

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

## 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.

## 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).

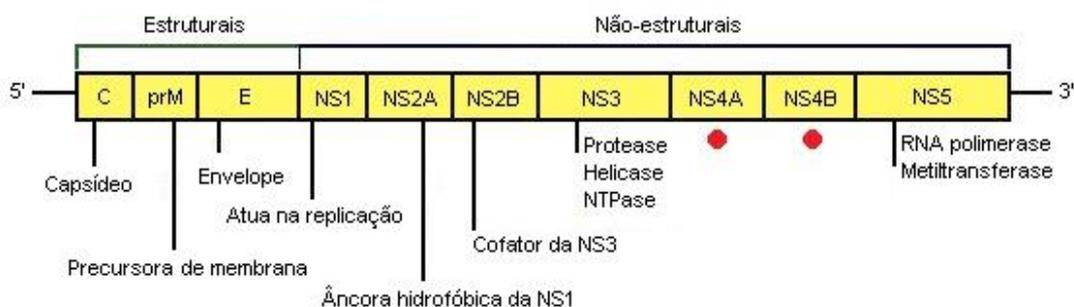


Figura 1. Genes codificadores das proteínas estruturais e não estruturais do genoma do DENV. As funções das proteínas codificadas pelos genes marcados com círculos vermelhos ainda não estão definidas. Adaptada de Whitehead et al., 2007.

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).

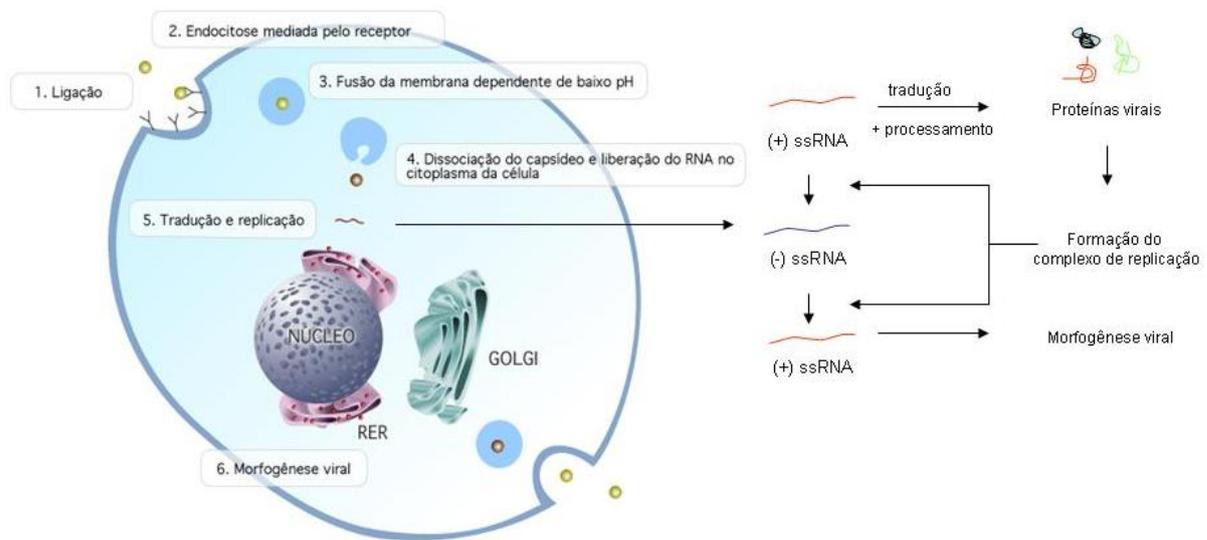


Figura 3. Etapas do processo infeccioso e da replicação do DENV em células eucarióticas. Após a infecção, a partícula viral se liga ao receptor celular (1) e há endocitose mediada pelo receptor (2). Ocorre a redução do pH do endossomo, o que promove a fusão da membrana viral à membrana do endossomo (3) 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).

