

**DENICAR LINA NASCIMENTO FABRIS MAEDA**

**IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS PRESENTES NA PROTEÍNA E DO VÍRUS  
DENGUE TIPO 2 (DENV2) CAPAZES DE GERAR ANTICORPOS  
NEUTRALIZANTES SEM A PROMOÇÃO DA EXACERBAÇÃO DA REPLICAÇÃO  
VIRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

**DENICAR LINA NASCIMENTO FABRIS MAEDA**

**IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS PRESENTES NA PROTEÍNA E DO VÍRUS  
DENGUE TIPO 2 (DENV2) CAPAZES DE GERAR ANTICORPOS  
NEUTRALIZANTES SEM A PROMOÇÃO DA EXACERBAÇÃO DA REPLICAÇÃO  
VIRAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão corrigida. Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-Graduação.

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Maeda, Denicar Lina Nascimento Fabris  
Identificação de epítomos presentes na proteína e  
do vírus dengue tipo 2 (DENV2) capazes de gerar  
anticorpos neutralizantes sem a promoção da  
exacerbação da replicação viral / Denicar Lina  
Nascimento Fabris Maeda; orientador Luís Carlos de  
Souza Ferreira. -- São Paulo, 2018.  
134 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Dengue. 2. Anticorpos. 3. Neutralização. 4.  
Adjuvantes. 5. Vacinas. I. Ferreira, Luís Carlos de  
Souza, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: Denicar Lina Nascimento Fabris Maeda

Título da Tese: **Identificação de epítomos presentes na proteína E do vírus Dengue tipo 2 (DENV2) capazes de gerar anticorpos neutralizantes sem a promoção da exacerbação da replicação viral**

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou a candidata:

(    ) **Aprovada**                      (    ) **Reprovada**

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

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

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

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



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Identificação de epítomos presentes na proteína E do vírus dengue tipo 2**", registrado sob o protocolo nº **63/2014-E**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **26/06/2014** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Luís Carlos de Souza Ferreira**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: Denicar Lina Nascimento Fabris, Rúbens Prince dos Santos Alves, Lennon Ramos Pereira, Jaime Henrique Amorim, Robert Andreato Santos

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceua](http://www.icb.usp.br/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**Identification of epitopes present in the E protein of dengue virus type 2 (DENV2) capable of generating neutralizing antibodies without causing exacerbation of viral replication**", protocol nº **63/2014-E**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **06/26/2014** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.


- Principal Investigator: **Dr.(a.) Luís Carlos de Souza Ferreira**

- Team members: Denicar Lina Nascimento Fabris, Rúbens Prince dos Santos Alves, Lennon Ramos Pereira, Jaime Henrique Amorim, Robert Andreato Santos.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb/c</i>	<i>Macho</i>	<i>6 semanas/weeks</i>	<i>1º ano: 150</i> <i>2º ano: 100</i> <i>3º ano: 100</i> <i>4º ano: 100</i>

São Paulo, 20 de outubro de 2017.

  
Prof. Dra. **Luciana Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho

À minha família,

Por todo o apoio, dedicação e carinho.

Ao Vitor, minha vida que amo muito,

Pelo companheirismo e compreensão.

E a Deus, meu Senhor e guia,

Proporcionando muitas conquistas,

Tornando os meus sonhos possíveis.

## AGRADECIMENTOS

Essa tese é resultado de muito esforço e dedicação não apenas por mim, mas também pela união de diversas colaborações e parcerias. Meus sinceros agradecimentos:

Ao prof. Luís, pela orientação, confiança e ensinamentos no caminho da ciência, possibilitando a realização deste trabalho.

À Dra. Juliana Falcão Rodrigues, por sua paciência, amizade, dedicação e por incentivar a prosseguir nos momentos difíceis. Ju muito obrigada!

À minha família, Derci, Carlito, Denise, Elza, Alfredo, Quel e Marcel, por todo o incentivo, carinho, confiança, compreensão e alegrias. Amo muito vocês!

Aos meus amores, Vitor, sempre presente, dedicado, carinhoso, compreensivo em todos os momentos, sempre me proporcionando momentos felizes, pelos seus conselhos e por ser meu grande amigo. Muito obrigada por me deixar fazer parte da sua vida e muito obrigada por me fazer muito feliz! E a Lolinha minha filhotinha tão doce, preenche a minha vida!!!

Aos amigos do laboratório, Lennon, Marina Cintra “Mari”, Sarinha “Sarajane”, Nayara “Nay”, Natiely “Naty”, Samuel, “Sam”, Alexia, Hélic, Dalva e Raíza “Ra” muito obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração, descompressão, companheirismo e por sempre me apoiarem!!!

Aos companheiros de grupo DENGUE, Samuel, Alexia, Robert, Rúbens Mariana, Mônica, Sara, Higo, Carlinha pelos momentos de discussão em ciência e ajuda experimentais.

Aos técnicos Eduardo Gimenes e Carolina Bertelli, por sempre auxiliarem no que for preciso e da melhor forma possível. Obrigada pessoal!

Aos colegas, Bruna, Mariângela, Patrícia, Fagner, Mari Diniz, Milene, Luana, Jamile, Karine, Ana Carolina, Roberta, pelas conversas e auxílios experimentais.

À profa. Rita por me aceitar no laboratório e sempre confiar no meu trabalho.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), processo: 2014/04303-0, 2014 – 2018.

À colaboração da pesquisadora Dra. Sandriana Ramos, pela determinação, dedicação e amizade, animação, e por sempre estar disposta a ajudar. San muito obrigada!

À colaboração da pesquisadora Dra. Silvia B. Boscardin, pelos conselhos e discussões em ciências que me ajudaram muito!!!

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro do processo nº 2014/04303-0, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).



“Lembre-se de Olhar para as Estrelas

E não para baixo em seus pés.

Tente identificar o sentido do que você vê.

E se pergunte o que faz o universo existir. Seja curioso!

E, no entanto, por mais que a vida possa parecer difícil,

Há sempre algo que você possa fazer e ter Sucesso!

O que importa É você Não Desistir”

Stephen Hawking

## RESUMO

MAEDA, D. N. L. F. **Identificação de epítomos presentes na proteína E do vírus Dengue tipo 2 (DENV2) capazes de gerar anticorpos neutralizantes sem a promoção da exacerbação da replicação viral.** 2018. 134 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A dengue é uma doença causada por um dos quatro sorotipos de vírus da dengue (DENV 1-4), e representa a principal arbovirose que atualmente atinge seres humanos. Dentre as maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o DENV, correlaciona-se a falta de conhecimento mais preciso sobre os epítomos presentes na superfície do vírus, responsáveis para indução de anticorpos neutralizantes sem promoverem a exacerbação da infecção viral. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar epítomos presentes na superfície do DENV2 capazes de gerar anticorpos neutralizantes sem promover a amplificação viral frente a células que expressem receptores FcγR. Avaliamos também a influência dos adjuvantes (LT, LT-K63 e LTB), na modulação da resposta de anticorpos para epítomos presentes nos domínios I, II e III da proteína de envelope do DENV2. Observamos que a administração das LTs como adjuvantes proporcionaram a potencialização da resposta de anticorpos IgG EDI/II ou EDIII-específicos nos animais imunizados, em relação aos outros grupos vacinais. Em relação à qualidade da resposta humoral proporcionada pelas imunizações, os anticorpos antígeno-específicos gerados com LT, LT-K63 ou LTB apresentaram maior capacidade de neutralização viral em comparação com aqueles obtidos dos demais grupos vacinais. Demonstramos de forma inédita através da análise de imunoassinatura dos anticorpos IgG EDIII-específicos, que a administração de LT e LTB como adjuvante vacinal, permitiu a identificação de um epítopo localizado na alça EF e FG da proteína EDIII de DENV2. Além disso, por meio da utilização do peptídeo 47 contendo a sequência correspondente ao epítopo identificado, foi capaz de inibir a infecção do DENV2, tão bem quanto a proteína EDIII em ensaios *in vitro*. Podemos perceber, que a utilização do adjuvante LT e seu derivado atóxico LTB em formulações vacinais, possibilitaram a modulação de anticorpos capazes de reconhecer epítomos presentes no EDIII, importantes para a neutralização viral. Esses resultados, permitem o desenvolvimento de novos antígenos alvos para estratégias vacinas voltadas para o controle dos DENV.

