nos animais desafiados</b>	<b>41</b>
<b>3.18</b>	<b>Ética no uso de animais</b>	<b>41</b>
<b>3.19</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção do gene codificador da NS3H</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Otimização da expressão e da purificação da NS3H</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>Produção de anticorpos anti-NS3H</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Provas de antigenicidade da NS3H</b>	<b>51</b>
<b>4.5</b>	<b>Interação da NS3H recombinante com o RNA viral</b>	<b>53</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação da imunogenicidade da NS3H recombinante</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>66</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A dengue é atualmente a principal doença transmitida por artrópodes a provocar doença em humanos, sendo causada por um dos quatro sorotipos do vírus dengue, (DENV 1-4), pertencentes ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. O vírus dengue possui RNA genômico de fita simples com orientação positiva e o seu vírion é esférico e envelopado. O genoma viral (figura 1) codifica as proteínas estruturais do capsídeo (C), do envelope (E), e a proteína precursora da membrana (prM), a qual sofre clivagem e origina a proteína de membrana, e sete proteínas não estruturais sendo elas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

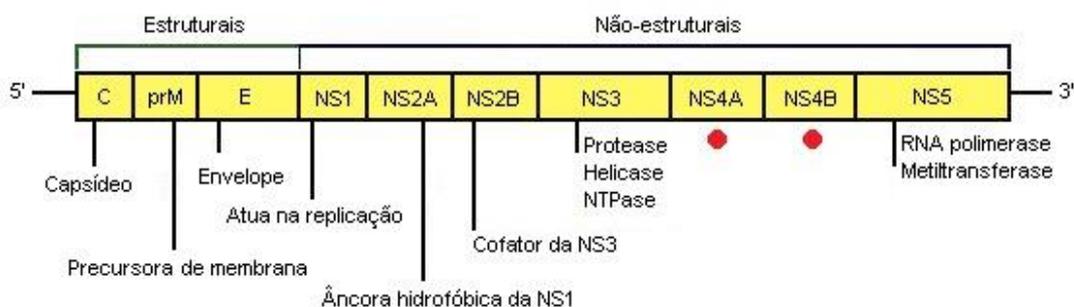


Figura 1. Genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais do genoma do DENV. As funções das proteínas codificadas pelos genes marcados com círculos vermelhos ainda não estão definidas. Adaptada de Whitehead et al., 2007.

O vírus dengue é considerado um arbovírus, nome originário da sua característica de ser transmitido por artrópodes. No Brasil, as fêmeas da espécie *Aedes aegypti* (figura 2), que passam a exercer hematofagia após a cópula para possibilitar a maturação dos ovos, são reconhecidas como transmissoras da doença (DIAS et al., 2010). O mosquito se originou na África e é provável que tenha chegado às Américas em barcos vindos da Europa, durante as primeiras explorações e colonizações europeias no continente americano. Desde então, o *Aedes aegypti* é único vetor transmissor de dengue no Brasil (BRAGA; VALLE, 2007). As características antropofílicas, o habitat urbano/doméstico e a alta eficiência na transmissão do DENV tornam este artrópode um agente altamente competente na disseminação da doença em ambientes urbanos e peri-urbanos (GUBLER, 2002).



Figura 2. Mosquito *Aedes aegypti*, agente transmissor do DENV aos humanos no Brasil. Fonte: Portal do professor / Ministério da Educação e Cultura.

Quando o mosquito transfere o vírus para o homem, ocorrem as etapas do processo infeccioso e replicação viral, ilustradas na figura 3. Durante a infecção natural pelo DENV, as principais células-alvo são monócitos, macrófagos e células dendríticas. Inicialmente, a partícula viral se liga ao receptor celular por interação com o domínio III (EIII) da glicoproteína do envelope viral (proteína E). Em seguida, há endocitose mediada pelo receptor e redução do pH do endossomo com consequente mudança de conformação da proteína E, o que promove a fusão da membrana viral à membrana do endossomo e liberação do capsídeo (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009). Posteriormente, há dissociação do capsídeo, liberação do RNA no citoplasma celular, tradução das proteínas virais, síntese da fita molde de RNA com orientação negativa e replicação viral. Por fim, há morfogênese viral com formação de novas partículas infectantes (AMORIM; ALVES; FERREIRA, 2009). O DENV é um vírus envelopado e, no momento da liberação das novas partículas infectantes, ele carrega consigo parte da membrana da célula hospedeira, a qual, juntamente com suas próprias proteínas, constitui o seu envelope (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

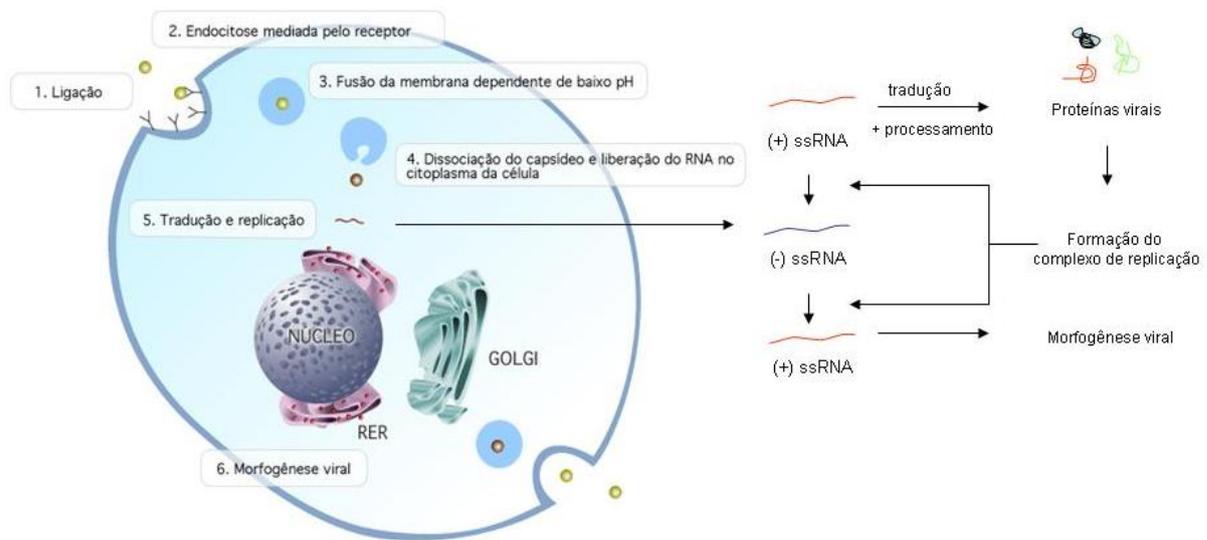


Figura 3. Etapas do processo infeccioso e da replicação do DENV em células eucarióticas. Após a infecção, a partícula viral se liga ao receptor celular (1) e há endocitose mediada pelo receptor (2). Ocorre a redução do pH do endossomo, o que promove a fusão da membrana viral à membrana do endossomo (3) e liberação do RNA no citoplasma celular (4). Em seguida, as proteínas virais são traduzidas e o vírus se replica (5), quando, então, formam-se novas partículas infectantes (6). RER: retículo endoplasmático rugoso; (+) ssRNA: RNA de fita simples com polaridade positiva; (-) ssRNA: RNA de fita simples com polaridade negativa. Fonte: Amorim; Alves; Ferreira, 2009.

O impacto epidemiológico da dengue pode ser expresso em diversos termos, sendo um deles a sua ampla distribuição geográfica. A doença atinge tanto países tropicais quanto subtropicais e acomete milhões de indivíduos em todo o globo, o que é evidenciado pelas estatísticas de que cerca de 390 milhões de pessoas adquirem dengue por ano em todo o mundo e 96 milhões manifestam algum nível de severidade (BHATT et al., 2013).

O vírus dengue causa significativamente mais enfermidade em humanos do que qualquer outro arbovírus do mesmo gênero, como o vírus da febre amarela e o vírus da encefalite japonesa (WHITEHEAD et al., 2007). O número de pessoas infectadas e de óbitos vem crescendo a cada ano, o que torna a doença uma questão de grande relevância à Saúde Pública (BRASIL, 2014). Segundo o Ministério da Saúde, nos últimos anos, o Brasil viveu cinco grandes epidemias, evidenciadas pelos picos nas colunas da figura 4, associadas à mudança do sorotipo viral predominante: 1998 (DENV1), 2002 (DENV3), 2008 (DENV2), 2010 (DENV1) e 2013 (DENV1/4).

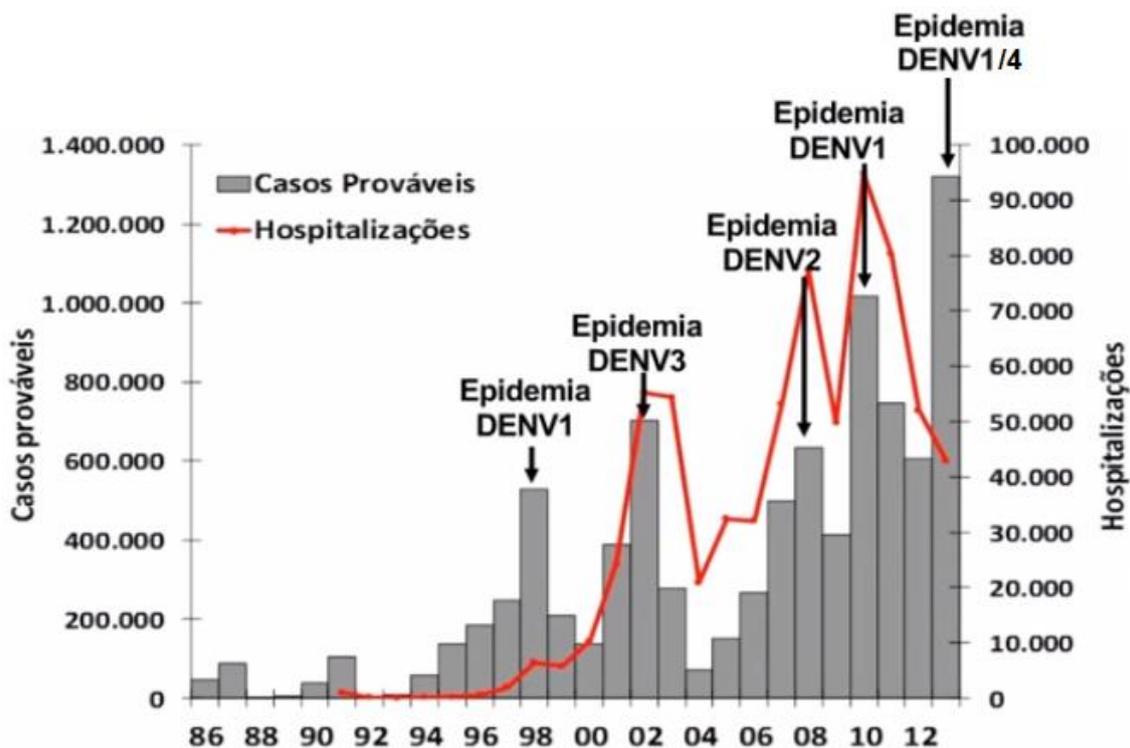


Figura 4. Casos notificados e internações por dengue no Brasil de 1986 a julho de 2013. Os picos das colunas evidenciam as cinco grandes epidemias que o país viveu nos anos 1998, 2002, 2008, 2010 e 2013. Fonte: Ministério da Saúde /Secretaria de Vigilância em Saúde.

A forma mais branda da doença é a dengue clássica e as mais graves são febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD), sendo a segunda uma evolução da primeira. A FHD e a SCD evoluem com tendência a hemorragias, dores abdominais intensas, pulso rápido e fraco, palidez cutânea e pele fria, o que pode levar o paciente ao choque e à morte (WHITEHEAD et al., 2007). Apesar de não se saber quais os fenômenos patológicos exatos da dengue, a FHD e a SCD têm como fisiopatologia uma resposta imune anômala envolvendo imunocomplexos, leucócitos e citocinas, o que causa aumento da permeabilidade vascular devido à má função endotelial. Conseqüentemente, há extravasamento de líquidos para o interstício, levando à queda da tensão arterial e manifestações hemorrágicas (GUBLER, 2002).

A proteção imunológica a um sorotipo viral é tipo-específica, de forma que não confere proteção aos outros três. A suscetibilidade à dengue, apesar de variar de acordo com características intrínsecas dos indivíduos, como o estado imunológico, e das cepas circulantes, é universal, de forma que pessoas das mais

diferentes faixas etárias, raças e classes sociais podem adquirir a doença (BRASIL, 2014). Foi verificado que os sintomas são agravados após infecções sequenciais por diferentes sorotipos virais, com participação predominante de anticorpos contra as proteínas estruturais, fenômeno conhecido como ADE (do inglês *antibody dependent enhancement*), proposto inicialmente por Halstead e colaboradores em 1970, em sua teoria da infecção sequencial (figura 5). Segundo essa teoria, a infecção sequencial por um sorotipo viral diferente em relação ao anterior levaria a uma forma exacerbada da doença, pela ligação de anticorpos não neutralizantes, provenientes da primeira infecção, às partículas virais do segundo sorotipo, o que facilitaria a entrada de vírions em monócitos e células dendríticas do hospedeiro, aumentando a intensidade da resposta inflamatória, da carga viral e dos danos em células endoteliais e desencadeando a dengue hemorrágica. Desse modo, os anticorpos preexistentes reconheceriam padrões conservados entre os sorotipos, mas não seriam capazes de neutralizar o segundo (HALSTEAD et al., 1970).

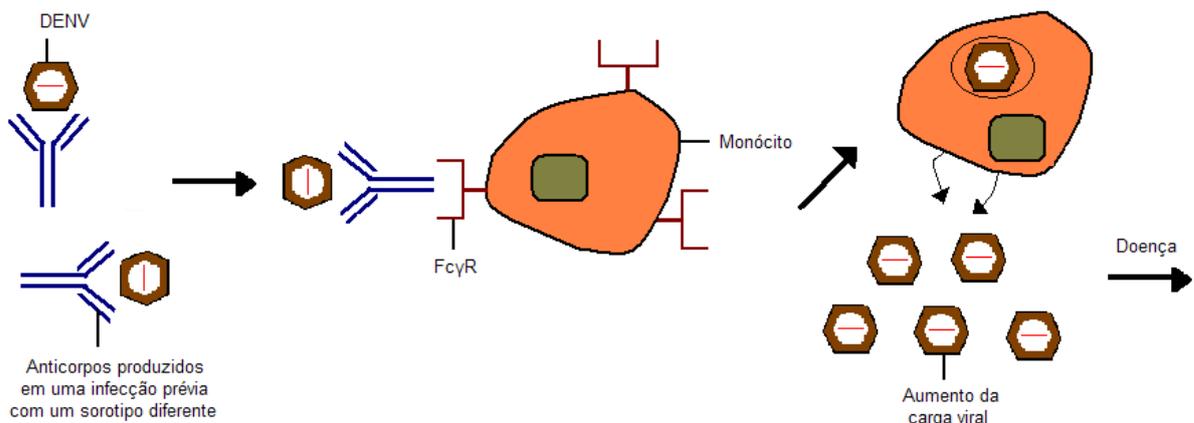


Figura 5. Teoria da infecção sequencial (ADE). Teoria proposta por Halstead em 1970 na qual a infecção sequencial por um sorotipo viral diferente em relação ao anterior leva a uma forma exacerbada da doença. Segundo essa teoria, os anticorpos produzidos na infecção prévia não são capazes de neutralizar as partículas virais da segunda infecção, mas facilitam a sua entrada nas células alvo, como monócitos, por meio da interação com os receptores do tipo Fcγ. Como consequência, há aumento da carga viral e é desencadeada a dengue hemorrágica. Adaptada de Whitehead et al., 2007.

Diversas estratégias têm sido exploradas para produzir uma vacina efetiva na prevenção da dengue. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz tem como principais limitações as dificuldades em se produzir uma vacina tetravalente eficiente e segura. Várias tentativas de desenvolver vacinas para a dengue se baseiam em vacinas de DNA, mas a possibilidade de integração do plasmídeo ao

genoma do hospedeiro ou a expressão por longos períodos de uma proteína antigênica ainda causam restrições para a aprovação das mesmas para o uso em seres humanos (AMORIM; ALVES; FERREIRA, 2009). Já as vacinas de subunidade baseadas em proteínas virais, embora necessitem de adjuvantes para desencadear efeito protetor, induzem respostas imunológicas consideráveis e fornecem flexibilidade quanto às vias de administração (AMORIM; ALVES; FERREIRA, 2009). Dessa forma, as vacinas de subunidade podem ser uma alternativa interessante no caso específico da dengue.