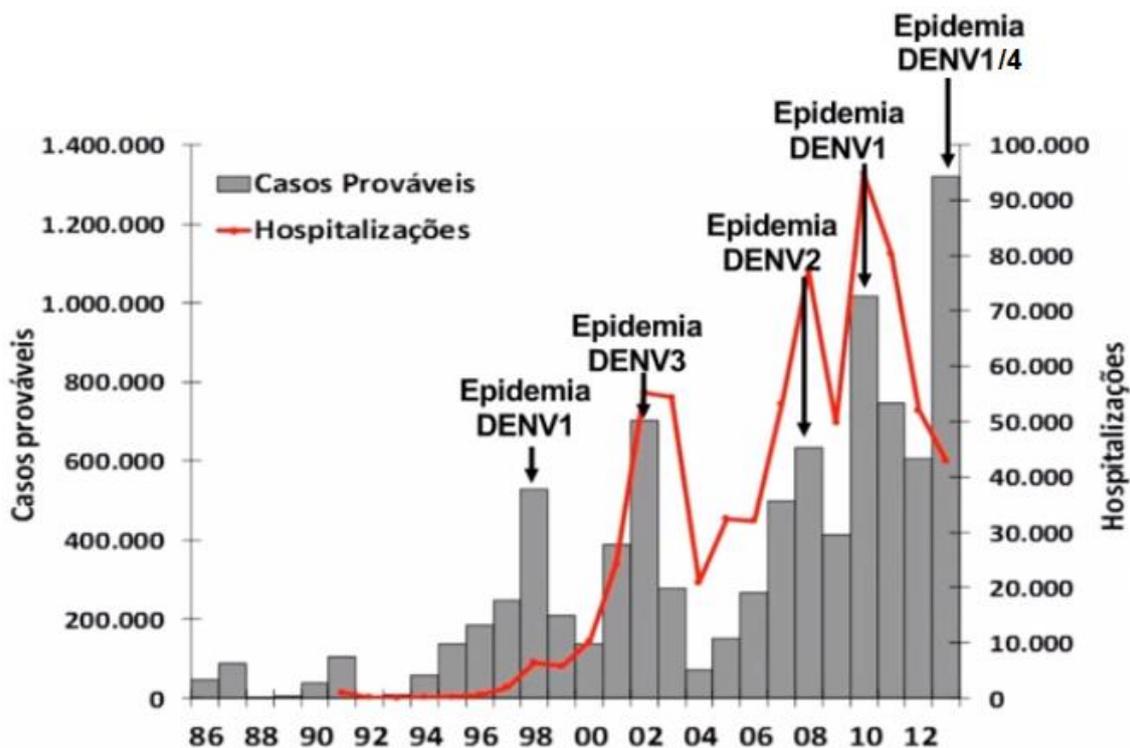


Figura 4. Casos notificados e internações por dengue no Brasil de 1986 a julho de 2013. Os picos das colunas evidenciam as cinco grandes epidemias que o país viveu nos anos 1998, 2002, 2008, 2010 e 2013. Fonte: Ministério da Saúde /Secretaria de Vigilância em Saúde.

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).