**Palavras-chave:** Adjuvantes. Anticorpos. Dengue. Neutralização. Proteína de envelope.

## ABSTRACT

MAEDA, D. N. L. F. **Identification of epitopes present in the E protein of dengue virus type 2 (DENV2) capable of generating neutralizing antibodies without causing exacerbation of viral replication.** 2018. 134 p. Thesis (Ph. D thesis Biology of Host-Pathogen) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Dengue is a disease caused by one of four dengue virus serotypes (DENV 1-4), represents the main arbovirose that currently affects humans. Among the greatest difficulties for the development of effective vaccine against DENV is the lack of more precise knowledge about the epitopes present at the surface of the virus, responsible for the induction of neutralizing antibodies without promoting the exacerbation of viral infection. Thus, the objective of the present work was to identify epitopes present on the surface of DENV2 capable of generating neutralizing antibodies without promoting viral amplification against cells expressing the Fc $\gamma$ R receptors. We also evaluated the influence of adjuvants (LT, LT-K63 and LTB) on the modulation of the antibody response to epitopes present in domains I, II and III in envelope protein of DENV2. We have observed that administration of LTs as adjuvants provided potentialization of the antibodies response IgG EDI/II or EDIII-specific in the immunized animals, relative to the other vaccine groups. Regarding the quality of the humoral response provided by the immunizations, the antigen-specific antibodies generated with LT, LT-K63 or LTB presented higher viral neutralization capacity compared to those obtained from the other vaccine groups. We demonstrated through the immunoassay analysis of EDIII-specific IgG antibodies that the administration of LT and LTB as a vaccine adjuvant allowed the identification of an epitope located in the EF and FG loop of the EDIII protein of DENV2. Furthermore, by using the peptide 47 containing the sequence corresponding to the identified epitope, it was able to inhibit DENV2 infection as well as the EDIII protein in vitro assays. The LT adjuvant and its non-toxic derivative LTB in vaccine formulations enabled the modulation of antibodies capable of recognizing epitopes present in EDIII, which are important for viral neutralization. These results allow the development of new target antigens for vaccine strategies aimed at the control of DENV.

**Keywords:** Adjuvants. Antibodies. Dengue. Envelope protein. Neutralization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de replicação do DENV.....	23
<b>Figura 2.</b> Proteína de envelope do DENV. Representação esquemática da glicoproteína de E .....	26
<b>Figura 3.</b> Modelo de relação entre acessibilidade de epítipo e ocupância requerida para neutralização.....	27
<b>Figura 4.</b> Aumento da infecção mediada por receptores Fc $\gamma$ R.....	30
<b>Figura 5.</b> Clonagem da sequência <i>eI/II</i> em vetor de expressão pET28a.....	59
<b>Figura 6.</b> Expressão da proteína recombinante EDI/II em células de <i>E. coli</i> BL21 DE3 RP e RIL nas temperaturas de 18 °C e 37 °C.....	60
<b>Figura 7.</b> Purificação da proteína EDI/II obtida na fração solúvel após indução da expressão em <i>E. BL21 DE3 Ril</i> por 18 h a temperatura de 18 °C .....	61
<b>Figura 8.</b> Purificação e análise de distribuição de partículas da proteína EDI/II expressa após solubilização dos corpúsculos de inclusão em alta pressão de 1.4 bar.....	63
<b>Figura 9.</b> Purificação e análise de distribuição de partículas da proteína EDI/II obtida após solubilização dos corpúsculos de inclusão em tampão contendo ureia 6 M .....	65
<b>Figura 10.</b> Purificação e análise da atividade biológica do adjuvante LT-K63.....	66
<b>Figura 11.</b> Avaliação da antigenicidade da proteína recombinante EDI/II por ELISA com amostras de indivíduos .....	68
<b>Figura 12.</b> Esquema de imunização e análise de respostas humorais EDI/II-específica induzida após imunização .....	68
<b>Figura 13.</b> Avaliação da capacidade neutralizante dos soros de animais imunizados obtidos após administração das diferentes formulações vacinais. ....	70
<b>Figura 14.</b> Expressão e purificação da proteína EDIII proveniente da solubilização dos corpúsculos de inclusão em tampão contendo ureia 6M .....	73
<b>Figura 15.</b> Avaliação da atividade biológica e antigenicidade da proteína EDIII recombinante .....	74
<b>Figura 16.</b> Purificação do vírus DENV2 em coluna de troca iônica. ....	75
<b>Figura 17.</b> Avaliação da capacidade de infecção do DENV2 purificado por ensaio de imunofluorescência em células Vero.....	77
<b>Figura 18.</b> Microscopia eletrônica de transmissão do DENV2 purificado.....	77

<b>Figura 19.</b> Avaliação da antigenicidade do DENV2 purificado com amostras de soro de indivíduos infectados .....	78
<b>Figura 20.</b> Esquema de imunização e análise da resposta humoral anti-EDIII e anti-DENV2 em camundongos imunizados .....	79
<b>Figura 21.</b> Avaliação da capacidade neutralizante de soros de animais imunizados com as diferentes formulações vacinais.....	81
<b>Figura 22.</b> Padronização do ensaio de ADE em células U937 com os diferentes sorotipos de DENV e ZIKV.....	83
<b>Figura 23.</b> Ensaio de ADE em células U937 para os quatro sorotipos de DENV e ZIKV por citometria de fluxo .....	84
<b>Figura 24.</b> Avaliação da capacidade de neutralização viral de soros dos animais imunizados .....	85
<b>Figura 25.</b> Ensaio de desafio dos animais imunizados com DENV2 (NGC) .....	86
<b>Figura 26.</b> Avaliação do perfil de citocinas secretadas nos animais imunizados frente ao estímulo <i>in vitro</i> com a proteína EDIII .....	88
<b>Figura 27.</b> Expressão intracelular de IL-4, INF- $\gamma$ , IL-10 por células T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> induzida pelas imunizações .....	89
<b>Figura 28.</b> Purificação e análise da atividade biológica de LT, LTB e EDIII .....	91
<b>Figura 29.</b> Análise das respostas de anticorpos EDIII-específicas induzidas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais .....	92
<b>Figura 30.</b> Purificação dos anticorpos IgG EDIII-específicos. Anticorpos IgG EDIII-específicos foram purificados do soro de animais imunizados. ....	94
<b>Figura 31.</b> Caracterização dos anticorpos IgG EDIII-específicos obtidos de animais imunizados .....	95
<b>Figura 32.</b> Análise das imunoassinaturas dos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados.	97
<b>Figura 33.</b> Identificação do epítipo linear derivado da EDIII envolvido na ligação de DENV2 nas células Vero.....	98
<b>Figura 34.</b> Inibição da infecção pelo DENV2 com o peptídeo 47.....	99
<b>Figura 35.</b> Sequência Logos dos anticorpos IgG EDIII-específicos .....	100
<b>Figura 36.</b> Representação do peptídeo 47 de DENV2 e ZIKV .....	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Teste de diferentes concentrações de proteínas com diferentes concentrações corante sypro orange. ....	40
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros utilizados para a minimização de energia do sistema, equilíbrio do sistema e dinâmica molecular.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de Variância simples)
ADCC	<i>Antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i>
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i>
BV421	Brilliant violet 421
BV605	Brilliant violet 605
C	<i>Capsid protein</i>
CDR	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
CMC	Carboximetilcelulose
NK	<i>Cells natural killers</i> (células matadoras profissionais)
Th1	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 1)
Th17	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 17)
Th2	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 2)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD4+	<i>Cluster of differentiation 4+</i> (grupo de diferenciação)
CD8+	<i>Cluster of differentiation 8+</i> (grupo de diferenciação)
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i> (grupo de diferenciação)
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i> (grupo de diferenciação)
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
DC	<i>Dendritic cells</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DENV	Dengue virus
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
d.nm	<i>Diameter nanomol medium</i>
DL	Dose letal
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
EPEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
E	<i>Envelope protein</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
FcγR	<i>Fc gamma receptors</i>

FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragments crystallizable</i>
GC	<i>Germinal centers</i>
Trizol	<i>Guanidine isothiocyanate phenol</i>
LT	<i>Heat labile toxin</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif),</i>
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IPEN	Instituto de Pesquisa Energéticas Nucleares
INFg	<i>Interferon gamma (interferon gama)</i>
IL	Interleucinas
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1 tiogalactopiranosideo
LPS	Lipolissacarídeo
LB	Luria Bertani
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MHC II	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
MR	<i>Manose receptor</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
M	<i>Membrane protein</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MEM	Meio Mínimo Essencial de Eagle
GM1	<i>Monosialotetrahexosylganglioside</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NGC	<i>New Guinea C</i>
NS	<i>Non structural proteins</i>
OPD	Ortofenilenodiamina
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline tween</i>



PE	<i>Phycoerythrin</i>
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Teste</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction (reação de cadeia e polimerase)</i>
RT-PCR	Real time reverse transcription polimerase chain reaction
rIFN- $\alpha$	Receptor de interferon alfa
rIFN- $\beta$	Receptor de interferon beta
rIFN- $\gamma$	Receptor de interferon gama
RIG-1	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)</i>
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G
IgG2	Subclasse tipo 2 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2a de imunoglobulina G
Th	<i>T helper</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TRIF	<i>TIR - domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UFP	Unidade formadora de placa

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg/µL	Micrograma/microlitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
Ø	Diâmetro
cm	Centímetro
D.O600nm	Densidade ótica a 600 nanômetros
EU	Unidade endotóxica
g	Força centrífuga relativa (RCF) ou força gravitacional
kDa	Kilodalton
kbar	Kilobar
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama/mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
°C	Grau Celsius
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrogênio
pM	Picomolar
psi	Pound force per square inch (libra força por polegada quadrada)
R2	Coefficiente de correlação da regressão linear
rpm	Rotação por minuto
VC	Volume de coluna
λ	Lambda comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 CICLO DE REPLICAÇÃO DO DENV.....	22
1.2 RESPOSTA IMUNE INATA EM INFECÇÕES PELO DENV.....	22
1.3 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA CONTRA O DENV.....	24
1.4 ESTRUTURA DA GLICOPROTEÍNA DE ENVELOPE VIRAL E MECANISMO DE NEUTRALIZAÇÃO.....	25
1.5 AUMENTO DA INFECÇÃO VIRAL MEDIADA POR ANTICORPOS.....	29
1.6 IMPLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA DENV.....	31
<b>2 OBJETIVO</b> .....	34
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	35
3.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS E ADJUVANTES VACINAIS.....	35
<b>3.1.1 Proteína EDI/II de DENV2</b> .....	35
3.1.1.1 <i>Clonagem da sequência genética correspondente ao domínio I e II da proteína E (edi/II) em vetor de expressão pET28a</i> .....	35
3.1.1.2 <i>Teste de expressão da proteína EDI/II recombinante em E. coli BL21 DE03 RIL ou RP</i> .....	35
3.1.1.3 <i>Purificação da proteína EDI/II presente na fração solúvel proveniente da expressão em E. coli BL21 DE03 RIL</i> .....	36
3.1.1.4 <i>Purificação da proteína EDI/II proveniente da expressão em E. coli BL21 DE03 RIL por meio de solubilização dos corpúsculos de inclusão em tampão com ureia</i> .....	37
3.1.1.5 <i>Purificação da proteína EDI/II por solubilização dos corpúsculos de inclusão com alta pressão hidrostática</i> .....	37
3.1.1.6 <i>Purificação da proteína EDI/II por cromatografia de exclusão de tamanho</i> .....	39
3.1.1.7 <i>Análise de tamanho e distribuição das partículas da proteína recombinante EDI/II por Espalhamento de Luz Dinâmico (dynamic light scattering – DLS)</i> .....	39
3.1.1.8 <i>Análise da estabilidade da proteína EDI/II por ensaio de deslocamento térmico (thermoshift)</i> .....	40
<b>3.1.2 Obtenção e avaliação da atividade biológica da proteína recombinante EDIII de DENV2</b> .....	40
3.1.2.1 <i>Expressão e purificação da proteína EDIII</i> .....	40
3.1.2.2 <i>Análise da atividade biológica da proteína EDIII em células Vero</i> .....	42
<b>3.1.3 Obtenção e avaliação da atividade biológica do DENV2 purificados</b> .....	42
3.1.3.1 <i>Purificação do DENV2 NGC</i> .....	42
3.1.3.2 <i>Ensaio de Imunofluorescência indireta em células Vero infectadas com vírus Dengue 2 purificado</i> .....	43