Apesar do risco de desenvolvimento de ADE, muitos trabalhos relatados na literatura utilizam a proteína E do DENV como o principal antígeno para o desenvolvimento de uma vacina baseada em proteínas recombinantes. A imunização de macacos Rhesus com uma vacina de subunidade baseada na proteína E foi capaz de induzir níveis consideráveis de anticorpos neutralizantes e reduzir os níveis de viremia após desafio com DENV (PUTNAK et al., 2003). Várias estratégias têm sido utilizadas para melhorar a imunogenicidade do antígeno EIII, incluindo fusões com proteínas estafilocócicas (SRIVASTAVA et al., 1995), proteína de ligação à maltose de *E. coli* (SIMMONS et al., 1998), e com a proteína P64K de *Neisseria meningitidis* (BERNARDO et al., 2009; HERMIDA et al., 2004).

A incorporação da proteína do capsídeo viral ao domínio EIII em uma forma altamente agregada pode induzir um aumento da resposta imune mediada por células (VALDES et al., 2009). O domínio EIII também pode ser obtido com base nas sequências de consenso dos quatro sorotipos de DENV que foi também relatado como capaz de induzir anticorpos neutralizantes contra todos os sorotipos nos camundongos (LENG et al., 2009). No entanto, os resultados de testes clínicos ainda não demonstraram que essa abordagem vacinal seja realmente promissora para uso em seres humanos. Além disto, a presença de anticorpos voltados para componentes estruturais do vírus criam riscos potenciais para a geração do fenômeno da ADE.

As proteínas não estruturais representam uma alternativa promissora para uma vacina contra a dengue. Por não estarem presentes na partícula viral, as respostas de anticorpos voltadas a elas não oferecem risco de provocar a ADE (HALSTEAD et al., 1970). A NS1 é a proteína não estrutural mais amplamente usada como antígeno vacinal contra a dengue. Vacinas de subunidades que

empregam a NS1 como antígeno foram capazes de induzir a produção de anticorpos e proteção parcial à infecção por DENV (AMORIM et al., 2012b; HENCHAL et al., 1988; SCHLESINGER; BRANDRISS; WALSH, 1987; SRIVASTAVA et al., 1995; ZHANG et al., 1988). Outra estratégia promissora ilustrando a utilização da NS1 como estratégia vacinal se baseia no direcionamento do antígeno para células dendríticas. Essa formulação foi capaz de induzir proteção parcial à infecção por DENV, sendo que esta proteção mostrou estar relacionada a ativação de células T (HENRIQUES et al., 2013).

Vários grupos de pesquisa se dedicaram ao estudo da NS1 como antígeno vacinal, mas evidências clínicas e experimentais apontam para possíveis problemas de segurança. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da dengue ainda não estão esclarecidos em sua totalidade, mas hipóteses sugerem que a NS1 contribui de maneira importante na disfunção dos sistemas circulatório e imune do hospedeiro (AMORIM et al., 2014). Diversos trabalhos já demonstraram que a utilização da NS1 como antígeno vacinal pode causar depleção plaquetária decorrente de anticorpos que reagem cruzadamente, além de apoptose de células endoteliais e ativação do complemento, com dano tecidual no hospedeiro (CHEN et al., 2009; KUROSU et al., 2007; LIN et al., 2002; LIN et al., 2006; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Assim, acredita-se que NS1 possa induzir fenômenos autoimunes em casos de FHD e SCD e sua utilização em vacinas permanece questionável.

Outro potencial alvo para o desenvolvimento de uma vacina contendo componentes não estruturais do vírus da dengue é a proteína NS3. A NS3 tem aproximadamente 70 kDa e apresenta dois domínios: o domínio serino-protease (~18kDa) na região N-terminal e domínio helicase (~52 kDa) na região C-terminal, sendo que há um sítio de ligação ATPase neste último domínio (LESCAR et al., 2008). Após a infecção da célula hospedeira e a tradução do RNA genômico, a poliproteína formada é clivada por proteases da célula hospedeira e viral, que utilizam o segmento hidrofóbico de 40 resíduos da proteína transmembrana NS2B como cofator indispensável para essa atividade. Além disso, a NS3 do DENV é considerada essencial aos processos de replicação e montagem virais e, portanto, desenvolve papéis primordiais na biologia do patógeno (LUO et al., 2007). Ela é processada pela via de proteassoma e epítomos específicos para células T, os quais

se mostram bem conservados entre os quatro sorotipos virais, são processados e apresentados por APCs (LURIA-PEREZ et al., 2007; SPAULING et al., 1998). A referida proteína não está associada a partículas virais livres e, conseqüentemente, não induz a formação de anticorpos anti-DENV facilitadores de infecção.

O domínio helicase da NS3 (NS3H) se estende entre os aminoácidos 169-618 dessa proteína, apresenta um sítio ATPase. As helicases de RNA são enzimas altamente conservadas que utilizam a energia derivada da hidrólise de NTP para modular a estrutura do material genético. Essas helicases participam de todos os processos biológicos que envolvem o RNA, incluindo transcrição e tradução, e têm como papel fundamental o relaxamento de moléculas de RNA para atuação da polimerase (ABDELHALEEM, 2005). A proteína NS3H foi inicialmente obtida por Xu e colaboradores em 2005. Os resíduos 171 a 618 de uma cepa de DENV2 foram amplificados por PCR e um vetor pET32b albergando a sequência foi inserido em uma linhagem de *E. coli* BL21-CodonPlus. A proteína foi expressa e purificada por cromatografia de afinidade a metal. Esse trabalho traz contribuições importantes na resolução da estrutura proteica, mas não abordou suas características imunológicas.

A NS3H (figura 6) possui epítomos capazes de gerar uma resposta citotóxica mediada por linfócitos (CTL). Em uma estratégia vacinal baseada na NS3H foi possível demonstrar a indução de respostas citotóxicas capazes de provocar lise das células infectadas (SPAULDING, et al., 1999). Camundongos de 4 a 8 semanas de idade foram imunizados com DENV (aproximadamente  $10^6$  UFP) ou com vírus *Vaccinia* expressando a NS3 (aproximadamente  $10^7$  UFP). Seus esplenócitos foram retirados e avaliados quanto às sequências que eram capazes de reconhecer na região da NS3H (SPAULDING, et al., 1999). Os autores demonstraram que o menor e mais conservado peptídeo reconhecido se estendia entre os aminoácidos 298 e 306 da NS3.



plasmídeos codificadores da NS3 inteira e de suas porções protease e helicase, fusionados ou não ao peptídeo sinal do ativador de plasmogênio tecidual humano (t-PA), conhecido por mediar a translocação proteica para o retículo endoplasmático e complexo de golgi. As proteínas recombinantes foram expressas em células BHK-21 transfectadas. Camundongos Balb/C foram imunizados e a maioria dos que receberam formulações com plasmídeos que codificam a NS3 inteira ou apenas o seu domínio da helicase sobreviveram ao desafio. Animais que receberam plasmídeos codificadores da NS3H apresentaram sobrevivência de 40 % a 60 % em relação ao seu controle negativo, enquanto 60 % dos que receberam plasmídeos codificadores da NS3 inteira sobreviveram. Segundo os autores, a NS3 mostra-se como um potencial antígeno capaz de ativar o braço celular da resposta imunológica contra a dengue.

O uso de um adjuvante eficiente, capaz de modular respostas protetoras em formulações baseadas em proteínas purificadas, precisa ser levado em conta. Neste contexto, as toxinas termo-lábeis (LTs) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) representam uma alternativa pouco explorada como adjuvantes em vacinas contra dengue. Estas são proteínas heterohexaméricas que consistem de uma subunidade A e cinco subunidades B (AB<sub>5</sub>) que se ligam majoritariamente ao gangliosídeo GM1 expresso ubiquamente na superfície da maioria das células de mamíferos (TRITTO et al., 2007). Quando utilizadas como adjuvantes vacinais, as LTs demonstraram melhorar a apresentação dos antígenos, estimular a proliferação de células T e produção de citocinas, além de promover uma relevante resposta de IgG e IgA de mucosa (MARINARO et al., 2003). No entanto, o uso das LTs como adjuvantes vacinais precisa considerar uma importante característica dessa proteína, qual seja, sua toxicidade intrínseca. Além de estimular a resposta imune dirigida contra um antígeno coadministrado, as LTs também provocam fortes respostas humoral e celular imunogênicas contra si mesmas. A LTK63 pode ser utilizada como alternativa, pois é um exemplo de mutante atóxico que apresenta a substituição de uma serina por uma lisina na posição 63 da subunidade A, região onde o NAD<sup>+</sup> interage com a toxina para que o ADP-ribosil possa ser transferido para a proteína G<sub>sα</sub> (RAPPUOLI et al., 1999; RYAN et al. 2000). Essa mutação origina uma proteína com atividade adjuvante parcialmente preservada e perda completa da atividade

enzimática, com consequente redução significativa na sua toxicidade. (RAPPUOLI et al., 1999; RODRIGUES et al., 2010; RYAN et al. 2000).

Os oligonucleotídeos ricos em C e G (CpG) são pequenas moléculas de DNA sintéticas que contém citosina e guanina e atuam como imunoestimulantes. Eles apresentam motivos considerados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), e ativam a produção de citocinas e a resposta tipo Th1 ao antígeno utilizado, além de poder aumentar o número de células TCD8+ produtoras de IFN- $\gamma$  (HUBBELL; THOMAS; SWARTZ, 2009; WEINER et al., 1997).

Outro adjuvante utilizado foi o hidróxido de alumínio. Sais de alumínio são amplamente empregados em pesquisas e ainda representam a única alternativa para as vacinas administradas em seres humanos no Brasil e no continente americano (RESENDE et al., 2004).

## 1 OBJETIVO

O principal objetivo da presente dissertação foi produzir uma proteína NS3H recombinante do DENV2 com propriedades próximas às da proteína nativa para então utilizá-la no desenvolvimento uma nova vacina de subunidades contra o vírus dengue.

Em uma primeira etapa nos dedicamos a gerar uma forma recombinante da NS3H em sistema de procarioto e avaliamos suas propriedades conformacionais, funcionais e imunológicas. Em uma segunda etapa, avaliamos o uso da NS3H recombinante como antígeno vacinal pela medição de respostas imunológicas induzidas e proteção conferida a desafio frente a uma linhagem de DENV2 capaz de infectar camundongos imunocompetentes.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Extração do RNA viral e transcrição reversa

A cepa de dengue disponível no laboratório, conhecida como JHA1 (número de acesso *GenBank* JQ686088; AMORIM et al., 2012a) foi propagada em células da linhagem C6/36 (ATCC) cultivadas em meio Leibovitz (L-15) tamponado com bicarbonato de sódio (Sigma, USA) e suplementado com soro fetal bovino. Para extração de RNA viral, 250 µL de uma alíquota das células C6/36 previamente infectadas com o JHA1 foram misturados a 750 µL de Trizol (Invitrogen) e incubados à temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Um volume de 200 µL de clorofórmio foi adicionado à mistura inicial, a qual foi agitada e incubada por 15 minutos a TA. A mistura foi centrifugada a 20817 x g por 10 minutos a 8 °C e a fase aquosa foi coletada. Então, foram adicionados, 500 µL de isopropanol e a mistura foi novamente incubada por 10 minutos a TA. O tubo foi outra vez centrifugado a 20817 x g por 10 minutos a 8 °C, o sobrenadante foi removido e o material sedimentado foi lavado com etanol 75 % (v/v). Após uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores, o material foi seco ao ar e a mistura foi, finalmente, suspensa em 20 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato a 7mM) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

O RNA extraído foi armazenado a -80 °C ou imediatamente submetido à transcrição reversa para síntese de DNA complementar com subsequente reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), usando oligonucleotídeos iniciadores específicos (tabela 1) para amplificação da sequência gênica codificadora da proteína NS3H, de acordo com o fabricante do kit utilizado (SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix – Invitrogen, EUA).

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores utilizados na transcrição reversa do gene da NS3H. Em destaque, as enzimas e seus respectivos sítios de restrição. Foi utilizada uma sequência molde (número de acesso *GenBank* GQ398257) para o desenho dos iniciadores.

Iniciador	Sequência
FwBamHINS3H	AAACGT <b>GGATCC</b> GAAAAAAGTATTGAAGAC
RvHindIIINS3H	AACTTCA <b>AAGCTT</b> CTTTCTTCCGGCTGCAAA

## 2.2 Sequenciamento do gene codificador da NS3H

A fim de determinar a sequência de nucleotídeos do gene codificador da NS3H deste isolado, os produtos da PCR foram purificados com o kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences, EUA) e usados diretamente nas reações de sequenciamento. A amostra foi sequenciada em ambas as orientações (Sequenciador MegaBACE, GE Healthcare, EUA) e foram utilizados mais quatro oligonucleotídeos (tabela 2) além dos utilizados na RT-PCR (tabela 1). A sequência de nucleotídeos foi submetida à análise por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para confirmação de correspondência da mesma com outras já descritas na literatura.

Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados no sequenciamento do gene da NS3H. Foi utilizada uma sequência molde (número de acesso *GenBank* GQ398257) para o desenho dos iniciadores.

Iniciador	Sequência
FwSeqNS3H1	AACCAATGATTGGGACTTCG
FwSeqNS3H2	ATGCCATTGATGGTGAATACC
RvSeqNS3H1	TGGTGATAGCAGCCTCATAGT
RvSeqNS3H2	TTGAAGTTGGCACCCATTC

## 2.3 Amplificação do gene que codifica a proteína NS3H

A fim de aumentar a quantidade de DNA, após a RT-PCR, o DNA foi purificado e utilizado como molde nas reações de PCR (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (m/v) e corados com brometo de etídeo 0,1 % (v/v).

## 2.4 Clonagem do gene que codifica para a NS3H em vetor de expressão pET28a (Novagen)

O gene que codifica para a NS3H foi subclonado com auxílio das endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Fermentas) de acordo com as orientações dos fabricantes. O vetor de expressão pET28a também foi digerido com

as mesmas enzimas. Os produtos das digestões foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8 % (massa/volume). A banda contendo o fragmento correspondente ao gene da NS3H foi eluída do gel utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) conforme instruções do fabricante. Para a reação de ligação foi utilizada a razão molar inserto/vetor de 3:1 e as condições da reação seguiram as instruções do fabricante para o uso da T4 DNA ligase (Fermentas). Uma alíquota de 10 µL da reação de ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5alfa quimiocompetentes conforme descrito anteriormente. Os clones foram confirmados pela análise de restrição do plasmídeo extraído pelo método de lise alcalina com posterior visualização dos perfis de restrição em gel de agarose 0,8 % (massa/volume). O plasmídeo albergando o gene codificador da NS3H foi chamado pETNS3H e apresentava uma cauda de histidina N-terminal que, posteriormente, possibilitaria a purificação da proteína por cromatografia de afinidade ao níquel.

## **2.5 Escolha da linhagem de expressão da proteína recombinante NS3H**

Para os ensaios de expressão *in vitro* da NS3H foram utilizadas três linhagens de *E. coli* capazes de expressar proteínas recombinantes induzíveis por IPTG. As linhagens utilizadas estão descritas na tabela 3. Primeiramente, as linhagens recombinantes foram crescidas por aproximadamente 18h em meio LB com canamicina. Este pré-inóculo foi utilizado na diluição de 1:100 em meio LB, e mantido a 37°C sob agitação (200 rpm) até a fase de crescimento exponencial (DO 600 nm 0,5 – 0,8), quando se acrescentou à cultura o indutor IPTG na concentração final de 0,5 mM. Foram retiradas amostras para análise antes da adição de IPTG (cultura não induzida) e após diferentes períodos de incubação (culturas induzidas). As amostras recolhidas foram centrifugadas a 8000 x g por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Quantidades semelhantes de extratos celulares foram misturadas com tampão de amostra de eletroforese [Tris-HCL a 200 mM pH 6,8; SDS a 8 % (massa/volume); Glicerol a 40 % (v/v), azul de bromofenol a 0,4 % (m/v); 2-β-mercaptoetanol a 200 mM], incubadas a 100 °C por 10 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %). Após o término da corrida o gel foi corado com Comassie Blue conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

Tabela 3 – Características das linhagens bacterianas utilizadas nos testes de expressão da NS3H.