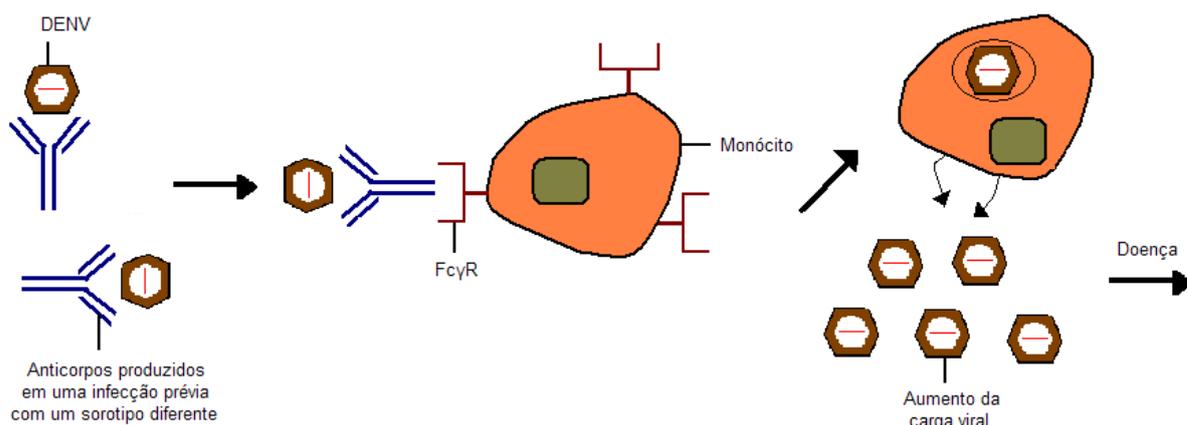


Figura 5. Teoria da infecção sequencial (ADE). Teoria proposta por Halstead em 1970 na qual a infecção sequencial por um sorotipo viral diferente em relação ao anterior leva a uma forma exacerbada da doença. Segundo essa teoria, os anticorpos produzidos na infecção prévia não são capazes de neutralizar 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 quando 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.

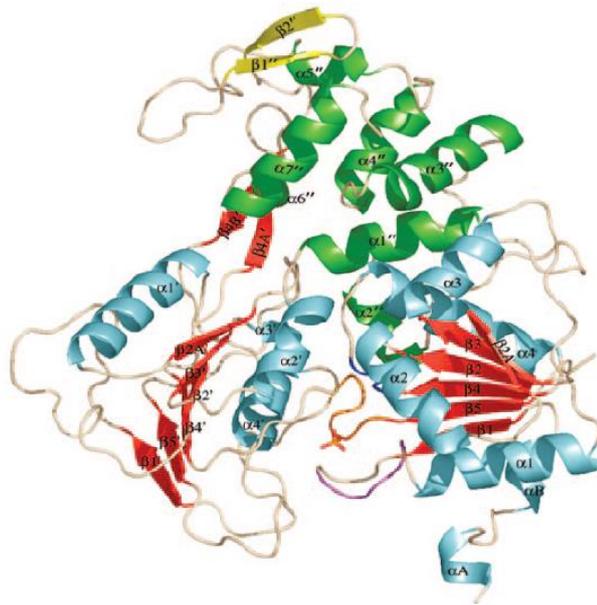


Figura 6. Estrutura secundária da NS3H. Cristalografia representando a estrutura em alfa hélices e folhas beta da NS3H. Adaptada de Xu et. al (2005).

Em 2007, Luria-Perez e colaboradores descreveram o uso de *Salmonella enterica* como vetor para plasmídeos que continham um epítipo CTL específico presente na NS3H. Cepas de *Salmonella* atenuadas são amplamente utilizadas como veículos vacinais para a entrega de antígenos ao sistema imunológico de mamíferos. Geralmente, no entanto, induzem pobres respostas de CTL, pois a bactéria reside em vacúolos e os antígenos precisam passar para o citosol e ser processados pela via dependente de MHC-I para induzir a resposta celular. Nesse trabalho, os autores projetaram uma proteína de fusão que desestabiliza a membrana do fagossomo e permite que o epítipo GYISTRVEM do DENV chegue ao citosol. O peptídeo utilizado foi o já caracterizado por Spaulding e colaboradores (1999) e os autores avaliaram o estímulo à resposta imunológica decorrentes do uso desse vetor e do referido epítipo. A proteína de fusão foi fusionada à superfície da bactéria de *S. Typhimurium* SL3261, como confirmado por imunofluorescência e citometria de fluxo. Camundongos Balb/C de 6 a 8 semanas de idade receberam as bactérias pela via orogástrica em concentração ajustada de  $10^{10}$  células/mL. As cepas recombinantes de *Salmonella* assim produzidas foram capazes induzir resposta específica proliferativa e respostas de CTL.

A utilização da NS3H como antígeno vacinal em vacinas de DNA apresentou resultados promissores (COSTA et al., 2011). Os autores desenvolveram

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>s</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 contêm 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).

## 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. 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.; NANAO, 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.