3.1.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão do vírus Dengue 2 purificado.....	44
<b>3.1.4 Purificação e caracterização da atividade biológica dos adjuvantes LT e seus derivados LT-K63 e LTB .....</b>	<b>44</b>
3.1.4.1 Clonagem do adjuvante LTB.....	44
3.1.4.2 Expressão e purificação dos adjuvantes LT, LT-K63 e LTB.....	45
3.1.4.3 Avaliação da capacidade de ligação dos adjuvantes LT, LT-K63 e LTB ao gangliosídeo GM1 por ELISA .....	46
3.1.4.4 Análise do efeito citotônico dos adjuvantes LT e LTB em células Y1 .....	46
<b>3.2 REMOÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DOS ADJUVANTES E ANTÍGENOS UTILIZADOS NAS IMUNIZAÇÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3 ENSAIO DE IMUNIZAÇÃO COM EDI/II, EDIII OU DENV2 PURIFICADO.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.1 Imunização com EDI/II, EDIII ou DENV2 purificado pela via intramuscular .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.2 Imunização com EDIII pela via subcutânea .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4.1 Análise da resposta humoral .....</b>	<b>48</b>
3.4.1.1 ELISA com a proteína EDI/II .....	48
3.4.1.2 ELISA com a proteína EDIII .....	49
3.4.1.3 ELISA com DENV2 purificado.....	49
3.4.1.4 Determinação afinidade dos anticorpos IgG anti-EDIII .....	50
3.4.1.5 Determinação da capacidade de neutralização viral dos anticorpos antígeno-específicos em células Vero.....	50
3.4.1.6 Determinação da capacidade de neutralização viral dos anticorpos antígeno-específicos em células K562 ou U937 .....	51
3.4.1.7 Determinação da capacidade de neutralização viral dos anticorpos antígeno-específicos em modelo animal .....	52
3.4.1.8 Purificação dos anticorpos IgG anti-EDIII.....	53
3.4.1.9 Análise da Imunoassinatura dos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados.....	53
3.4.1.10 Determinação da sequência Logos dos anticorpos IgG EDIII-específicos .....	54
<b>3.4.2 Análise da resposta celular .....</b>	<b>54</b>
3.4.2.1 Marcação de citocinas intracelular .....	54
3.4.2.2 Análise do perfil de citocinas secretadas .....	55
<b>3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DO PEPTÍDEO 47 DE DENV2.....</b>	<b>55</b>
<b>3.5.1 Ensaio de competição do peptídeo 47 de DENV2. ....</b>	<b>55</b>
<b>3.5.2 Análise estrutural do peptídeo 47 de DENV2 .....</b>	<b>56</b>
<b>3.5.3 Modelagem molecular da estrutura do peptídeo 47 de DENV2 e seu correspondente no vírus ZIKA .....</b>	<b>57</b>

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	57
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA NA IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE EDI/II DENV2.....	58
4.1.1 Clonagem da sequência genética <i>edi/II</i> em vetor de expressão pET28a e expressão da proteína recombinante .....	58
4.1.2 Purificação da proteína recombinante EDI/II e do adjuvante LT-K63 .....	59
4.1.3 Avaliação da antigenicidade da proteína recombinante EDI/II.....	66
4.1.4 Ensaio de imunização e avaliação das respostas de anticorpos EDI/II-específicas.	67
4.2 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS INDUZIDAS APÓS IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR COM ANTÍGENOS EDIII E PARTÍCULAS VIRAIS DE DENV2.....	71
4.2.1 Expressão, purificação e caracterização biológica da proteína recombinante EDIII de DENV2.....	71
4.2.2 Purificação e caracterização biológica da cepa NGC de DENV2 .....	74
4.2.3 Ensaio de imunização e avaliação da resposta humoral anti-EDIII e anti-DENV2	78
4.2.4 Avaliação da capacidade de soroneutralização em ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	80
4.2.5 Avaliação da capacidade de proteção induzida pela imunização.....	86
4.2.6 Análise das respostas celulares antígeno-específica nos animais imunizados .....	86
4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EDIII-ESPECÍFICA INDUZIDA APÓS IMUNIZAÇÃO SUBCUTÂNEA .....	90
4.3.1 Purificação e caracterização da atividade biológica dos adjuvantes LT e LT-B.....	90
4.3.2 Purificação e avaliação da afinidade e capacidade de neutralização dos anticorpos IgG EDIII-específicos.....	92
4.3.3 Determinação das imunoassinaturas dos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados .....	95
4.3.4 Predição de epítipo e avaliação da atividade inibitória .....	96
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>
<b>APÊNDICE - A.....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença causada por um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* do gênero *Flavivirus*. Em torno de 390 milhões de casos de dengue no mundo e dentre esses, aproximadamente 96 milhões de casos desenvolvem formas graves da doença, como síndrome de choque da dengue e a febre hemorrágica da dengue (DHF – *dengue hemorrhagic fever*), (**Figura 1**) (CARDOSA, 1998; BHATT et al., 2012; HALSTEAD, 2014; GUZMAN; HARRIS, 2015; GUZMAN et al., 2016). Na maioria dos casos, a infecção pelo vírus dengue (DENV) apresenta-se assintomática. Entretanto, após 4 -7 dias de infecção pode se manifestar sintomas da fase aguda: febre alta e intermitente, dores de cabeça, artralgia, dor abdominal aguda e vômitos. Em alguns casos, a evolução da doença pode resultar nas formas mais graves ou fase crítica, caracterizados por aumento da fragilidade vascular, extravasamento de plasma, coagulopatia e aparecimento de petéquias (DHF). Com a progressão da DHF pode-se evoluir para o desenvolvimento da Síndrome do Choque da dengue (DSS - *dengue shock syndrome*), caracterizada pela encefalite, insuficiência hepática, coagulação intravascular disseminada, hipotensão, acidose metabólica, leucopenia, dentre outros (GUZMAN; HARRIS, 2015; SCREATON et al., 2015; GUZMAN et al., 2016).

A gravidade da doença secundária está intimamente implicada em quatro fatores envolvidos no controle da infecção. O primeiro fator está relacionado com o perfil imunológico do hospedeiro, ou seja, a capacidade de geração de resposta humoral protetora homotípica por um longo período, acompanhada por um período curto de proteção heterotípica. Após esta fase, em alguns casos, os anticorpos gerados durante uma infecção primária podem levar ao aumento da infecção por outro sorotipo de DENV. Outro fator compreende as mudanças genéticas dos DENV proporcionando um aumento na virulência e escape da resposta antiviral, podendo afetar diretamente seu potencial transmissor no vetor ou o processo da doença em humanos. O terceiro fator descrito envolve alterações genéticas no antígeno leucocitário humano (HLA – *human leukocyte antigen*), que podem aumentar a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro ao DENV. O quarto e último fator abrange a idade da pessoa infectada. Crianças e idosos são considerados grupos risco para desenvolver formas mais graves da doença em infecções secundárias pelo DENV (GUZMAN et al., 2016).

## 1.1 CICLO DE REPLICAÇÃO DO DENV

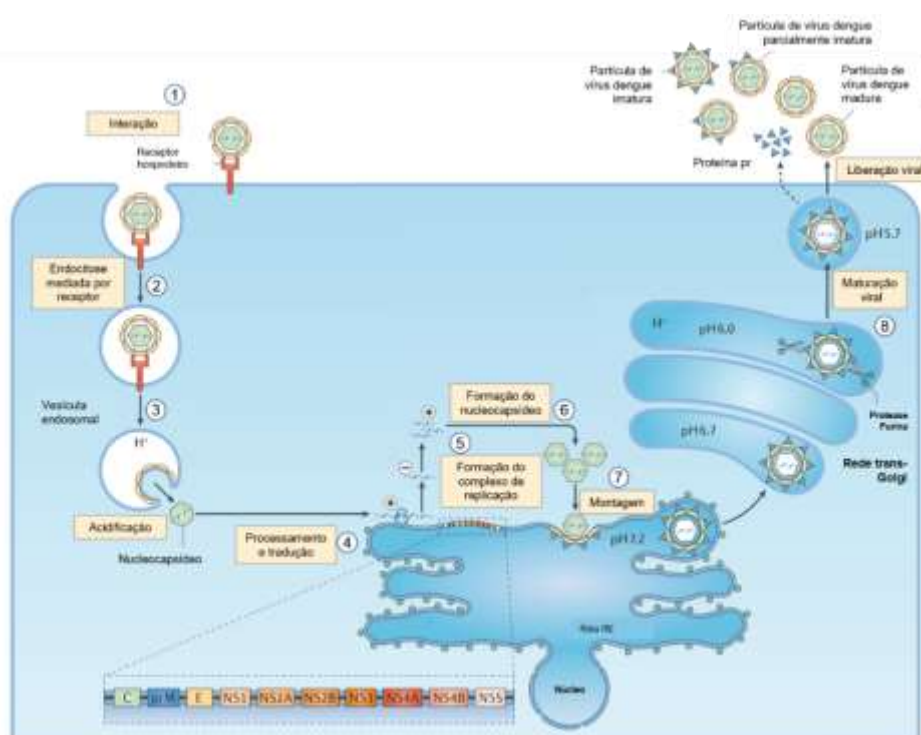
Atualmente existem 4 tipos de DENV (DENV1 a DENV4) com aproximadamente 60% de identidade com relação às suas sequências de aminoácidos (FLIPSE; SMIT, 2015). O DENV é transmitido através da picada do vetor do gênero *Aedes*, principalmente pela espécie *Aedes aegypti*. Durante o repasto sanguíneo o vírus DENV é liberado na derme e epiderme e, por meio da interação da proteína de envelope aos receptores celulares, é internalizado para células alvo principalmente por endocitose, em um processo dependente de clatrina. Dentro do endossomo, a redução do pH promove mudança conformacional da proteína de envelope, o que leva à fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e a liberação do capsídeo para o citoplasma celular. O capsídeo então se dissocia, liberando o material genético no citoplasma.