Linhagem	Resistência	Características	Vantagens
<b>BL21 DE3</b>	--	Deficiente nas proteases <i>lon</i> e <i>ompT</i>	Hospedeira comum para expressão
<b>BL21 (DE3) RIL</b>	Cloranfenicol	Contem plasmídeos codificando <i>argU</i> , <i>ileX</i> e <i>leuW</i>	Hospedeira comum para expressão, permite expressão de genes codificando tRNAs de códons raros
<b>BL21 (DE3) Roseta</b>	Cloranfenicol	Mutante de lactose permease, não apresenta protease, contem plasmídeos codificando <i>argU</i> , <i>argW</i> , <i>glyT</i> , <i>ileX</i> , <i>leuW</i> , <i>metT</i> , <i>prol</i> , <i>thrT</i> , <i>thrU</i> e <i>tyrU</i>	Hospedeira comum para expressão, permite expressão de genes codificando tRNAs de códons raros

## 2.6 Procedimentos para a expressão e purificação da NS3H recombinante

A linhagem BL21 (DE3) RIL albergando o plasmídeo pETNS3H (BLNS3H) foi cultivada em 1L de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina a 37 °C até uma densidade óptica de 0,5 a 600 nm. O indutor de expressão IPTG foi adicionado para uma concentração final de 0,5 mM. Após o tempo de indução (2h, 4h ou 24h), as células sedimentadas foram suspensas em PBS (pH 7,2) e submetidas à lise mecânica (600 bar por 15 minutos) em um homogeneizador modelo APLAB-10 (ARTEPEÇAS, Brasil). O material foi centrifugado (20670 x g por 60 minutos) e a fração contendo os corpos de inclusão foi suspensa em tampão A1 [Tris 100 mM, NaCl 500mM, 8 M Uréia, pH 7,2] durante a noite.

No dia seguinte, o material foi novamente centrifugado (20670 x g por 60 minutos) e, posteriormente, filtrado (0,22 µm, Biotech) para submissão à cromatografia de afinidade ao níquel usando uma coluna *Histrap*<sup>TM</sup> FF (GE Healthcare Life Sciences) no cromatógrafo AKTA FLPC (Amershan Pharmacia Biotech). A proteína foi purificada para tampão B1 [Tris 100 mM, NaCl 500 mM, 8 M Uréia, 1 M Imidazol, pH 7,2], as frações coletadas contendo a NS3H foram agrupadas e as alíquotas correspondentes à proteína eluída foram dialisadas para solução fisiológica em membranas de diálise para a retirada do Imidazol. As

amostras foram quantificadas em SDS-PAGE 15 % e pelo método de Bradford segundo instruções do fabricante.

As tentativas de solubilização da proteína recombinante purificada em uréia foram feitas tomando por base os resultados obtidos previamente com a proteína NS1 (AMORIM et al., 2010). Foram testados os métodos de diálise direta, diálise gradual, filtração tangencial, diluição pulsada e *refolding* na coluna, os quais tem o semelhante principio de troca gradual do tampão até a retirada total da ureia e a manutenção da estabilidade da proteína em solução.

## **2.7 Otimização das condições de cultivo e indução visando obtenção da proteína na forma solúvel**

Tentativas de otimização da expressão da NS3H foram realizadas por meio de alterações nas variáveis aeração e temperatura. A linhagem BL21 (DE3) RIL albergando o plasmídeo pETNS3H (BLNS3H) foi cultivada em 1L de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina a 4 °C, 18 °C ou 37 °C até uma densidade ótica de 0,5 a 600 nm. O indutor de expressão IPTG foi adicionado para uma concentração final de 0,5 mM. Após o tempo de indução (2h, 4h ou 24h), as células sedimentadas foram suspensas em PBS (pH 7,2) e submetidas à lise mecânica (600 bar por 15 minutos) em um homogeneizador modelo APLAB-10 (ARTEPEÇAS, Brasil). O material foi centrifugado (20.670 x g por 60 minutos) e suspenso em tampão A2 [Tris 100 mM, NaCl 500 mM, 20 % glicerol, pH 7,2]. Em seguida, o material foi filtrado (0,22 µm, Biotech) para submissão à cromatografia de afinidade ao níquel usando uma coluna *Histrap*<sup>TM</sup> FF (GE Healthcare Life Sciences) no cromatógrafo AKTA FLPC (Amershan Pharmacia Biotech).

## **2.8 Procedimentos para a purificação da NS3H recombinante solúvel**

O material preparado, conforme descrito no item 3.7., foi aplicado em coluna His-Trap HP de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) acoplada ao cromatógrafo, a qual coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) com tampão A2. A amostra foi aplicada à coluna em um fluxo de 1 mL/minuto, e a coluna foi lavada novamente com 100 ml de tampão A2. A proteína foi eluída para tampão B2

[Tris 100 mM, NaCl 500 mM, 1M Imidazol, 20 % glicerol, pH 7,2] utilizando-se um gradiente linear de Imidazol (0 a 100 %) a partir da mistura do tampão A2 com o tampão B2. Posteriormente, foi realizada a limpeza da coluna segundo instruções do fabricante. As frações coletadas contendo a NS3H foram agrupadas e as alíquotas correspondentes à proteína eluída foram dialisadas para solução fisiológica em membranas de diálise para a retirada do Imidazol. Para as condições aqui mencionadas, como a proteína se apresentava no extrato solúvel, as técnicas de renaturação não se fizeram necessárias. As amostras foram quantificadas em SDS-PAGE 15 % e pelo método de Bradford segundo instruções do fabricante.

## **2.9 Avaliação da função biológica da proteína NS3H**

Os testes para avaliação da função biológica da proteína NS3H e comparação da sua antigenicidade e imunogenicidade em relação à proteína nativa foram realizados por meio de ensaios de *western blot*, citometria de fluxo e imunofluorescência.

### **2.9.1 Western blot**

Células LLCMK2 foram infectadas com a cepa JHA1 DENV2 na multiplicidade de infecção (MOI) de 5. Trinta e seis horas após a infecção, as células foram fervidas (100 °C por 10 minutos), centrifugadas a 340 x g por 5 minutos e o sobrenadante (fração solúvel) foi reservado. A fração insolúvel foi ressuspensa em tampão de corrida e fervida. Quantidades iguais de cada amostra foram aplicadas em gel desnaturante, o qual foi posteriormente transferido para uma membrana de *western blot*. Como primeiro anticorpo, foi utilizado soro de camundongo anti-NS3H recombinante (ver item 3.12) e um segundo produzido em cabra contra IgG de camundongo conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Invitrogen).

### **2.9.2 Citometria de fluxo**

Amostras de células LLCMK2 foram infectadas com o vírus JHA1, fixadas com 4 % de paraformaldeído e tratadas com tampão de permeabilização contendo saponina e soro fetal bovino. As células foram tratadas com soro de camundongos anti-NS3H recombinante (ver item 3.12). O segundo anticorpo foi um produzido em cabra contra IgG de camundongo conjugado ao FITC (Invitrogen). As amostras foram analisadas em citômetro do modelo Calibur.

### **2.9.3 Imunofluorescência**

Amostras de células LLCMK2 foram infectadas com o vírus JHA1 sobre lamínulas estéreis em MOI de 1. A fixação e o bloqueio ocorreram como descrito no item 3.9.2. Foi adicionado o primeiro anticorpo mencionado nos tópicos anteriores e, em seguida, um segundo anticorpo gerado em cabra contra IgG de camundongos marcado com Alexa 488 (Invitrogen). As amostras também foram tratadas com uma mistura contendo os fluoróforos 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI, cor azul) e faloidina (cor vermelha) e, após o fim da incubação, as amostras foram lavadas e analisadas em microscópio de imunofluorescência.

## **2.10 Análise conformacional da proteína NS3H recombinante**

Medições de dicroísmo circular (CD) foram realizadas com um espectropolarímetro JASCO J-810 equipado com um controlador de temperatura do tipo Peltier e um suporte com célula termostatizada, em interface com um banho termostático. Os espectros foram registrados de acordo com Martino e colaboradores (2011). As amostras diluídas de NS3H em 20 mM Tris-HCl pH 8,0, foram submetidas a análise de CD. Vinte exames consecutivos a 200-260 nm foram compilados e os espectros de média armazenados. Os dados foram corrigidos para a contribuição da linha de base do tampão. Ensaios de estabilidade térmica foram realizados através do aumento da temperatura de 10 °C a 100 °C, permitindo o equilíbrio de temperatura durante 5 minutos antes da gravação de cada espectro.

Análises de CD de amostras de NS3H e do RNA viral foram realizadas com as concentrações de 93 ng/ml e 70 ng/ml, respectivamente, após diluição em água. Os resultados foram adquiridos a 220-340 nm.

### **2.11 Eficiência da síntese de cDNA em presença da NS3H medida por PCR em tempo real**

Para esse experimento, o kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN, Germany) foi utilizado para extrair o RNA do vírus dengue de acordo com instruções do fabricante. A amostra foi quantificada e 400 ng do RNA viral foram utilizadas para cada reação. Todas as reações foram transcritas reversamente em um volume final de 20  $\mu$ L, utilizando 1  $\mu$ L do iniciador TS2 a 10  $\mu$ M (LANCIOTTI et al, 1992) e a transcriptase reversa SuperScript® II (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante para a reação padrão. Uma reação controle positivo seguiu a mesma preparação da reação padrão, exceto pela adição de 1  $\mu$ L de dATP a 10 mM. Algumas modificações foram preparadas para as reações incubadas com 0,1  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g e 1,0  $\mu$ g da proteína recombinante NS3H e para o controle negativo (sem a adição da NS3H). Para essas reações, a desnaturação da amostra de RNA foi realizada através da incubação a 37 °C por 15 minutos na presença de 1  $\mu$ L de dATP a 10 mM, diferentemente da reação padrão e do controle positivo, os quais foram incubados a 65 °C por 15 minutos no primeiro passo.

Para quantificar o rendimento da síntese de cDNA entre as reações padrão, controle e incubadas com a NS3H, foram utilizadas reações de PCR quantitativas. A quantificação absoluta das cópias de genoma viral foi realizada com a mistura indicada no kit Thermo Scientific Maxima Sybr Green qPCR Master (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) no termociclador Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf, Hamburg, Germany) utilizando procedimentos padronizados pelo fabricante. Para construir a curva padrão, um fragmento amplificado gerado pelos iniciadores TS2 e D1 (LANCIOTTI et. al, 1992) foi clonado no vetor pCR 2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit - Invitrogen) e diluições seriadas de concentrações conhecidas desse plasmídeo foram utilizadas. Os iniciadores TS2 and D1 foram utilizados em um volume final de reação de 20  $\mu$ L e as amostras (2  $\mu$ L de cada) foram avaliadas em triplicata, em dois experimentos independentes. Curvas de

*melting* foram analisadas comparando as reações do plasmídeo padrão e com as amostras para validar a especificidade do *amplicon*.

## **2.12 Geração de anticorpos específicos em camundongos**

Camundongos Balb/C com 8 semanas de idade foram submetidos a um regime de imunização composto por três doses da formulação vacinal administrada por via subcutânea nos dias 0, 14 e 28. Os animais foram inoculados com 10 µg de NS3H coadministrada com adjuvante de Freund (NUNES et al., 2009) (50 % v/v), adjuvante completo na primeira dose e o adjuvante incompleto nas injeções subsequentes. O grupo controle negativo foi injetado com solução salina (pH 7,0). Os camundongos foram sangrados através do plexo retro-orbital, antes de cada dose da vacina e uma semana após a última administração. Os anticorpos policlonais obtidos foram utilizados nos ensaios para detecção de NS3H.

## **2.13 Avaliação dos efeitos fisiológicos associados à imunização com NS3H**

O nível de segurança da administração da NS3H coadministrada com o adjuvante de Freund foi determinado por análises dos níveis de leucócitos totais e de níveis de desidrogenase láctica (LDH) conforme descrito anteriormente (AMORIM et al., 2012a; VERRASTRO; LORENZ; WENDEL-NETO, 1996).

## **2.14 Procedimentos de imunização com a proteína recombinante**

Camundongos da linhagem Balb/C foram inoculados por via intramuscular e divididos em cinco grupos de acordo com o agente inoculado. Os grupos foram: 1) animais que receberam apenas PBS; 2) animais que receberam apenas o antígeno vacinal (10 µg de NS3H expressa em sistema procarioto); 3) animais que receberam 10 µg de NS3H coadministrada com 5 µg do adjuvante LTK63; 4) animais que receberam 10 µg de NS3H co-administrada com 1.25 µg do adjuvante hidróxido de alumínio; 5) animais que receberam 10 µg de NS3H co-administrada com 1 µg do adjuvante CpG. Cada grupo de animais (n=10) recebeu três doses da vacina ou controle (apenas antígeno vacinal ou PBS), dadas 2 semanas à parte. Para o monitoramento de resposta de anticorpos específicos contra o antígeno vacinal, os

animais foram sangrados por punção retro-orbital antes da imunização (soro pré-imune) e em vários intervalos de tempo após cada imunização (figura 7).

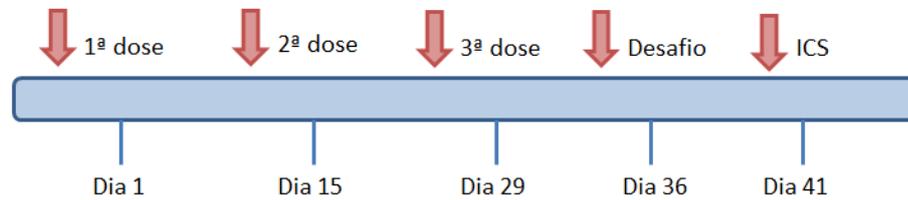


Figura 7. Protocolo vacinal e do desafio. Os animais receberam três doses com intervalos de duas semanas e foram desafiados uma semana após a última dose. Os animais desafiados foram acompanhados por 21 dias para avaliação da proteção por observação da sobrevivência. As setas indicam as sangrias realizadas para avaliação da resposta imune humoral. Cinco dias após o desafio, os animais foram sangrados para a realização do experimento de ICS.

### **2.15 Desafio dos animais imunizados com a proteína recombinante com um isolado de DENV2**

Uma semana após a terceira dose vacinal, os camundongos dos grupos controle ou vacinados foram desafiados pela via intracraniana com a cepa JHA1 de DENV2, obtida a partir de indivíduo infectado e caracterizada em nosso laboratório (AMORIM et al., 2012a). Os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina-xilazina comercialmente obtida e inoculados por via intracraniana com 100 UFP da linhagem JHA1 de DENV2 em meio DMEM (Vitrocell). Os camundongos foram separados em grupos (n = 10) para cada teste. Cada grupo foi imunizado por via intramuscular com uma formulação específica contendo o antígeno NS3H acrescido de um dos adjuvantes testados. Os animais foram acompanhados por 21 dias quanto aos sinais de mortalidade.

### **2.16 Avaliação da antigenicidade da NS3H frente a soros de humanos e animais infectados.**

A antigenicidade da NS3H frente aos soros de humanos e animais infectados foi determinada por meio de ensaios de ELISA utilizando a proteína fervida (100 °C por 10 minutos) ou não fervida. O soro de humano infectado com DENV2 foi gentilmente doado pelo Dr. Bergmann Morais Ribeiro, o qual é pesquisador da

biologia molecular de arbovírus na Universidade de Brasília. Já o soro de camundongos utilizado foi o obtido nesse trabalho após a sangria de animais infectados pelo vírus JHA1.

### **2.17 Detecção de células T CD8+ produtoras de IFN- $\gamma$ nos animais desafiados**

A marcação de IFN- $\gamma$  intracelular (*ICS - intracellular cytokine staining*) foi realizada com células mononucleares de sangue periférico de camundongos desafiados coletadas cinco dias após o desafio. As células foram tratadas por cinco minutos com ACK Lising Buffer (BioSource International) até a ruptura das hemácias e então centrifugadas a 1300 rpm por 5 minutos. As células foram incubadas em concentrações equivalentes por poço por 12 horas a 37 °C suplementadas com 5 % de CO<sub>2</sub> na presença de Brefeldin A (GolgiPlus; BD Biosciences) e ausência ou presença do peptídeo CTL específico GYISTRVEM (LURIA-PEREZ et al., 2007, SPAULDING et al., 1999) que se está compreendido entre os aminoácidos 298 e 306 da sequência da NS3H. Após este período, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com anticorpo anti-CD8 conjugado com FITC (BD Biosciences). Após a fixação e a permeabilização conforme instruções do fabricante, as células foram tratadas com anti-IFN- $\gamma$  conjugado com ficoeritrina (PE) (BD Biosciences) por 30 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em PBS e examinadas por citometria de fluxo no aparelho FACS Calibur (BD Biosciences). Os dados resultantes foram analisados no programa FlowJo para a determinação da porcentagem de células positivas sobre o total de células.

### **2.18 Ética no uso de animais**

Todos os experimentos envolvendo animais de laboratório estavam de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

## 2.19 Análises estatísticas

Análises de variância (ANOVA) foram realizadas com subsequente teste de comparação múltipla de Bonferroni. As análises de dois grupos foram realizadas por teste *t-Student*. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Obtenção do gene codificador da NS3H

O primeiro passo para a obtenção do gene codificador da NS3H foi a extração do RNA viral (linhagem JHA1 de DENV2), seguido da utilização desse material genético para a transcrição reversa (RT-PCR). Inicialmente foram realizadas análises *in silico* no programa PrimerSelect, a partir das quais foi inferida a temperatura ótima de anelamento dos iniciadores à sequência de interesse, qual seja, 55,8 °C.

Em seguida, foram realizadas reações de PCR com teste de diferentes temperaturas de anelamento a partir da temperatura ótima inferida nas análises *in silico*. Foram testadas as temperaturas 55,1 °C, 55,2°C, 55,5 °C, 56,0 °C, 56,7 °C, 57,4 °C, 58,2 °C, 58,9 °C, 59,6 °C, 60,2 °C, 60,6 °C e 60,8 °C (figura 8 A, amostras 1-12). Como o padrão de amplificação foi muito similar para todas as condições, decidiu-se manter a temperatura prevista no programa PrimerSelect. O fragmento obtido foi, então, sequenciado e a identidade da sequência, confirmada. De posse da sequência do DNA da NS3H, a mesma foi comparada com outras disponíveis no banco de dados do programa BLAST e se confirmou que a sequência analisada correspondia ao DNA codificador de uma helicase do sorotipo dois de uma cepa do vírus dengue.

Após a obtenção do DNA, todo o material foi purificado (figura 8 B). A clonagem do gene codificante da proteína NS3H foi feita no vetor pGEM T-easy e amplificado em *E. coli* DH5alfa de forma a aumentar o material de partida para posterior clonagem em vetor do sistema pET. Em seguida, o plasmídeo foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e a banda correspondente ao inserto de interesse foi excisada do gel de agarose. Foi feita a ligação no vetor pET28a, o qual passou a ser chamado pETNS3H, e a análise de restrição confirmou a ligação realizada (figura 8 C). O inserto e o produto da clonagem foram sequenciados e a sequência de interesse confirmada.

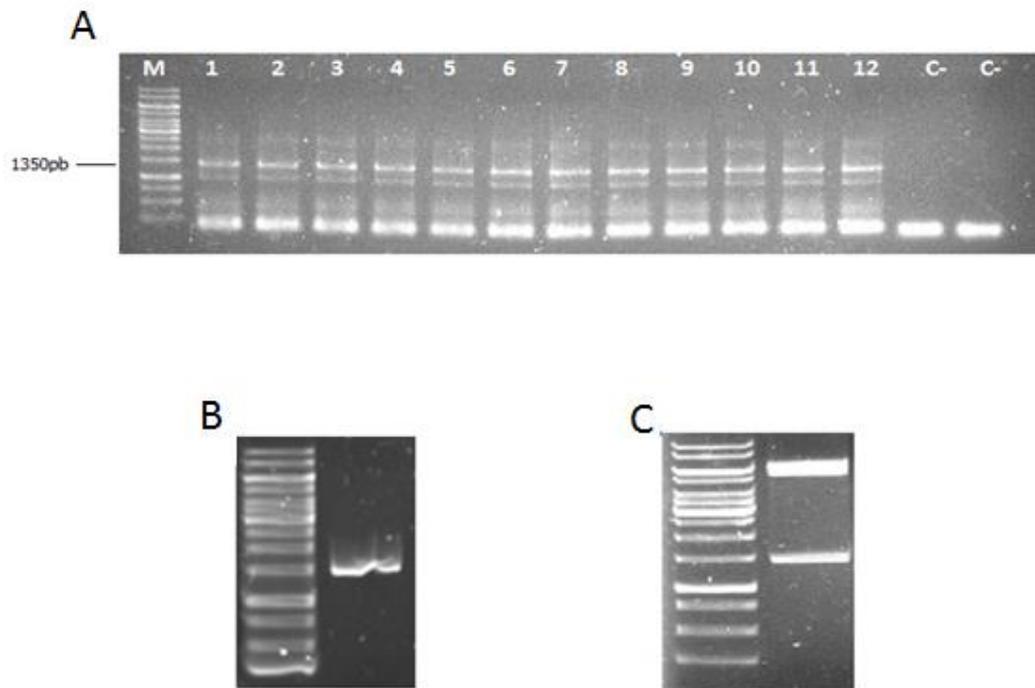


Figura 8. Obtenção do gene codificador da NS3H. A. Gradiente de temperatura de anelamento no PCR e os controles negativos das reações (reagentes sem DNA). 1= 55,1 °C; 2= 55,2°C; 3= 55,5 °C; 4= 56,0 °C; 5= 56,7 °C; 6= 57,4 °C; 7= 58,2 °C; 8= 58,9 °C; 9= 59,6 °C; 10= 60,2 °C; 11= 60,6 °C e 12= 60,8 °C. A reação de PCR foi realizada após a transcrição reversa do RNA viral (RT-PCR). B. Produto de PCR purificado correspondente à sequência codificadora da NS3H. C. Análise de restrição da sequência codificadora da NS3H clonada em vetor pET28a e isolamento do fragmento de interesse.

### 3.2 Otimização da expressão e da purificação da NS3H

Com as construções confirmadas na linhagem DH5 $\alpha$  de *E. coli*, partimos para os testes de expressão. Foram testadas três linhagens de *E. coli* BL (figura 9): *E. coli* BL21 (DE3) (figuras 9 A e 9 B), BL21 (DE3) RIL (figuras 9 C e 9 D) e BL21 (DE3) Roseta (figuras 9 E e 9 F), crescidas a 37 °C em rotação de 200 rpm. Para esses ensaios, foram coletadas amostras nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 horas após a indução, além das frações solúvel e insolúvel. Foram realizadas análises da expressão por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 15 % (figuras 9 A, 9 C e 9 E) e *Western blot* (figuras 9 B, 9 D e 9 F). Foi possível observar que apenas a linhagem BL21 (DE3) RIL transformada com o pETNS3H apresentou superexpressão da proteína NS3H recombinante, o que foi evidenciado pela presença de uma banda intensa na altura esperada para a proteína, qual seja, correspondente a 55 kDa em SDS-PAGE

(figura 9 C) e confirmada por *Western blot* (figura 9 D). Vale lembrar que o nosso objetivo nesse experimento foi escolher a melhor linhagem para a expressão da proteína. A linhagem BL21 (DE3) expressou a proteína, como pode ser observado no experimento de *Western blot* (figura 9 B), mas sua expressão foi inferior à linhagem BL21 (DE3) RIL. A partir de então, esta linhagem foi chamada BLNS3H e escolhida para dar continuidade aos experimentos.

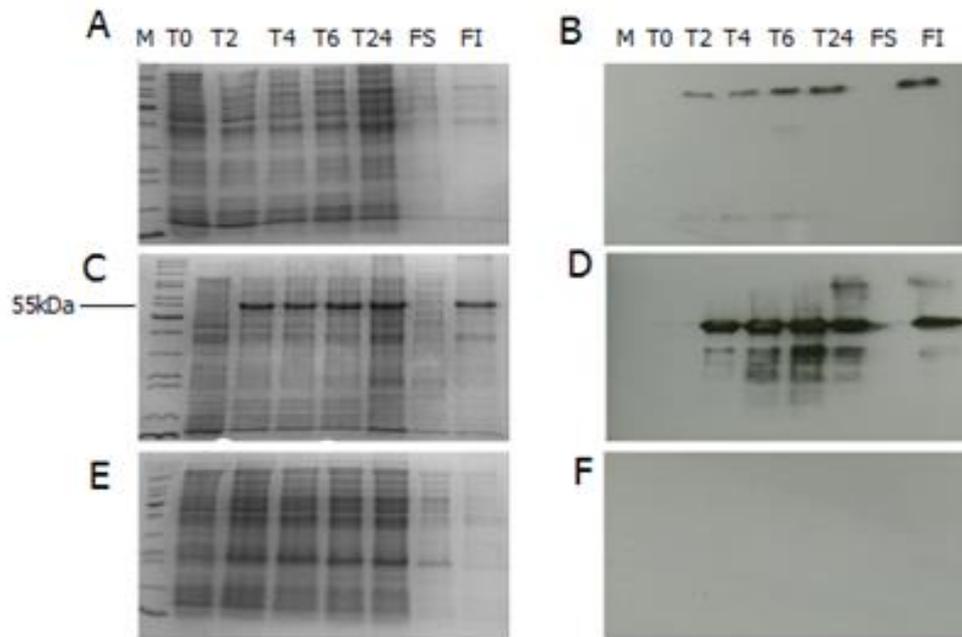


Figura 9. Teste para avaliação da expressão da NS3H em diferentes linhagens de *E. coli*. A) SDS-PAGE das frações T0, T2, T4, T6, T24, FS e FI na linhagem BL21 DE3. B) *Western blot* correspondente ao painel A. C) SDS-PAGE das frações T0, T2, T4, T6, T24, FS e FI na linhagem BL21 DE3 RIL. D) *Western blot* correspondente ao painel C. E) SDS-PAGE das frações T0, T2, T4, T6, T24, FS e FI na linhagem BL21 DE3 Roseta. F) *Western blot* correspondente ao painel E. As bactérias foram cultivadas a 200rpm, 37°C por 24h, quando foram coletadas as frações acima descritas. Todas as linhagens testadas carregavam o vetor pETNS3H. T0: extrato bacteriano não induzido; T2: extrato bacteriano após duas horas de indução; T4: extrato bacteriano após quatro horas de indução; T6: extrato bacteriano após seis horas de indução; T24: extrato bacteriano após 24 horas de indução; FS: fração solúvel; FI: fração insolúvel.

A NS3H foi obtida na fração insolúvel do extrato de bactérias induzidas (figuras 9 C e 9 D), de forma que foi necessário proceder com uma etapa de desnaturação com uréia para posterior renaturação no sentido de obtermos a proteína na forma solúvel. O extrato ressuspenso em uréia foi injetado no cromatógrafo AKTA FLPC. Para purificação da proteína NS3H recombinante, foi utilizada a cromatografia de afinidade ao níquel e o cromatograma resultante está apresentado na figura 10 A. Observamos a ocorrência de um único pico no processo

de eluição da NS3H, o que indica que as frações eluídas apresentam moléculas proteicas com afinidades similares à resina de níquel. Posteriormente, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida a 15 %, a partir do qual foi possível verificar que a NS3H purificada possui em tamanho aproximado de 55 kDa, como já esperado. As amostras correspondentes aos números do cromatograma estão representadas nas figuras 10 B e 10 C.

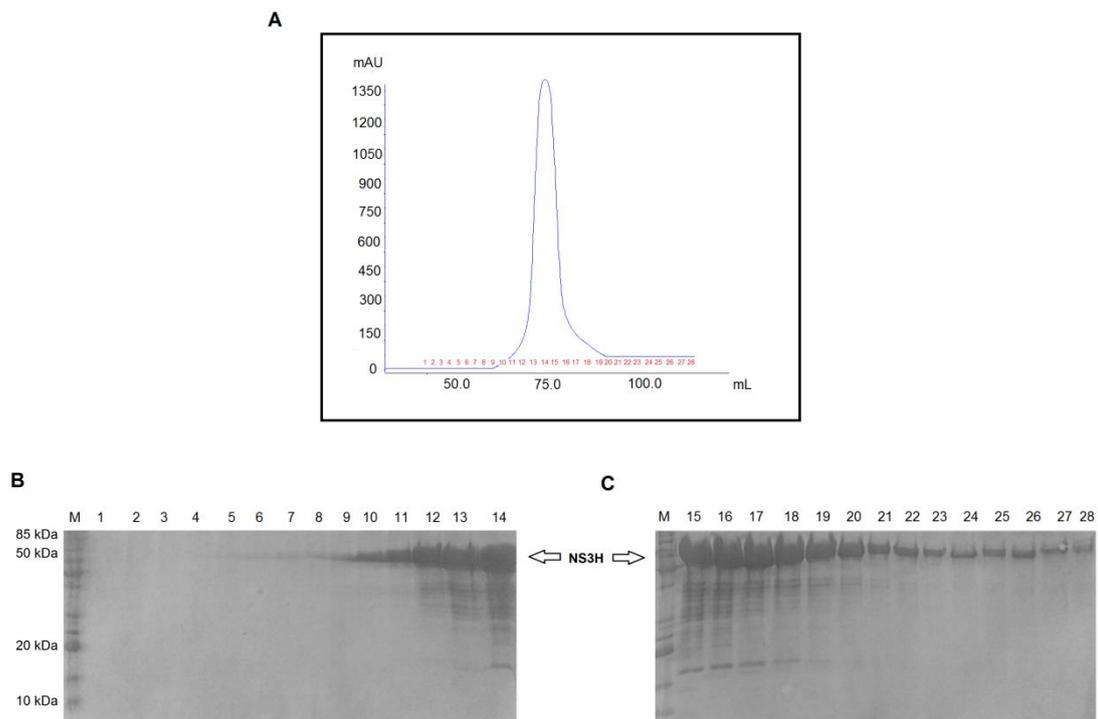


Figura 10. Purificação da NS3H em uréia. A. Cromatograma no AKTA FLPC correspondente à purificação da NS3H. Em destaque as frações nas quais a proteína purificada foi obtida. B e C. Análise das frações da purificação da NS3H correspondentes às encontradas no cromatograma.

Após a obtenção da proteína em uréia, foram realizados subsequentes procedimentos de renaturação, que, nesse caso, consistem na remoção gradual do agente desnaturante e a recuperação da conformação nativa da proteína. Os métodos de renaturação testados foram diálise direta, diálise gradual, filtração tangencial, diluição pulsada e renaturação na coluna HisTrap (tabela 4).

Tabela 4. Descrição dos métodos de renaturação testados para a obtenção da proteína NS3H solúvel

<b>Técnica</b>	<b>Descrição</b>	<b>Precipitação</b>
<b>Diálise direta</b>	Troca de tampão direta de 8M de ureia para 0M de ureia	Total
<b>Diálise gradual</b>	Troca de tampão gradual utilizando concentrações intermediárias de uréia	Total
<b>Filtração tangencial</b>	Membrana separa moléculas em suspensão e atua como filtro	Total
<b>Diluição pulsada</b>	Amostra concentrada é adicionada lentamente ao tampão sem ureia	Total
<b>Renaturação na coluna HisTrap</b>	Troca gradual dos tampões com ureia ainda quando a proteína está ligada na coluna	Total

Todos os métodos acima descritos foram testados sem sucesso, e a proteína resultante apresentou alta instabilidade e precipitou totalmente (Tabela 4). Buscamos, desta forma, otimizar as condições expressão da proteína NS3H a partir de modificações nas condições de cultivo da linhagem bacteriana e indução da expressão da proteína recombinante. Foram testadas diferentes condições de aeração (0 rpm e 200 rpm), temperatura (4 °C, 18 °C e 37 °C) e tempos de indução (4, 20 e 24 horas) para a obtenção da NS3H na forma solúvel do extrato bacteriano (figura 10).