O material genético do DENV é representado por um RNA de fita simples com orientação positiva que codifica três proteínas estruturais: envelope, membrana e capsídeo (E - *envelope protein*, M - *membrane protein* e C - *capsid protein*) e sete proteínas não estruturais (NS1 - *non structural proteins*, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), ausentes no virion e expressas somente em células infectadas. Por meio da maquinaria de síntese proteica da célula hospedeira, ocorre a tradução do RNA viral em uma poliproteína que posteriormente será clivada e originará as proteínas acima descritas. Algumas dessas proteínas estarão envolvidas na síntese de RNA de fita simples com orientação negativa, que servirá de molde para a amplificação do genoma viral (RNA senso). Em seguida, novos ciclos de tradução das proteínas do DENV serão realizados e as proteínas produzidas serão destinadas à morfogênese de novas partículas virais. Após a montagem do complexo de replicação no retículo endoplasmático e replicação do RNA, ocorre a montagem das partículas virais caracterizadas pela presença da proteína prM na superfície, com a finalidade de estabilizar a proteína de envelope prevenindo mudanças conformacionais prematuras. Os virions imaturos são transportados via complexo de Golgi e, durante esse processo, sofrem clivagem da proteína prM pela ação da protease furina, tornando as partículas maduras e, em seguida, liberados da célula infectada, (**Figura 1**) (PERERA; KUHN, 2008; KAUFMANN; ROSSMANN, 2011; SCREATON et al., 2015; GUZMAN et al., 2016).

## 1.2 RESPOSTA IMUNE INATA EM INFECÇÕES PELO DENV

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra a infecção causada pelo vírus dengue, sua ativação inicia-se na pele após a inoculação do vírus pelo vetor. A pele é organizada

em três camadas: epiderme, derme e hipoderme sucessivamente. A replicação do DENV ocorre principalmente nas células residentes na epiderme e derme. A epiderme é composta queratinócitos, melanócitos e um tipo de células dendríticas, denominadas células de Langerhans, que, após ativação, migram para linfonodos drenantes para interação com linfócitos T. A derme possui fibroblastos, células endoteliais, células dendríticas (DC- *dendritic cells*), macrófagos entre outros tipos celulares (ST. JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013; GARCIA et al., 2017). As células infectadas pelo DENV são ativadas após reconhecimento do RNA viral pelos receptores intracelulares reconhecedores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen-associated molecular pattern*), como receptores do tipo Toll (TLRs - *Toll-like receptors*) e alguns sensores intracelulares da família de helicases (MDA5 – *melanoma differentiation-associated protein 5*; RIG-1 - *retinoic acid-inducible gene 1*).



**Figura 1. Ciclo de replicação do DENV.** O vírus interage com receptores presentes nas células hospedeiras (1) e, subsequentemente, é internalizado via endocitose pela clatrina (2). Com a diminuição do pH endossomal ocorre mudança conformacional da proteína de envelope que, por sua vez, se funde com a membrana do endossomo e libera o nucleocapsídeo para o citoplasma (3). O RNA livre é traduzido no retículo endoplasmático (RE) para a formação de uma poliproteína contendo 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não-estruturais (4). Ocorre a formação do complexo de replicação (5) e o RNA replicado é incorporado ao nucleocapsídeo (6) para montagem das partículas virais (7). Os virions imaturos são transportados via complexo Golgi e, após clivagem pela protease Furina (maturação), são liberados da célula hospedeira (8). Fonte: modificado de Screaton et al., 2015.

A ativação via o TLR3 ocorre após o processo de acidificação do ambiente endossomal e por meio da sinalização de vias intracelulares mediadas pelo adaptador induzido por interferon  $\beta$  (TRIF – TIR - *domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ), promovendo uma forte



expressão das interleucinas (IL) IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*), bem como respostas mediadas por interferon tipo I  $\alpha/\beta$  (INF- $\alpha/\beta$ ). Além do TLR3, o RNA viral pode ativar o TLR-7 que também está presente no endossomo, entretanto o processo de sinalização da cascata é mediada pela molécula adaptadora de diferenciação mielóide (MYD88 - *Myeloid differentiation primary response 88*), desencadeando a produção de TNF, IL-6 e INF- $\alpha$  (GREEN et al., 2015; GUZMAN; HARRIS, 2015; GARCIA et al., 2017; SPROKHOLT; HELGERS; GEIJTENBEEK, 2018).

Os sensores citoplasmáticos RIG-1 e MDA-5 têm demonstrado um importante papel em respostas anti-DENV, principalmente em células DC e macrófagos infectados. Essas moléculas induzem respostas imunológicas via proteínas sinalizadoras antivirais mitocondriais (MAVS - *Mitochondrial antiviral-signaling protein*), favorecendo produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 TNF e INF tipo 1 e INF tipo 2 (INF- $\gamma$ ). Em DCs maduras, os sensores RIG-1 e MDA-5 promovem a expressão de moléculas coestimulatórias do grupo de diferenciação (CD - *cluster of differentiation*) 80, CD83, CD86, CD40 e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - *major histocompatibility complex*) I e II, importantes para a resposta imunológica adaptativa (GREEN et al., 2015; SPROKHOLT; HELGERS; GEIJTENBEEK, 2018).