A linhagem BL21 DE3 RIL crescida a 0 rpm e 37 °C apresentou uma reduzida expressão da proteína NS3H no extrato insolúvel após 24 horas de indução evidenciada apenas por SDS-PAGE (figuras 11 A e 11 B). A mesma linhagem cultivada em 200 rpm e 18 °C (figura 11 C) apresentou uma considerável expressão da NS3H recombinante no extrato solúvel confirmada por *Western blot* (figura 11 D). Quando a linhagem BL21 DE3 RIL foi cultivada a 0 rpm e 18 °C (figuras 11 E e 11 F), 0 rpm e 4 °C (figuras 11 G e 11 H), 200 rpm e 4 °C (figura 11 I e 11 J), novamente foi possível observar uma expressão da NS3H recombinante apenas no extrato insolúvel e consideravelmente reduzida em relação à condição de 200 rpm e 37 °C.

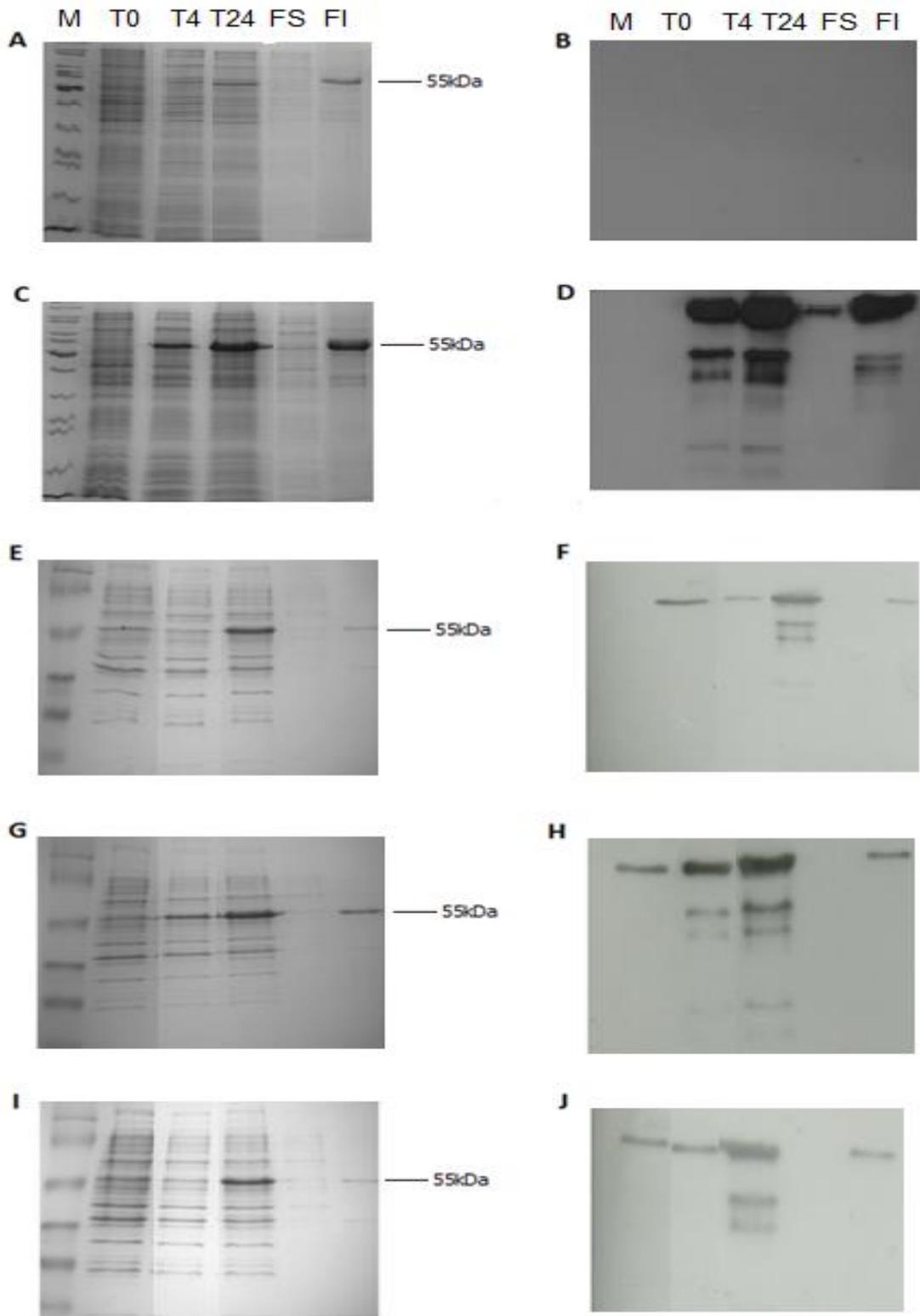


Figura 11. Tentativas de otimização da expressão da proteína NS3H pela linhagem BLNS3H. A) SDS-PAGE das frações T0, T4, T24, FS e FI na linhagem BL21 DE3 RIL crescida a 0 rpm, 37 °C. B) *Western blot* correspondente ao painel A. C) SDS-page das frações T0, T4, T24, FS e FI na linhagem BL21 DE3 RIL crescida a 200 rpm, 18 °C. D) *Western blot* correspondente ao painel C. E) SDS-page das frações T0, T4, T24, FS e FI da linhagem BLNS3H crescida a 0 rpm, 18 °C. F) *Western blot* correspondente ao painel E. G) SDS-page das frações T0, T4, T24, FS e FI na linhagem BL21 DE3 RIL crescida a 0 rpm, 4 °C. H) *Western blot* correspondente ao painel G. I) SDS-page das frações T0,

T4, T24, FS e FI na linhagem BL21 DE3 RIL crescida a 200 rpm, 4 °C. J) *Western blot* correspondente ao painel I. T0: extrato não induzido; T24: extrato após 24 horas de indução; FS: fração solúvel; FI: fração insolúvel.

Conforme mencionado, na condição de 24 horas de indução a 200 rpm e 18 °C, foi possível identificar a proteína na fração solúvel pelo *Western blot* (figura 11 D). Essa condição foi escolhida para os experimentos seguintes.

Após a obtenção da NS3H no extrato solúvel bacteriano, o material foi injetado no cromatógrafo AKTA FLPC. Para purificação da proteína NS3H recombinante. Foi utilizada a cromatografia de afinidade ao níquel e o cromatograma resultante está apresentado na figura 12 A. Foi possível observar a ocorrência de dois picos, um correspondente às frações impuras, compostas por proteínas do extrato celular com baixa afinidade ao níquel, e outro correspondentes às frações da NS3H purificada com maior afinidade ao níquel.

A purificação da NS3H foi obtida a partir eluições feitas com 450 mM de Imidazol. Posteriormente, foi inferido o grau de pureza da proteína por meio de análise em gel de poliacrilamida a 15 %, a partir do qual foi possível verificar que a NS3H purificada possui em tamanho aproximado de 55 kDa, como já esperado. As amostras eluídas com diferentes concentrações de Imidazol correspondente aos números do cromatograma foram analisadas em SDS-PAGE como indicado nas figuras 12 B e 12 C.

A proteína resultante foi dialisada com solução salina, mas sua estabilidade foi perdida em sua totalidade. Decidimos, então, realizar a diálise para tampão A2 [Tris 100 mM, NaCl 500mM, 20 % glicerol, pH 7,2] conseguimos obter a proteína na forma solúvel. A NS3H foi obtida na concentração de 0,4 mg/ml e rendimento correspondente a 80 mg/L de cultura bacteriana.

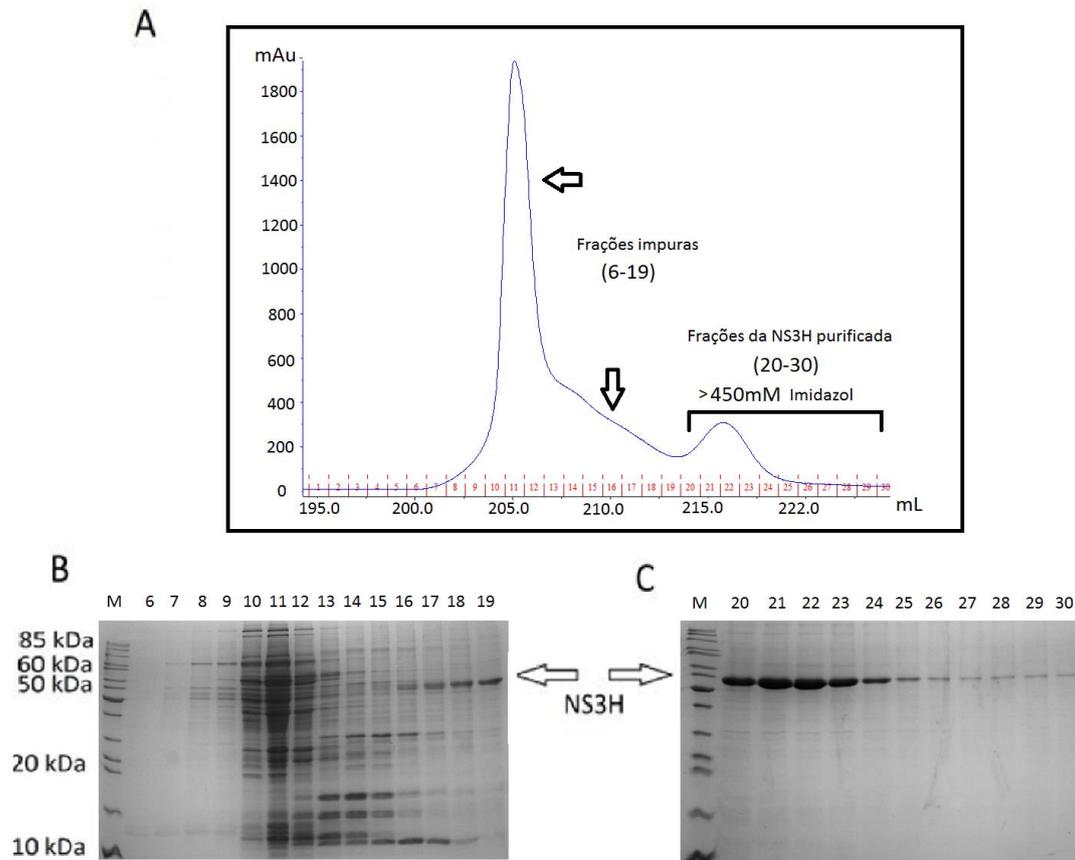


Figura 12. Purificação da proteína NS3H produzida em *E. coli*. A. Cromatograma no AKTA FLPC correspondente à purificação da NS3H. Em destaque as frações nas quais a proteína purificada foi obtida. B e C. Análise das frações da purificação da NS3H correspondentes às encontradas no cromatograma.

### 3.3 Produção de anticorpos anti-NS3H

Padronizadas as condições de obtenção NS3H, foram realizadas imunizações em camundongos Balb/C a fim de que anticorpos anti-NS3H específicos fossem gerados e pudessem ser utilizados nos ensaios subsequentes. O regime de imunizações (figura 13 A) foi composto de três doses com 10  $\mu$ g de proteína/dose combinadas ao adjuvante de Freund. Foram realizados ensaios para a demonstração dos níveis de anticorpos do tipo IgG obtidos nos animais imunizados (figura 13 B) e alguns parâmetros fisiológicos também foram monitorados: contagem total de leucócitos e níveis circulantes da enzima desidrogenase láctica (figura 13 C).

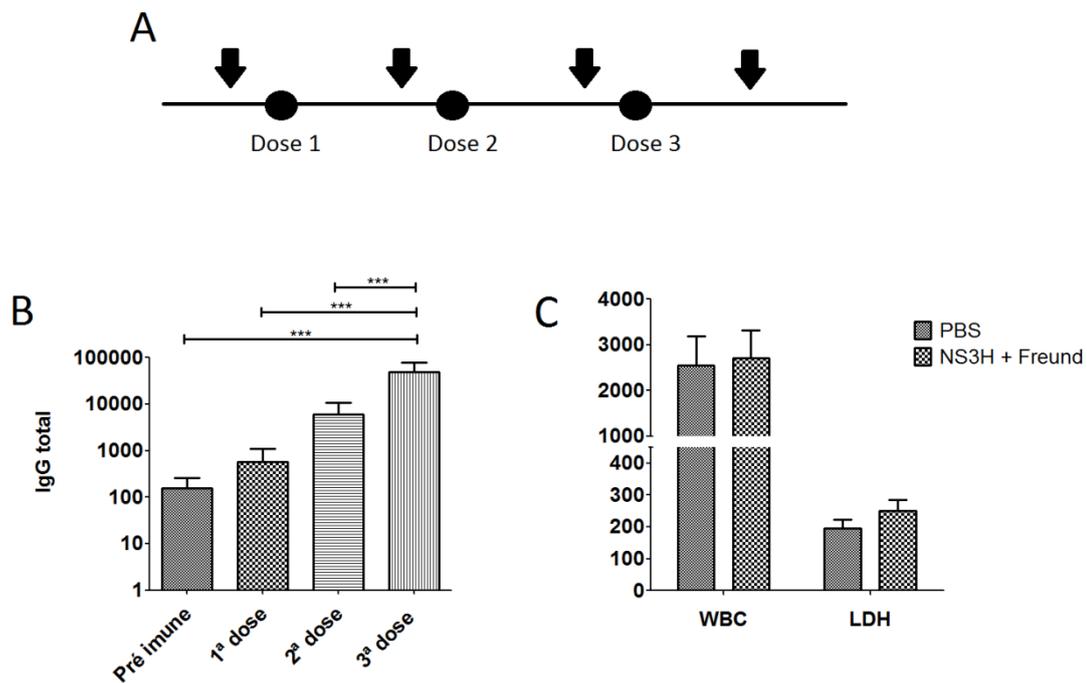


Figura 13. Produção de anticorpos anti-NS3H em camundongos. A. Protocolo de imunização utilizando a NS3H recombinante coadministrada com o adjuvante de Freund para gerar anticorpos específicos. Os animais foram imunizados por via intramuscular com a proteína coadministrada com o adjuvante completo de Freund na primeira dose e ao adjuvante incompleto de Freund nas doses seguintes. As inoculações foram feitas com intervalos de 15 dias e as coletas de soro (setas) foram realizadas nos dias 0, 14, 28, 35 e 42. B. Respostas de IgG sérica anti-NS3H detectadas em camundongos imunizados. C. Avaliação dos parâmetros de monitoramento da vacina em camundongos imunizados. WBC: contagem de leucócitos totais. LDH: Dosagem da enzima desidrogenase láctica.

### 3.4 Provas de antigenicidade da NS3H

Os anticorpos anti-NS3H foram utilizados para o reconhecimento da proteína nativa em células infectadas. Foram realizados ensaios de imunofluorescência (figura 14 A e 14 B), *western blot* (figura 14 C) e citometria (figura 14 D). Em todos os ensaios, foi possível observar que o soro produzido por animais imunizados com a proteína recombinante foram capazes de reconhecer a proteína nativa. Posteriormente, foram realizados ensaios de ELISA para a avaliação da reatividade da proteína recombinante NS3H frente a amostras de soro de animais infectados com a linhagem JHA1 de DENV2 (figura 14 E) e de humanos infectados por DENV2 (figura 14 F). Em relação ao soro de camundongos desafiados com o JHA1 a febre diminuiu em seis vezes a reatividade da proteína. Já em relação ao soro de paciente

diagnosticado com dengue, houve uma redução quase total na reatividade com a proteína recombinante após a desnaturação.

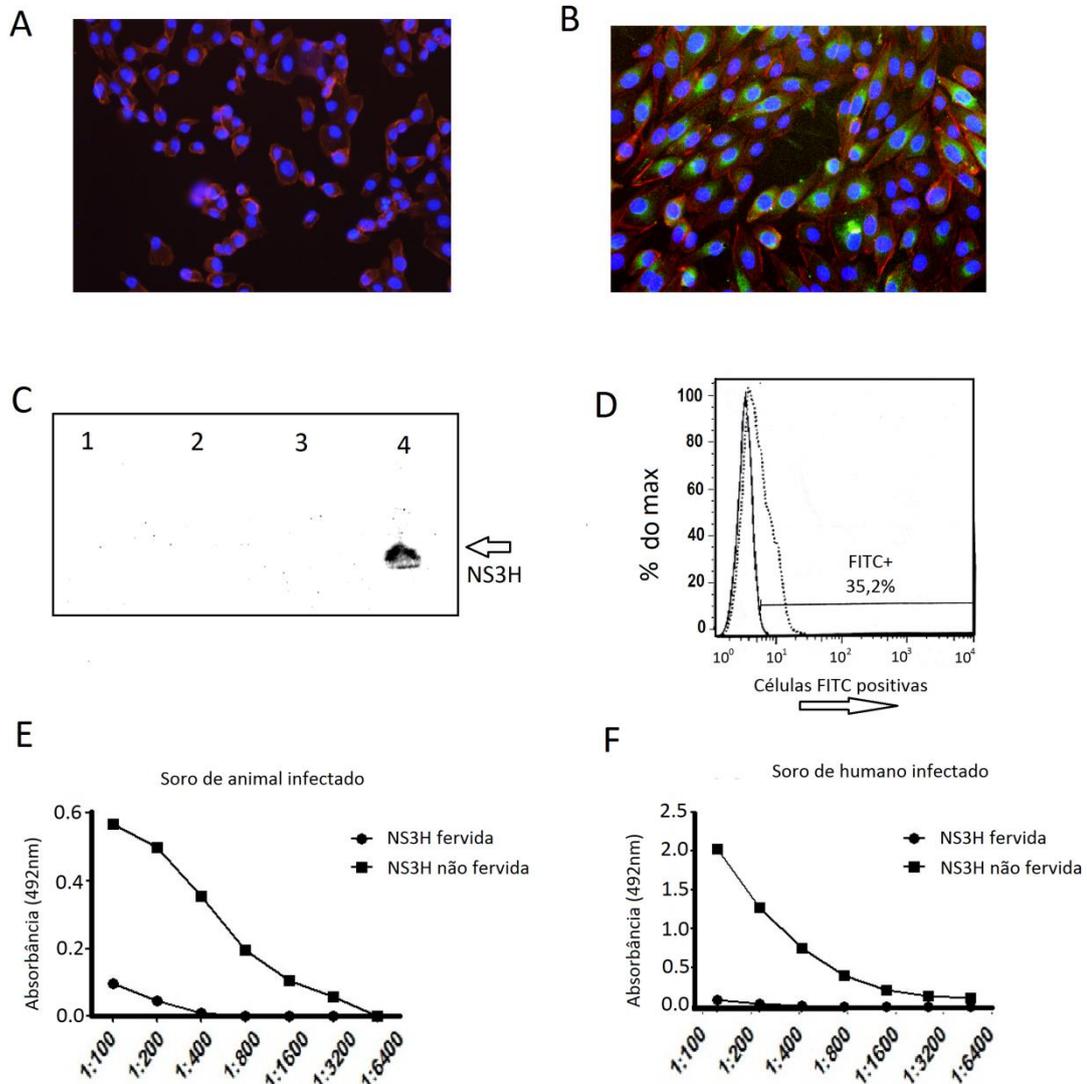


Figura 14. Reconhecimento da NS3H por anticorpos de camundongos e humanos infectados com DENV2. A-D. A NS3H nativa foi reconhecida por anticorpos produzidos por camundongos imunizados com a NS3H recombinante. Células LLCMK2 infectadas com o JHA1 foram incubadas com anticorpos anti-NS3H recombinante. Células não infectadas (A) e infectadas (B) foram fixadas, permeabilizadas, incubadas com soros de camundongos imunizados e submetidas à microscopia de imunofluorescência. O citoesqueleto das células está representado em vermelho, os núcleos de células em azul e a NS3H viral foi detectada com uma fluorescência na cor verde. As frações dos extratos das células foram também analisadas por *western blot*. C. Amostras: fração solúvel de células não infectadas (1), fração insolúvel de células não infectadas (2), fração solúvel de células infectadas (3) e fração insolúvel das células infectadas (4). Todas as amostras foram incubadas com soros produzidos por camundongos imunizados com a NS3H recombinante. D. Células infectadas (histograma linha pontilhada) e não infectadas (histograma na cor cinza) foram fixadas, permeabilizadas e tratadas com soros de animais imunizados. Subsequentemente, as células foram tratadas com anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com FITC e submetido à citometria de fluxo. E. Reatividade da proteína frente ao soro de camundongos desafiados com a linhagem JHA1 do DENV2. F. Reatividade da proteína frente ao soro de paciente infectado com DENV2.

### 3.5 Interação da NS3H recombinante com o RNA viral

Para os ensaios de avaliação da interação da NS3H recombinante com o RNA viral, a proteína foi purificada nas mesmas condições já descritas no item 4.2., exceto pela alteração na concentração de NaCl dos tampões, que passou de 500 mM para 80 mM. A proteína se manteve estável após essa alteração.

Experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados para analisar o arranjo e a estabilidade da NS3H recombinante produzida em extrato solúvel de *E. coli* induzida por IPTG (figuras 15 A e 15 B) e sua interação com o RNA (figura 15 C). O perfil transversal da NS3H apresenta características de uma proteína alfa – beta (figura 15 A). A proteína também revelou ter estabilidade térmica com uma temperatura de desdobraimento de 49 °C (figura 15 B). Além disso, a proteína incubada com o RNA viral apresentou um perfil similar ao observado com o RNA (figura 15 C).

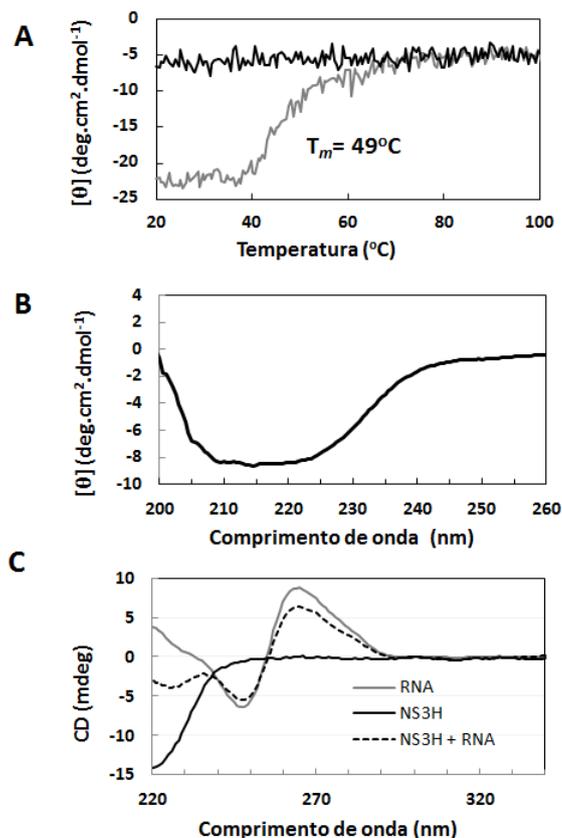


Figura 15. Arranjo, estabilidade e interação da NS3H com o RNA viral. (A) O espectro de dicroísmo circular de NS3H evidenciando a estrutura geral de alfa hélice. Os espectros foram registados utilizando 277 ng / mL de proteína em tampão (0,1 M de Tris, 80 mM de NaCl, 20% glicerol, pH 7,2)

diluído na proporção de 1:1 em água. (B) Desnaturação do NS3H recombinante dependente da temperatura. A  $T_m$  representa o ponto médio da curva de desdobraimento. Linha cinza: aumento gradual da temperatura de 20 °C para 100 °C. Linha preta: redução gradual na temperatura de 100 °C para 20 °C. (C) Perfis no ensaio de CD da NS3H (linha preta), do RNA (linha cinza) e do RNA incubado com NS3H (linha tracejada preta). O gráfico mostra a redução da intensidade do sinal do RNA de CD a 263 nm após incubação com a proteína.

Reações de PCR em tempo real foram realizadas de modo a avaliar indiretamente a influência da atividade helicase da NS3H na produção de cópias de cDNA. As concentrações de 0,1 µg, 0,5 µg e 1 µg da proteína recombinante foram adicionadas a três reações diferentes e a eficácia de cada uma foi comparada com o controle negativo e com a reação padrão do kit comercial utilizado (figura 16). Em comparação com a reação padrão, a adição de 0,5 µg e 1 µg de proteína NS3H recombinante levaram a um aumento de três vezes no número de cópias de cDNA produzidas a partir da mesma quantidade de RNA viral. Os resultados indicam, portanto, que a proteína preserva sua função de relaxamento de moléculas de RNA em semelhança à proteína nativa.

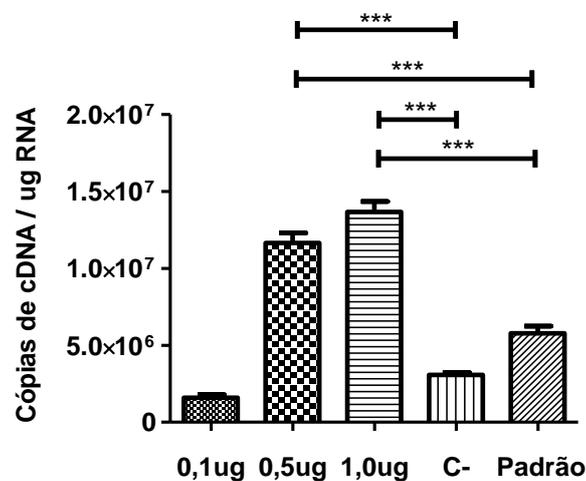


Figura 16. Avaliação da atividade helicase para RNA com a proteína NS3H recombinante. Reações de síntese de cDNA tem rendimento aumentado pela adição da NS3H recombinante. A proteína NS3H recombinante melhora a eficiência de um kit comercial de síntese de cDNA. Tanto as reações que receberam 0,5 µg quanto as que receberam 1 µg da NS3H proteína recombinante apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação à reação padrão do kit utilizado. Os resultados foram baseados em dois experimentos independentes.  $p < 0,05$ .

### 3.6 Avaliação da imunogenicidade da NS3H recombinante

Após a avaliação das propriedades da NS3H recombinante, foram realizadas imunizações baseadas na proteína coadministrada a adjuvantes a fim de observar sua imunogenicidade e eficácia protetora em condições experimentais. Camundongos Balb/C foram imunizados com a NS3H recombinante coadministrada ou não com um de três adjuvantes testados: hidróxido de alumínio, LTK63 e CpG. Análises por ELISA e ICS foram conduzidas a fim de determinarmos as respostas humorais e celulares. Analisamos os títulos de IgG anti-NS3H nos camundongos antes e após as três doses da imunização. Foi possível notar que todos os animais vacinados desenvolveram uma resposta humoral, refletida pelos níveis de anticorpos em relação ao grupo que recebeu apenas PBS. Pode-se considerar que o grupo que induziu uma melhor produção de IgG total foi o imunizado com NS3H coadministrada com a LTK63, o qual apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais grupos (figura 17 A).

Além disso, avaliamos as respostas de subclasses de IgG induzidas nos animais imunizados. Os grupos que receberam a NS3H recombinante sozinha ou coadministrada com o Alum apresentaram a mesma razão IgG1/IgG2a que o grupo PBS (0,32) e, portanto, um perfil de modulação imunológica do tipo 2. Os animais que receberam a NS3H recombinante coadministrada com LTK63 ou com CpG apresentaram uma razão IgG1/IgG2a ainda menor (0,14 e 0,12, respectivamente), o que indica uma modulação para o perfil Th1 mais pronunciado (figura 17 B).

Por se tratar de uma proteína não estrutural, a resposta imunológica mais importante para uma eventual imunidade protetora envolveria a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> antígeno-específicos. A figura 17 C mostra que nenhum dos adjuvantes empregados foi capaz de aumentar significativamente o número total de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , em relação ao grupo imunizado com a proteína recombinante sem a adição de adjuvantes, após incubação com o peptídeo GYISTRVEM específico para camundongos Balb/C.

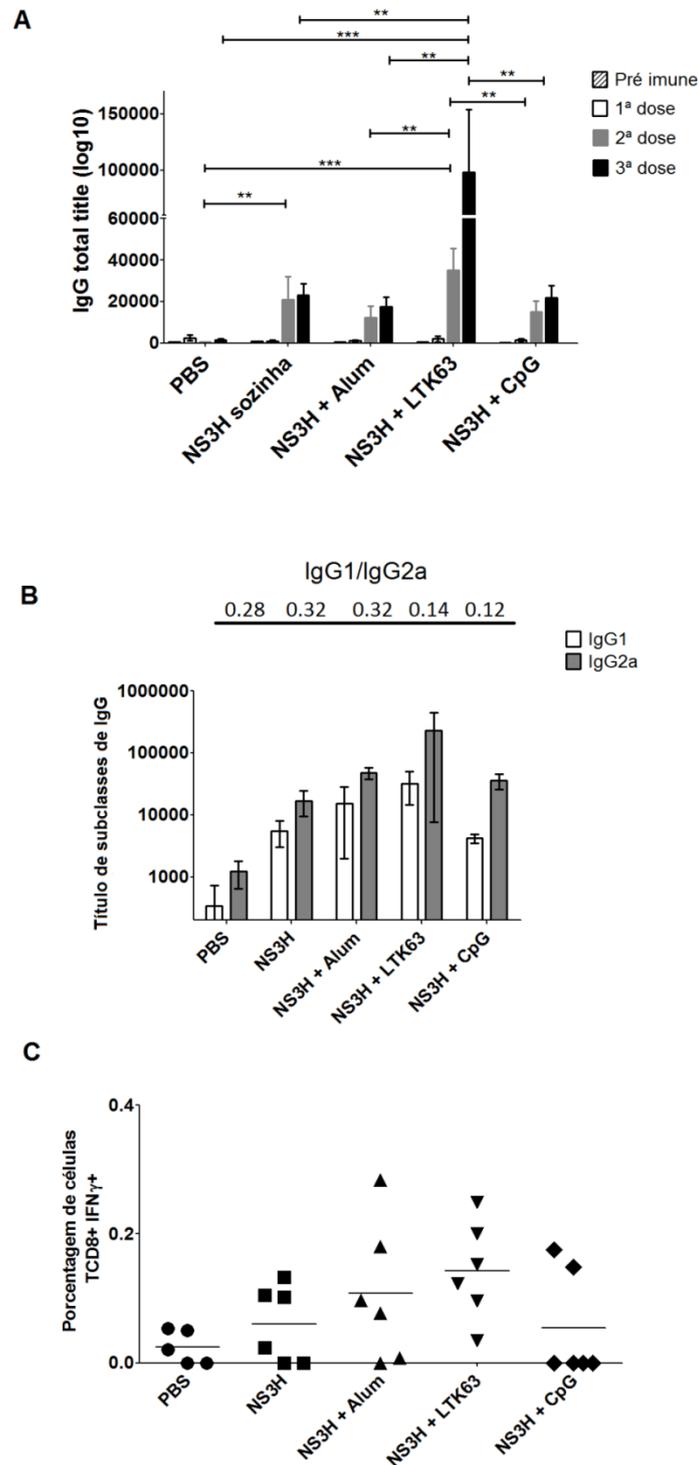


Figura 17. Avaliação da imunogenicidade da proteína NS3H recombinante em camundongos imunizados. Camundongos foram imunizados com a NS3H recombinante coadministrada ou não com os adjuvantes hidróxido de alumínio, LTK63 ou CpG. O grupo controle (PBS) recebeu apenas PBS. A. ELISA ilustrando o título total de IgG anti-NS3H. A resposta de anticorpos foi avaliada antes e no decorrer da administração de cada uma das três doses. B. As subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) foram avaliadas após a terceira dose da imunização. Esses são resultados de dois experimentos independentes. As barras representam o erro padrão da média. Acima das barras estão indicadas as

razões IgG1/IgG2a. C. Ensaio de detecção intracelular da produção de IFN- $\gamma$  (ICS) ilustrando o número total de células TCD8+ produtoras de IFN- $\gamma$  em relação ao número total de células TCD8+ determinado após estímulo com o peptídeo GYISTRVEM.

Os animais imunizados com a proteína NS3H foram desafiados com a cepa JHA1 de DENV2, previamente demonstrada pelo nosso grupo como sendo capaz de matar animais imunocompetentes após desafio intracraniano (AMORIM et al. 2012a). Foi avaliada a sobrevivência dos animais após o desafio (figura 18) e não foi observada proteção nos animais imunizados.