### 1.3 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA CONTRA O DENV

A resposta imunológica adaptativa mediada pela ativação de linfócitos B e principalmente T são cruciais para a proteção contra infecção causada pelo DENV. Inicialmente durante a resposta primária, ocorre a indução da expansão de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> citotóxicos de memória sorotipo-específica e com reatividade cruzada. Em uma segunda exposição ao DENV, essas células se expandem e rapidamente desencadeiam a ativação de linfócitos T auxiliares (Th – *T helper*), que por sua vez, aumentam a produção de INF- $\gamma$ , TNF, IL-12 e a expressão de CD107a. O aumento da expressão de INF- $\gamma$  e CD107a promove a lise de células infectadas pelo DENV (WEISKOPF; SETTE, 2014; RIVINO, 2016; SPROKHOLT; HELGERS; GEIJTENBEEK, 2018). Em alguns trabalhos foram descritas regiões imunodominantes presentes nas proteínas de DENV com papel importante para a ativação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> citotóxicos pelas DCs. Para linfócitos TCD8<sup>+</sup>, os epítomos imunodominantes estão presentes majoritariamente nas proteínas não estruturais NS3 e NS5, enquanto que para a ativação de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, regiões presentes nas proteínas NS1,

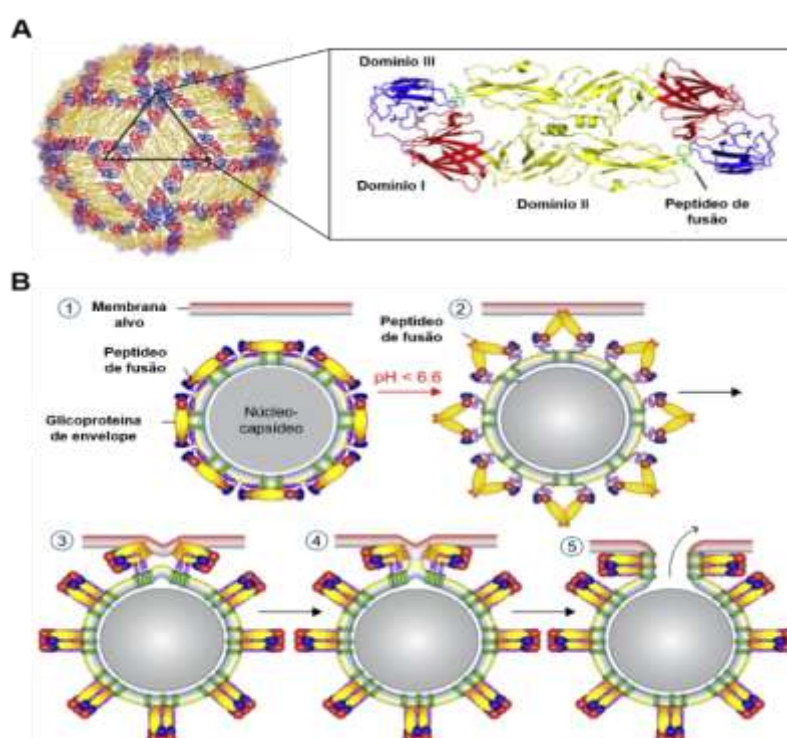
capsídeo e envelope viral mostram-se mais relevantes (MALAVIGE; OGG, 2013; MATHEW; TOWNSLEY; ENNIS, 2014).

A ativação de linfócitos B durante a infecção pelo DENV pode ocorrer de forma T independente ou dependente. Durante o processo infeccioso, o DENV pode ser drenado para linfonodos próximos e promover a ativação e expansão das células imunológicas, proporcionando a formação do centro germinativo (GC – *germinal centers*) no linfonodo. Os linfócitos B imaturos DENV-específicos podem ser ativados após interação de seus receptores de superfície com o vírus, promovendo a expansão de plasmócitos extrafolicular de vida curta produtoras de IgM. Por outro lado, a ativação T-dependente de linfócitos B ocorre com a participação dos linfócitos Th foliculares que ao produzirem citocinas promovem a troca de classe de anticorpos antígeno-específicos e expansão de linfócitos B altamente específicos em plasmócitos de vida longa e linfócitos B de memória. Os anticorpos secretados pelos linfócitos B reconhecem em sua maioria epítomos presentes em toda a superfície da proteína de envelope, entretanto, também há a produção de anticorpos direcionados para a proteína prM e para proteínas não estruturais (PHYSIOL et al., 2013; VANBLARGAN; GOO; PIERSON, 2016; YAM-PUC et al., 2016).

#### 1.4 ESTRUTURA DA GLICOPROTEÍNA DE ENVELOPE VIRAL E MECANISMO DE NEUTRALIZAÇÃO

A proteína de envelope (53 kDa) é considerada um importante fator antigênico do DENV para indução de anticorpos neutralizantes. A superfície viral apresenta 90 homodímeros de proteína de envelope e cada monômero da proteína apresenta três domínios: I (EDI - estrutura em  $\beta$ -barril presente na região central da molécula), II (EDII - domínio que compreende o peptídeo de fusão) e III (EDIII - porção C-terminal tipo-imunoglobulina), (**Figura 2A**). A proteína de envelope também apresenta dois sítios de *N*-glicosilação (cadeias de carboidratos ligados ao aminoácido asparagina): Asn-67, encontrada apenas em DENV e Asn-153, conservada em todos os *Flavivirus* (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015a; MONDOTTE et al., 2007; ZHANG; BOOTH, 2010; ZHANG et al., 2012). Os domínios da proteína de envelope são essenciais para o processo de infecção nas células hospedeiras e o processo inicia-se pela ligação do EDIII em receptores presentes na superfície celular. A capacidade do DENV em infectar vários tipos celulares está relacionada às características intrínsecas do EDIII em interagir com diferentes receptores, como por exemplo, heparan sulfato, receptor de manose da família de lectinas tipo-C, moléculas de adesão de DCs (DC-SIGN - *Dendritic Cell-*

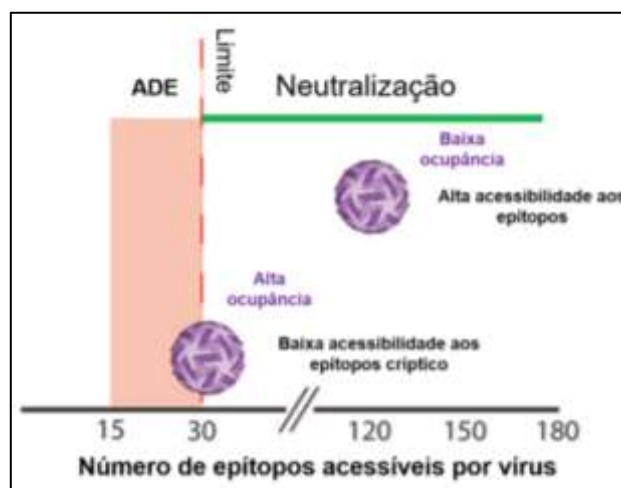
*Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), receptor de manose em macrófagos (MR – *manose receptor*), receptor CD14, proteínas induzidas por estresse HSP70 e HSP90, dentre outras (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015b). Após internalização, a vesícula contendo a partícula viral se funde rapidamente com o endossomo e em ambiente ácido (pH 5,8 – 6,6) ocorre mudanças conformacionais nos domínios da proteína de envelope acarretando na formação de trímeros, expondo assim o peptídeo de fusão do EDII que, por sua vez, se funde à membrana do endossomo liberando o capsídeo viral, (**Figura 2A**) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; KAUFMANN; ROSSMANN, 2011; SMIT et al., 2011; HEINZ; STIASNY, 2012).



**Figura 2. Proteína de envelope do DENV.** Representação esquemática da glicoproteína de E. (A) Diagrama de cores dos domínios da proteína de envelope: EDI, β-barril presente na região central da molécula (vermelho); EDII, domínio contendo o peptídeo de fusão (amarelo) e EDIII, porção C-terminal (azul). (B) Processo de fusão da proteína de envelope viral com a membrana do endossomo: (1) Homodímeros de E na superfície do DENV; (2) com o pH endossomal baixo, ocorre mudança conformacional nos domínios da proteína de envelope e interação com a membrana do endossomo; (3) formação do trímero; (4) hemifusão intermediária com a membrana do endossomo; (5) Abertura do poro de fusão e liberação do nucleocapsídeo para o citoplasma da célula hospedeira. Fonte: modificado de Heiz e Stiasny, 2012; Kaufmann e Rossman, 2011.