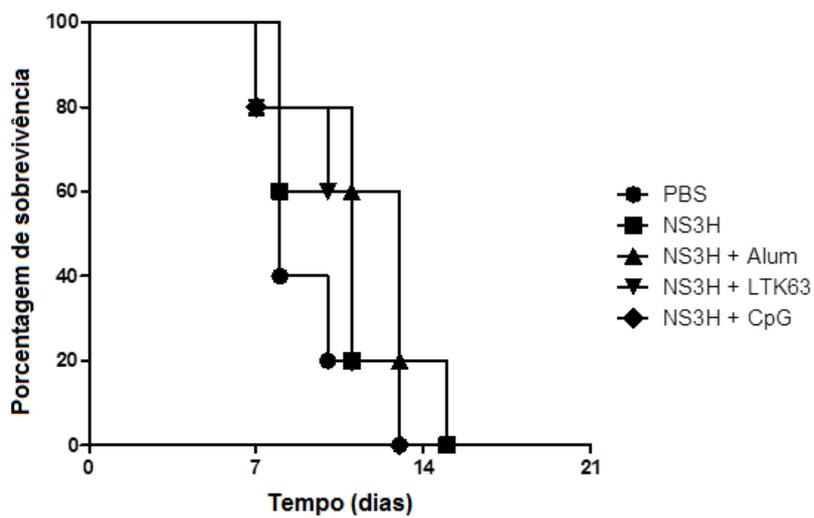


Figura 18. Proteção induzida pela imunização com a proteína NS3H frente a desafio com a linhagem JHA1 de DENV2. Camundongos foram imunizados com a NS3H recombinante coadministrada ou não com os adjuvantes hidróxido de alumínio, LTK63 ou CpG. O grupo controle recebeu apenas PBS.

## 4 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, obtivemos uma forma recombinante da helicase do DENV (NS3H) que preserva importantes propriedades da proteína nativa. A proteína foi obtida em sistema de expressão procarioto e purificada em uma forma solúvel. Análises estruturais e funcionais mostraram que a NS3H recombinante purificada foi capaz de interagir com o RNA de uma linhagem de DENV2 e promover aumento da eficiência de reações de PCR em tempo real utilizando o RNA viral como modelo. Ademais, a NS3H recombinante retêm importantes epítomos da proteína nativa e foi eficientemente reconhecida por soros DENV-específicos. Formulações vacinais baseadas na proteína recombinante se mostraram imunogênicas, o que sugere que a aplicação da NS3H recombinante como antígeno vacinal pode ser promissora. A disponibilidade de uma forma recombinante da proteína NS3H do DENV2 representa, portanto, uma contribuição relevante para futuros estudos sobre a biologia do vírus assim como a busca de novos anti-virais e vacinas contra a dengue.

Durante as primeiras etapas de execução do trabalho, extraímos o RNA viral, produzimos cDNA a partir dele e partimos para os testes de transformação e expressão em linhagens bacterianas de *E. coli*. As linhagens de *E. coli* constituem sistemas de expressão versáteis devido a diversos fatores como rápida multiplicação celular, alta velocidade de produção de proteínas e extenso conhecimento da sua fisiologia (SWARTZ, 2001). Obtivemos uma cepa BL21 (DE3) RIL que alberga um vetor pET28a com a sequência codificadora da NS3H. Essa cepa foi chamada BLNS3H e, por ser capaz de superexpressar a proteína nas condições testadas, foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

A linhagem BL21 (DE3) RIL contém tRNAs adicionais que permitem o reconhecimento de AGA/AGG (aminoácido arginina), AUA (aminoácido isoleucina) e CUA (aminoácido leucina) (ROSANO; CECCARELLI, 2009), os quais favorecem a expressão de proteínas de células eucariotas, particularmente, de mamíferos. O sistema pET de expressão apresenta em sua estrutura o promotor T7, o qual possui forte interação com a RNA polimerase. Essa enzima se acopla ao sistema com grande afinidade, o que induz um aumento na expressão do gene de interesse (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014). Apesar da combinação da cepa com o vetor de

expressão adequado favorecer a superexpressão de proteínas em sistema procarioto, nesse trabalho a proteína foi inicialmente obtida no extrato bacteriano insolúvel, internalizada em corpúsculos de inclusão e diversas tentativas de solubilizá-la se mostraram insatisfatórias.

Uma das grandes dificuldades da expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* é a propensão de proteínas recombinantes formarem corpúsculos de inclusão insolúveis e a incapacidade da bactéria em realizar modificações pós-traducionais que podem influenciar na função biológica, estabilidade e conformação proteica (BIRD et al., 2004). Portanto, embora amplamente difundida graças ao seu baixo custo e facilidade de execução, a expressão de proteínas recombinantes em bactérias tem como um dos efeitos secundários mais comuns a formação de corpúsculos de inclusão (LIOVIC et al., 2012). A formação dos corpúsculos de inclusão depende de diversos fatores, dentre os quais estão a alta concentração local da proteína sintetizada, a ausência de modificações pós-traducionais necessárias para a obtenção da solubilidade de certas proteínas eucarióticas e a inibição da formação de pontes dissulfeto nativas no ambiente intracelular bacteriano (UPADHYAY et al., 2012).

Algumas estratégias de menor custo para otimizar a expressão de proteínas recombinantes na sua forma solúvel consistem em alterações nas condições do cultivo bacteriano e indução da expressão da proteína recombinante. Dois fatores são particularmente relevantes na melhora da qualidade da proteína recombinante expressa: a aeração e a temperatura de cultivo. Sabe-se que a concentração de oxigênio, a qual é influenciada pela velocidade de agitação e temperatura do meio de cultivo, pode ser um fator limitante na velocidade de crescimento do microrganismo. No cultivo de *E. coli* em condições anaeróbicas ou quando a concentração de oxigênio oscila, há, por exemplo, uma redução na produção de proteínas recombinantes. Além disso, para a célula reduzir seu gasto de energia, pode haver degradação do RNA e subsequente cancelamento da tradução de proteínas que não são úteis no crescimento celular. Existe também uma relação inversamente proporcional da concentração de oxigênio do meio e da formação de acetato. O acúmulo de acetato reduz o gradiente eletroquímico em torno da membrana bacteriana, o qual é necessário para a síntese de ATP (TOMAZETTO et

al., 2007). Conseqüentemente, observa-se inibição do crescimento celular e produção de proteína recombinante.

A temperatura também é uma importante variável que pode ser utilizada no controle do metabolismo celular. Quando a temperatura do meio de cultivo bacteriano é reduzida para 25°C ou menos, uma redução na captação de nutrientes e na velocidade de multiplicação pode ocorrer. No entanto, essa mesma redução na temperatura promove a redução na formação de subprodutos tóxicos, muitas vezes incrementando a quantidade e a qualidade da proteína recombinante produzida (BIRD, 2004). A redução na temperatura de cultivo provoca uma desaceleração no crescimento bacteriano, o que tende a diminuir a velocidade de síntese proteica. A concentração da proteína produzida, então, aumenta mais devagar e é menor a probabilidade de choque entre moléculas que ainda estão em fase de estabilização (MATAGNE et al., 2000). Com isso, a proteína alvo tem mais tempo para alcançar o estado de menor energia livre e adquirir a estrutura correta, e parte da quantidade produzida pode se deslocar para o extrato bacteriano solúvel (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008).

No nosso trabalho, alterações tanto na aeração quanto na temperatura do cultivo bacteriano levaram à produção da proteína NS3H no extrato bacteriano solúvel. Um protocolo de otimização da produção da proteína NS3H foi estabelecido no presente estudo a partir de testes de vários parâmetros incluindo, a linhagem bacteriana empregada, o tempo de indução, temperatura e aeração da cultura. Uma redução na temperatura de cultivo de 37 °C para 18 °C foi capaz de otimizar a produção da proteína NS3H recombinante a partir linhagem de *E. coli* BL RIL após 24 horas de cultivo. Ao final do processo, o rendimento final obtido foi de 80 mg de NS3H por litro de cultura bacteriana. Dois trabalhos que purificaram a NS3H de uma cepa de DENV2 (XU et. al., 2005) e de uma cepa de DENV4 (LUO et al., 2007) cultivaram as linhagens de *E. coli* recombinantes a 37 °C, mas não mencionam detalhes sobre a solubilidade da proteína recombinante. Em outro trabalho, Alvarez-Rodrigues e colaboradores (2012), relatam a purificação da proteína NS3 na fração insolúvel do extrato bacteriano após cultivo a 37 °C.

Após a obtenção da proteína solúvel, foram realizados ensaios de antigenicidade, funcionalidade e imunogenicidade. Anticorpos gerados em camundongos imunizados com a NS3H recombinante purificada combinada ao

adjuvante de Freund foram capazes de reconhecer a proteína NS3H nativa em células infectadas com um isolado clínico de DENV2, o que foi demonstrado por meio de ensaios de citometria, *western blot* e imunofluorescência. A proteína desnaturada apresentou reatividade seis vezes menor do que a intacta em relação ao reconhecimento por anticorpos presentes em amostras de soro de camundongos desafiados com a linhagem JHA1 de DENV2 e vinte vezes menor em relação a uma amostra de soro colhida de indivíduo infectado com DENV2. Esses resultados sugerem que a produção de anticorpos numa resposta humoral contra a NS3H é mediada preferencialmente por epítomos conformacionais e não lineares.

A conformação e a estabilidade da NS3H recombinante produzida em *E. coli* foram analisadas em experimentos de dicroísmo circular. O perfil transversal da NS3 apresenta claras características de uma proteína com domínios com conformação alfa-hélice e folhas beta-pregueadas, com sinais ligeiramente atenuados em 208 nm e 222 nm, devido à presença de folhas beta. A previsão do conteúdo secundário desta proteína foi de 35 % e 21 % de alfa hélices e folha beta, respectivamente, o que está em conformidade com a estrutura tridimensional da helicase do DENV publicada por Xu e colaboradores (2005) que mostra 30 % de hélices alfa e 17 % de folhas beta. A proteína também revelou ter estabilidade térmica com uma temperatura de desdobramento de 49 °C, quando as amostras foram preparadas nas mesmas condições utilizadas para as experiências de infecção. Além disso, a comparação dos espectros obtidos com a proteína na presença de RNA demonstra uma redução na intensidade do sinal do RNA, um indicativo de uma diminuição de empilhamento de bases do RNA, fenômeno característico de interação entre proteína e ácido nucleico (MARTINO et al., 2012; TAO; FRANKEL, 1992). Desta forma, demonstra-se que a forma recombinante da NS3H é capaz de interagir com RNA e, portanto, preserva uma função biológica da proteína nativa.

O uso de um adjuvante é requerido em formulações vacinais baseadas em proteínas purificadas. Neste contexto, as toxinas LTs de *E. coli* apresentam importante efeito adjuvante tanto em relação à resposta imune humoral quanto a ativação de linfócitos T frente a antígenos administrados por vias parenteral ou de mucosa (RODRIGUES et al., 2010). Uma mutação pontual na subunidade A da toxina origina a LTK63, um mutante atóxico que possui características adjuvantes já comprovadas (RAPPUOLI et al., 1999; RYAN et al. 2000), e, por isso, foi utilizado

em nossos experimentos. Um adjuvante comercial utilizado nesse trabalho foi o hidróxido de alumínio como um controle das formulações vacinais, já que é amplamente utilizado em pesquisas com diferentes vacinas (RESENDE et al., 2004). Além destes, também foram utilizados como adjuvantes os oligonucleotídeos ricos em citosina (C) e guanina (G) (CpG), que são pequenas moléculas de DNA sintéticas que se ligam a receptores de imunidade inata (TLR9) e podem aumentar a produção de citocinas e respostas celulares mediadas por linfócitos T (WEINER et al., 1997).

A administração da proteína NS3H recombinante em camundongos mostrou ser capaz de induzir respostas humorais em camundongos, o que indica que a proteína apresenta propriedades imunogênicas. No entanto, o efeito adjuvante para as respostas mediadas por linfócitos T CD8<sup>+</sup> NS3H-específicos foi discreto. Além disto, não foi possível medir qualquer proteção conferida pelas imunizações a camundongos desafiados com a linhagem JHA1 de DENV2. Esses resultados contrastam com estudos anteriores que descreveram resultados mais promissores quanto à capacidade de ativar respostas celulares em camundongos imunizados com a NS3H (COSTA et al., 2011; LURIA-PEREZ et al., 2007; SPAULDING et al., 1999).

Em 1999, Spaulding e colaboradores analisaram a especificidade da resposta citotóxica a um epítipo imunodominante, específico para células T CD8<sup>+</sup>, presente na sequência codificadora da proteína NS3 do vírus dengue. Um epítipo presente na região helicase da NS3 (NS3H), situado pelos resíduos 298-306 da proteína e composto pela sequência de aminoácidos GYISTRVEM foi utilizado. Todos os clones de linfócitos citotóxicos identificados reconheceram sequências homólogas da NS3 de um ou mais flavivírus relacionados. Luria-Perez e colaboradores em 2007 descreveram que um peptídeo, previamente definido por Spaulding e colaboradores, expresso na superfície de *S. enterica* resulta em respostas de CTL ao epítipo da proteína NS3 (1999). De fato, os resultados desses estudos nos levaram à escolha do epítipo empregado no monitoramento de respostas citotóxicas específicas, o qual se mostra conservado entre sequências de NS3 de todos os sorotipos virais. No entanto, em nossos ensaios, não foi possível observar a indução significativa de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos. Os resultados nos levam a concluir que as

formulações vacinais testadas não foram capazes de induzir respostas celulares específicas nos animais imunizados.

A utilização da NS3H como antígeno vacinal em vacinas de DNA apresentou resultados promissores, onde os níveis de morbidade e mortalidade dos animais desafiados foram significativamente reduzidos nos também imunizados com o plasmídeo codificador da NS3H. Em 2011, Costa e colaboradores avaliaram os níveis de morbidade e mortalidade dos animais desafiados com uma linhagem de DENV2 previamente imunizados com plasmídeos codificadores da NS3 inteira e suas porções. Animais imunizados com um plasmídeo codificador da NS3 tiveram redução significativa na morbidade e mortalidade e foram capazes de montar respostas imunológicas celulares medidas pela produção de INF- $\gamma$ . No nosso trabalho, essa ativação de resposta imune não foi observada e, conseqüentemente, não observamos qualquer proteção no ensaio de desafio. Uma possível explicação pode ser a diferença nas vacinas testadas. Nossas formulações são baseadas em proteínas recombinantes, que precisam de outros fatores, como adjuvantes adequados, para desencadear respostas imunológicas. Embora os adjuvantes empregados tenham registro prévio de indução de respostas celulares específicas quando coadministrados a antígenos proteicos, tais resultados não se reproduziram nas condições de estudo empregadas.

Apesar de não ter havido proteção, a NS3H gerada nesse trabalho é um reagente com bom potencial que não pode ser descartado, sendo necessários estudos mais aprofundados em relação à sua utilização em formulações vacinais. O modelo experimental de desafio utilizado nesse trabalho, infecta camundongos pela via intracraniana (AMORIM et al., 2012a). Apesar de reproduzir nos animais muitos dos efeitos observados em humanos infectados, afasta-se da infecção natural quanto à via de inoculação (intracraniana). A utilização de um modelo experimental de desafio que reproduza a infecção por DENV em humanos pode ser uma alternativa para se avaliar a real capacidade antigênica da NS3H.

Os adjuvantes testados não foram capazes de induzir respostas celulares envolvendo ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Mudanças nas concentrações dos adjuvantes em questão ou mesmo combinações de adjuvantes podem ser alternativas para que se possa induzir uma ativação efetiva de respostas imunológicas celulares nos animais imunizados e conseqüente sobrevivência dos

animais testados. A combinação da NS3H com outros adjuvantes deve ser uma alternativa a ser explorada. Adjuvantes com capacidade de intensificar a resposta imune celular, como o Poly IC (HENRIQUES et al., 2013; JIN et al., 2007) podem ser alternativas promissoras, já que, sendo a NS3H uma proteína não estrutural e não circulante, respostas imunológicas celulares seriam as mais adequadas para o controle da replicação viral.

Outra perspectiva de utilização da NS3H recombinante produzida nesse trabalho é a construção modelos de plataformas para estudo e avaliação de drogas anti-dengue, já que tem importante papel na replicação viral. Uma droga capaz de inibir as atividades enzimáticas, em particular sua função helicase, podem impactar a replicação viral. Teoricamente, os inibidores de helicase virais podem ser utilizados para o controle de qualquer aspecto da replicação do genoma viral ou de sua expressão, e esforços atuais tem se voltado para drogas que impeçam a replicação de patógenos infecciosos (FRICK; LAM, 2006). A helicase viral mais amplamente estudada é codificada pelo vírus da hepatite C (HCV), o qual é a única espécie do gênero Hepacivirus que faz parte da família *Flaviviridae*, mesma do vírus dengue. Muitos fármacos fluorescentes de ligação ao material genético, tais como antraciclinas, acridonas, tropolonas e amidinoantraciclinas, foram otimizados como inibidores da helicase de HCV (SHADRICK et al., 2013). A disponibilidade de uma forma recombinante da proteína NS3H e a descrição de um ensaio laboratorial simples e rápido que permitem monitorar sua função biológica representam, neste contexto, uma alternativa útil para a descoberta de novas drogas capazes de inibir a replicação do DENV.

## 5 CONCLUSÕES

Os objetivos previstos para o desenvolvimento da presente dissertação foram alcançados em sua totalidade e foi possível obter as seguintes conclusões:

1. O gene codificador da proteína NS3H pode ser clonado sistema bacteriano, utilizando cepas quimiocompetentes de *E. coli*;
2. A produção da proteína recombinante na forma solúvel pode ser realizada a partir de mudanças nas condições de aeração e temperatura do cultivo bacteriano;
3. A NS3H recombinante preserva propriedades estruturais da proteína nativa;
4. A proteína NS3H preserva determinantes antigênicos da proteína nativa como demonstrado pela reatividade de anticorpos;
5. A NS3H recombinante interage com o RNA viral de forma semelhante ao observado com a proteína nativa;
6. A NS3H recombinante foi imunogênica quando administrada a camundongos em combinação com adjuvantes para a produção de anticorpos, mas não para a ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>.
7. Nas condições experimentais avaliadas, não foi possível observar proteção ao desafio com uma linhagem de DENV2 capaz de matar camundongos imunocompetentes.
8. Novas formulações vacinais deverão ser testadas com a incorporação de adjuvantes mais adequados à ativação de respostas celulares necessárias à proteção contra a infecção pelo DENV.

## REFERÊNCIAS\*

ABDELHALEEM, M. RNA helicases: Regulators of differentiation. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 499- 503, 2005.

AGILENT TECHNOLOGIES, Genomics: pET Expression Systems - Details & Specifications.

<[http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelId=472&\\_requestid=257425](http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelId=472&_requestid=257425)>.

Acessado em 22 de fevereiro de 2014.

ALVAREZ-RODRIGUEZ, A. M.; RAMOS-LIGONIO, A.; ROSALES-ENCINA, J. L.; MARTINEZ-CAZARES, M. T.; PARISSI-CRIVELLI, A.; LOPEZ-MONTEON, A. Expression, purification, and evaluation of diagnostic potential and immunogenicity of a recombinant NS3 protein from all serotypes of dengue virus. **Journal of Tropical Medicine**, doi:10.1155/2012/956875, 2012.

AMORIM, J. H.; ALVES, A. M. B.; FERREIRA, L. C. S. As vacinas contra a dengue: perspectivas e desafios. **Microbiologia in foco**, v. 10, p. 4-9, 2009.

AMORIM, J. H.; ALVES, R. P.; BOSCARDIN, S. B.; FERREIRA, L. C. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. **Virus Res.**, v. 6, p. 153-160, 2014.

AMORIM, J. H.; BIZERRA, R. S. P.; ALVES, R. P. S.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LEVI, J. E.; CAPURRO, M. L.; FERREIRA, L. C. S. A genetic and pathologic study of a DENV2 clinical isolate capable of inducing hemorrhage and encephalitis in immunocompetent mice. **PLoS One**, v. 7, v. 9, p. e44984, 2012a.

AMORIM, J.H.; DINIZ, M.O.; CARIRI, F.A.; RODRIGUES, J.F.; BIZERRA, R.S.; GONÇALVES, A.J.S.; ALVES, A.M.B.; FERREIRA, L.C.S. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. **Vaccine**, v. 5, p. 837-845, 2012b.

AMORIM, J. H.; PORCHIA, B. F. M. M.; BALAN, A.; CAVALCANTE, R. C. M.; COSTA, S. M.; ALVES, A. M. B.; FERREIRA, L. C. S. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **J. Virol. Methods**, v. 167, p. 186–192, 2010.

BERNARDO, L.; FLEITAS, O.; PAVON, A.; HERMIDA, L.; GUILLEN, G.; GUZMAN, M. G. Antibodies induced by dengue virus type 1 and 2 envelope domain III recombinant proteins in monkeys neutralize strains with different genotypes. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, p. 1829–1831, 2009.

BHATT, S; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G.R.W.; SIMMONS, C.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J.; HAY, S. I. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, doi:10.1038/nature12060, 2013.

BIRD, P. I.; PAK, S. C.; WORRALL, D. M.; BOTTOMLEY, S. P. Production of recombinant serpins in *Escherichia coli*. **Methods**, v. 32, p. 169–176, 2004.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 16, p. 279-293, 2007.

BRASIL. Instituto Oswaldo Cruz. Dengue – vírus e vetor. Disponível em <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/>>. Acessado em 12 de junho de 2014.

CHEN, M. C.; LIN, C. F.; LEI, H. Y.; LIN, S. C.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; ANDERSON, R.; LIN, Y. S. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. **J. Immunol.**, v. 183, p. 1797-1803, 2009.

COSTA, S. M.; YORIO, A. P.; GONÇALVES, A. J. S.; VIDALE, M. M.; COSTA, E. C. B.; MOHANA-BORGES, R.; MOTTA, M. A.; FREIRE, M. S.; ALVES, A. M. B. Induction of a Protective Response in Mice by the Dengue Virus NS3 Protein Using DNA Vaccines. **PLoS ONE**, v. 6, e 25685, 2011.

DIAS, L. B. A.; ALMEIDA, S. C. L.; HAES, T. M.; MOTA, L. M.; RORIZ-FILHO, J. S. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, p. 143-152, 2010.

FRICK, D. N.; LAM, A. M. I. Understanding Helicases as a Means of Virus Control. **Curr. Pharm. Des.**, v. 12, p. 1315–1338, 2006.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 100–103, 2002.

HALSTEAD, S. B.; UDOMSAKDI, S.; SIMASTHIEN, P.; SINGHARAJ, P.; SUKHAVACHANA, P.; NISALAK, A. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 42, p. 261-275, 1970.

HENCHAL, E. A.; HENCHAL, L. S.; SCHLESINGER, J. J. Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 2101-2107, 1988.

HENRIQUES, H. R.; RAMPAZO, E. V.; GONÇALVES, A. J.; VICENTIN, E. C.; AMORIM, J. H.; PANATIERI, R. H.; AMORIM, K. N.; YAMAMOTO, M. M.; FERREIRA, L. C.; ALVES, A. M.; BOSCARDIN, S. B. Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 18, e2330, 2013.

HERMIDA, L.; RODRIGUEZ, R.; LAZO, L.; SILVA, R.; ZULUETA, A.; CHINEA, G.; LÓPEZ, C.; GUZMÁN, M. G.; GUILLÉN, G. A dengue-2 envelope fragment inserted within the structure of the P64K meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. **J. Virol. Methods**, v. 115, p. 41–49, 2004.

HUBBELL, J. A.; THOMAS, S. N.; SWARTZ, M. A. Materials engineering for immunomodulation. **Nature**, v. 462, p. 449-460, 2009.

JIN, B.; WANG, R. Y.; QIU, Q.; SUGAUCHI, F.; GRANDINETTI, T.; ALTER, H. J.; SHIH, J. W-K. Induction of potent cellular immune response in mice by hepatitis C virus NS3 protein with double-stranded RNA. **Immunology**, v. 122, p. 15–27, 2007.

KUROSU, T.; CHAICHANA, P.; YAMATE, M.; ANANTAPREECHA, S.; IKUTA, K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 362, p. 1051–1056, 2007.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORNDAM, A. V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p.545-551, 1992.

LENG, C. H.; LIU, S. J.; TSAI, J. P.; LI, Y. S.; CHEN, M. Y.; LIU, H. H, LIEN, S. P.; YUEH, A.; HSIAO, K. N.; LAI, L. W.; LIU, F. C.; CHONG, P.; CHEN, H. W. A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. **Microbes Infect.**, v. 11, p. 288–295, 2009.

LESCAR, J.; LUO, D.; XU, T.; SAMPATH, A.; LIM, S. P.; CANARD, B.; VASUDEVAN, S. G. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: The case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. **Antiviral Research**, v. 80. p. 94–101, 2008.

LIN, C. F.; LEI, H. Y.; SHIAU, A. L.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, C. C.; CHIU, S. C.; LIN, Y. S. Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Via Production of Nitric Oxide. **J. Immunol.**, v. 169, p. 657-664, 2002.

LIN, C. F. ; WAN, S. W. ; CHENG, H. J. ; LEI H. Y. ; LIN, Y. S. Autoimmune Pathogenesis in Dengue Virus Infection. **Viral Immunol.**, v. 19, p. 127–132, 2006.

LIOVIC, M.; OZIR, M.; ZAVEC, A. B.; PETERNEL, S.; KOMEL, R.; ZUPANCIC, T. Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1-5, 2012.

LUO, D.; XU, T.; HUNKE, C.; GRÜBER, G.; SUBHASH G. VASUDEVAN, S. G.; LESCAR, J. Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. **Journal of Virology**, v. 82, n. 1, p. 173–183, 2007.

LURIA-PEREZ, R.; CEDILLO-BARRON, L.; SANTOS-ARGUMEDO, L.; ORTIZ-NAVARRETE, V.F.; OCAÑA-MONDRAGON, A.; GONZALEZ-BONILLA, C.R. A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. **Vaccine**, v. 25, p. 5071–5085, 2007.

MARINARO, M.; RICCOMI, A.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; FIORELLI, V.; TRIPICIANO, F.; CAFARO, A.; ENSOLI, B.; DE MAGISTRIS, M. T. Mucosal delivery of the human immunodeficiency virus-1 Tat protein in mice elicits systemic neutralizing antibodies, cytotoxic T lymphocytes and mucosal IgA. **Vaccine**, v. 21, p. 3972–3981, 2003.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, p. 564–581, 2009.

MARTINO, L.; PENNELL, S.; KELLY, G.; BUI, T. T. T.; KOTIK-KOGAN, O.; SMERDON, S. J.; DRAKE, A. F.; CURRY, S.; CONTE, M. R. Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human La protein. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p.1381–1394, 2012.

MATAGNE, A.; JAMIN, M.; CHUNG, E. W.; ROBINSON, C. V.; RADFORD, S. E.; DOBSON, C. M. Thermal Unfolding of an Intermediate is Associated with Non-Arrhenius Kinetics in the Folding of Hen Lysozyme. **J. Mol. Biol.**, v. 297, p. 193-210, 2000.

NUNES, M. V. O.; CÂMARA, C. P.; CRESPO, A. M. C.; CARVALHAES, M.; OLIVEIRA, C. R.; SILVEIRA, L. A. Comparação do perfil de anticorpos antiimunoglobulina G em murinos imunizados com IgG humana associada a diferentes adjuvantes. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 44-50, 2009.

PUTNAK, R.; FULLER, J.; VANDERZANDEN, L.; INNIS, B. L.; VAUGHN, D. W. Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, p. 469–476, 2003.

RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; DOUCE, G.; DOUGAN, G. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. **Immun. Tod.**, v. 20, p. 493-500, 1999.

RESENDE, F. C. B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S. I. A. C.; ZANETTI, C. R.; LIMA, H. C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 27, n.3, p.116-124, 2004.

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

RODRIGUES, J. F.; MATHIAS-SANTOS, C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; AMORIM, J. H.; CABRERA-CRESPO, J.; BALAN, A.; FERREIRA, L. C. S. Functional Diversity of Heat-labile Toxins (LT) Produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): Differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5222-5233, 2010.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. **Microb. Cell Fact.**, v. 8, n. 41, p. 1-9, 2009.

RYAN, E. J.; MCNEELA, E.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; O'NEILL, L.; MILLS, K. H. G. Modulation of innate and acquired immune responses by *Escherichia coli* heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. **J. Immun.**, v. 165, p. 5750-5759, 2000.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol. Cell Biochem.**, v. 307, p. 249-264, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**, v. 81, p. 6–15, 2009.

SCHLESINGER, J. J., BRANDRISS, M. W., WALSH, E. E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. **Journal of General Virology**, v. 68, p. 853–857, 1987.

SHADRICK, W. R.; NDJOMOU, J.; KOLLI, R.; MUKHERJEE, S.; HANSON, A. M.; FRICK, D. N. Discovering New Medicines Targeting Helicases: Challenges and Recent Progress. **J. Biomol. Screen**, v. 18, p.761-782, 2013.

SIMMONS, M.; NELSON, W. M.; WU, S. J.; HAYES, C. G. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 655–662, 1998.

SPAULDING, A. C.; KURANE, I.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. Analysis of Murine CD81 T-Cell Clones Specific for the Dengue Virus NS3 Protein: Flavivirus Cross-Reactivity and Influence of Infecting Serotype. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1. pp. 398–403, 1999.

SRIVASTAVA, A. K.; PUTNAK, J. R.; WARREN, R. L.; HOKE, C.H. Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. **Vaccine**, v. 13, p. 1251-1258, 1995.

SWARTZ, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. p. 195–201, 2001.

TAO, J.; FRANKEL, A. D. Specific binding of arginine to TAR RNA (RNA recognition / RNA structure / RNA - binding peptides / human immunodeficiency virus Tat protein), **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v; 89, p. 2723-2726, 1992.

TOMAZETTO, G.; MULINARIA, F.; STANISÇUASKI, F.; SETTEMBRINIB, B.; CARLINI, C. R.; AYUB, M. A. Z. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant E. coli encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 821–827, 2007.

TRITTO, E.; MUZZI, A.; PESCE, I.; MONACI, E.; NUTI, S.; GALLI, G.; WACK, A.; RAPPUOLI, R.; HUSSELL, T.; DE GREGORIO, E. The Acquired Immune Response to the Mucosal Adjuvant LTK63 Imprints the Mouse Lung with a Protective Signature. **J. Immunol**, v. 179, p. 5346-5357, 2007.

UPADHYAY, A. K.; MURMU, A.; SINGH, A.; PANDA, A. K. Kinetics of Inclusion Body Formation and Its Correlation with the Characteristics of Protein Aggregates in *Escherichia coli*. **PLoS One**, v. 7, e33951, 2012.

VALDES, I.; BERNARDO, L.; GIL, L.; PAVON, A.; LAZO, L.; LOPEZ, C.; ROMERO, Y.; MENENDEZ, I.; FALCÓN, V.; BETANCOURT, L.; MARTÍN, J.; CHINEA, G.; SILVA, R.; GUZMÁN, M. G.; GUILLÉN, G.; HERMIDA, L. A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. **Virology**, v. 394, p. 249–258, 2009.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; WENDEL-NETO, S. Hematologia - Hemoterapia. Atheneu: São Paulo, 1996.

WEINER, G. J.; LIU, H. M.; WOOLDRIDGE, J. E.; DAHLE, C. E.; KRIEG, A. M. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 10833–10837, 1997.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPH, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature reviews | Microbiology**, v. 5. 2007.

XU, T.; SAMPATH, A.; CHAO, A.; WEN, D.; NANAQ, M. Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4 Å. **Journal of Virology**, v. 79, p. 10278–10288, 2005.

ZHANG, Y. M.; HAYES, E. P.; MCCARTY, T. C.; DUBOIS, D. R.; SUMMERS, P. L.; ECKELS, K. H.; CHANOCK, R. M.; LAI, C. J. Immunization of mice with dengue structural protein and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. **Journal of Virology**, v. 62, p. 3027-3031, 1988.