O mecanismo de neutralização por anticorpos DENV-específicos pode ocorrer por bloqueio da ligação da partícula viral com a célula hospedeira, pela interação dos anticorpos específicos a epítomos presentes no EDIII, ou à ligação a cadeias de carboidratos, importantes para ligação da partícula viral à determinados receptores celulares reconhecedores de carboidratos. Outra forma, seria o bloqueio do processo de mudança conformacional da proteína de envelope no endossomo levando exposição da região de fusão no EDII (PIERSON;

DIAMOND, 2008; FLIPSE; SMIT, 2015; SPROKHOLT; HELGERS; GEIJTENBEEK, 2018). A potência de neutralização está relacionada ao número requerido de anticorpos opsonizantes capazes de exceder sua estequiometria, para isto, dois fatores são determinantes. O primeiro fator está relacionado com a força de ligação (afinidade) dos anticorpos. Foi demonstrado que anticorpos com alta capacidade neutralizante apresentam baixa ocupância viral. Entretanto alguns anticorpos com alta afinidade ao epítipo demonstram capacidade de neutralização reduzida, necessitando de altas concentrações para observação do efeito, (**Figura 3**) (KLASSE; SATTENTAU, 2002; PIERSON; DIAMOND, 2008; PIERSON et al., 2009a; VAN DER SCHAAR; WILSCHUT; SMIT, 2009). O segundo fator pertinente a capacidade de neutralização dos anticorpos é a acessibilidade a epítipos quaternários e crípticos presentes na superfície do DENV. Os vírus são estruturas dinâmicas e apresentam mudanças na exposição de epítipos de superfície pelo fenômeno denominado “respiração viral”, que pode ser influenciado pelo estado de maturação da partícula viral, temperatura, pH e variação de sequência entre os flavivírus, (**Figura 3**) (PIERSON; DIAMOND, 2008; PIERSON et al., 2009b; KUHN et al., 2015; VANBLARGAN; GOO; PIERSON, 2016).



**Figura 3. Modelo de relação entre acessibilidade de epítipo e ocupância requerida para neutralização.** Os números de anticorpos ligados ao vírus são modulados pela afinidade do anticorpo e acessibilidade por epítipos. Anticorpos que se ligam em epítipos pouco acessíveis (crípticos) não são capazes de alcançar a estequiometria necessária, mesmo com alta afinidade precisam de alta ocupância para a neutralização. Em contrapartida anticorpos que ligam a epítipos acessíveis na partícula viral podem exceder seu limite estequiométrico para neutralização e apresentarem baixa ocupância. O ADE pode ocorrer quando a quantidade de anticorpos necessários não atinge o limiar estequiométrico necessário para a neutralização. Fonte: modificado de Vanblargan, Goo e Pierson, 2016.

Além da capacidade de neutralização devido à interação da região variável (Fab - *Fragment antigen binding*) com a partícula viral, anticorpos IgG podem desencadear respostas antivirais mediada por sua porção constante (Fc - *fragment crystallizable*) – região de ligação com receptores específicos presentes na superfície de células do sistema imunológico em

processo envolvendo a atividade conjunta com os componentes da resposta imunológica inata e que desencadeia outros mecanismos efetores. Os vírus opsonizados podem ativar a via clássica do sistema complemento por meio da interação com o componente C1q, C4b e C3b, promovendo a lise direta da partícula viral. Entretanto, devido ao pequeno tamanho de superfície dos *Flavivirus* esse mecanismo pode ser prejudicado (CHAN et al., 2015; GUILLIAMS et al., 2014). As partículas virais opsonizadas podem também promover a ativação de células fagocíticas (monócitos, macrófagos e Dc) por meio da interação da porção Fc dos anticorpos a receptores específicos presentes na superfície dessas células e levar à citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC - *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*). Nesse processo, anticorpos ligados a antígenos presentes na superfície de células infectadas promovem a ativação de células matadoras profissionais (NK - *natural killers*) que, por sua vez, liberam substâncias desencadeadoras de morte da célula infectada (CHAN et al., 2015).

Os anticorpos da classe IgG interagem com receptores Fc específicos ( $Fc\gamma R$  - *Fc gamma receptors*) do tipo I, divididos de acordo com sua afinidade e moléculas envolvidas no processo de resposta celular. Os receptores  $Fc\gamma R$  de alta afinidade ( $Fc\gamma RI$ ) ligam-se à IgG monomérica antes ou depois de sua ligação com o antígeno (imunocomplexos), enquanto os  $Fc\gamma R$  de baixa afinidade ( $Fc\gamma RIIA$  e  $Fc\gamma RIIIA$ ) ligam-se à IgG do imunocomplexo, mas não em IgG monomérica. Além disso, esses receptores são divididos de acordo com a capacidade de ativação ou inibição de respostas por células imunológicas (CHAN et al., 2015; GUILLIAMS et al., 2014).

Os receptores  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RIIA$  e  $Fc\gamma RIIIA$  requerem para a transdução do sinal uma porção sinalizadora ativatória rica em tirosina (ITAM - *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Nos receptores  $Fc\gamma RI$  e  $Fc\gamma RIIIA$ , o ITAM está localizado na membrana formando uma molécula acessória. No receptor para  $Fc\gamma RIIA$ , a porção ITAM está localizada em sua própria cadeia na porção intracelular. Os receptores  $Fc\gamma RIIB$  apresentam características inibidoras, pois possuem uma porção sinalizadora inibidora rica em tirosina (ITIM - *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), presente na sua cadeia na porção intracelular (CHAN et al., 2015; GUILLIAMS et al., 2014). Existe uma variação na expressão desses receptores de acordo com o tipo de células imunológicas. Monócitos e macrófagos expressam os receptores  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RIIA$ ,  $Fc\gamma RIIB$  e  $Fc\gamma RIIIA$ ; DCs expressam os receptores  $Fc\gamma RIIA$ ,  $Fc\gamma RIIB$ ; células NK expressam os receptores  $Fc\gamma RIIC$  e  $Fc\gamma RIIIA$ , enquanto os linfócitos B expressam  $Fc\gamma RIIB$  (BOURNAZOS; RAVETCH, 2017a; BOURNAZOS; RAVETCH,

2017b). Os receptores Fc $\gamma$ R tipo I apresentam várias funções nas células imunológicas auxiliando no processamento de imunocomplexos, modulação da polarização de macrófagos e modulação na apresentação de antígeno pelas DCs alterando o perfil de resposta imunológica adaptativa antígeno-específica (GUILLIAMS et al., 2014).

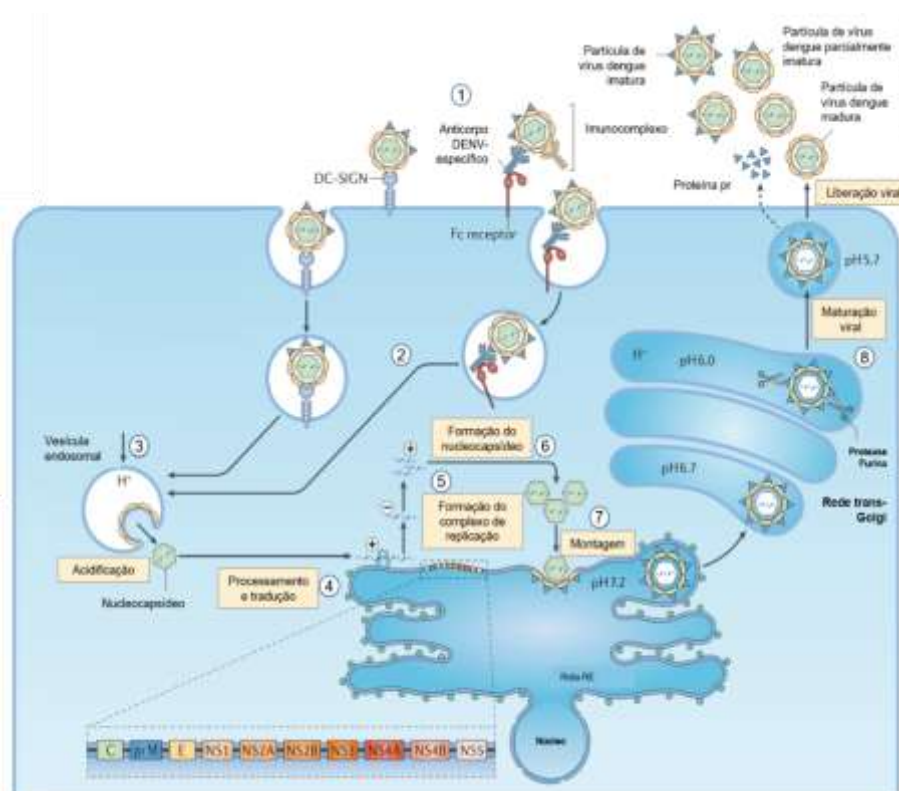
Os receptores Fc $\gamma$ R também podem ser do tipo II, pertencente à família de lectinas tipo C, e representados pelo CD23 e DC-SIGN, presentes principalmente em DCs e com capacidade de interagir com uma variedade de moléculas, incluindo carboidratos. O receptor com maior relevância em infecções pelo DENV é o receptor DC-SIGN presentes em DCs e podem promover a infecção de forma independente ou depende de anticorpos. O receptor DC-SIGN é composto por um domínio citoplasmático, domínio extracelular com 23 resíduos de aminoácidos repetidos e por um domínio C-terminal reconhecedor de carboidratos (CDR – *carbohydrate recognition domain*), sua ativação culmina na indução de várias rotas imunoestimuladoras nas DCs (POKIDYSHEVA et al., 2006; BOURNAZOS; RAVETCH, 2017b).

## 1.5 AUMENTO DA INFECÇÃO VIRAL MEDIADA POR ANTICORPOS

Em algumas respostas mediadas pelos receptores Fc $\gamma$ R do tipo 1 foi observado que anticorpos pré-existentes podem ser incapazes de neutralizar outro sorotipo de DENV, favorecendo o direcionamento do vírus para uma via que culmina na replicação viral intracelular nas células fagocíticas. Este fenômeno é conhecido como aumento da infecção viral mediada por anticorpos não neutralizantes (ADE – *antibody-dependent enhancement*), (**Figura 4**). A primeira constatação do fenômeno para o DENV foi descrita por Halstead e O'Rourke (1977), pela observação do aumento de infecção por DENV em monócitos e macrófagos primários na presença de anticorpos não neutralizantes. De acordo com a observação, uma segunda infecção por sorotipo diferente do vírus poderia ser exacerbada pela ligação de anticorpos gerados durante a primeira infecção. Esse processo facilitaria a entrada dos vírus em novas células do hospedeiro, proporcionando o aumento da carga viral, intensidade da resposta inflamatória e danos em células endoteliais que, em conjunto, causariam a forma hemorrágica da doença (HALSTEAD, 1977; WHITEHEAD et al., 2007; GUZMAN et al., 2010).

O fenômeno de ADE pode ocorrer quando a quantidade necessária de anticorpos E-específicos não atinge o limiar estequiométrico necessário para a neutralização viral, (**Figura 3**). As partículas de DENV maduras apresentam diferenças na organização da proteína de

envelope em comparação às partículas parcialmente ou totalmente imaturas apresentando proteína E ligada à proteína prM. Essa divergência estrutural pode prejudicar a acessibilidade a epítomos presentes na superfície da proteína de envelope, bem como, afetar o limiar estequiométrico dos anticorpos necessário para a neutralização (FLIPSE; WILSCHUT; SMIT, 2013). As partículas de DENV imaturas são incapazes de infectar as células imunológicas pela interação com receptores convencionais para infecção. Entretanto, foi demonstrado que a presença de anticorpos prM-específicos podem propiciar a entrada de partículas parcialmente imaturas na célula após interação com receptores Fc $\gamma$ R (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010; FLIPSE; WILSCHUT; SMIT, 2013; FLIPSE; SMIT, 2015). Dentro do endossomo celular pode ocorrer mudança conformacional nos heterodímeros prM/E, facilitando a clivagem da proteína prM na superfície das partículas imaturas. Desta forma, o DENV maduro com a proteína E trimérica pode interagir com a membrana do endossomo liberando o capsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira, (**Figura 4**) (FLIPSE; WILSCHUT; SMIT, 2013).



**Figura 4. Aumento da infecção mediada por receptores Fc $\gamma$ R.** Partículas virais parcialmente imaturas podem interagir com anticorpos anti-prM capazes de ligar em receptores Fc $\gamma$ R, ou através da ligação direta com receptores DC-SIGN (1) e, subsequentemente, serem internalizados (2). Com a diminuição do pH endossomal ocorre a mudança conformacional do heterodímero prM/E facilitando a clivagem da proteína prM pela furina, conseqüentemente ocorre a fusão da proteína de envelope viral com a membrana do endossomo e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (3). O RNA livre é traduzido no retículo endoplasmático (RE) para a formação de uma poliproteína contendo 3 proteínas estruturais e 7 proteínas não-estruturais (4). Ocorre a formação do complexo de replicação (5). Após o RNA replicado e incorporado ao nucleocapsídeo (6), para montagem das partículas virais (7). Os virions imaturos são transportados via complexo Golgi e após clivagem pela protease Furina (maturação) são liberados da célula hospedeira (8). Fonte: modificado de Screaton et al., 2015.

## 1.6 IMPLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA DENV

Os mecanismos para indução de resposta protetora contra a dengue ainda não estão bem esclarecidos. Admite-se que o correlato de proteção para infecções desencadeadas pelo DENV seja a indução de resposta imunológicas representada por altos níveis de anticorpos neutralizantes. Entretanto, atualmente existem observações consistentes sobre a importância da participação da resposta imunológica celular no mecanismo de proteção contra infecções causadas pelo vírus. Sendo assim, preconiza-se que uma vacina eficaz e segura para o controle da dengue deve ser capaz de induzir anticorpos neutralizantes e expansão de linfócitos T específicos capazes de impedir a infecção pelos quatro sorotipos virais e principalmente sem promover o fenômeno de ADE (GUZMAN et al., 2016; WEN; SHRESTA, 2017).

Além dos estudos relacionados aos antígenos ideais para o desenvolvimento de vacinas contra dengue, algumas substâncias empregadas são essenciais para estimular eficientemente o sistema imunológico contra o vírus. Essas substâncias, adjuvantes, podem amplificar, modular e prolongar a imunogenicidade intrínseca de antígenos alvos (coadministrados, conjugados quimicamente ou fusionados geneticamente) melhorando a eficácia das vacinas (PASSOLD; FERREIRA; ZANETTI, 2004; VANUSA et al., 2011).

A toxina termo-lábil (LT - *heat labile toxin*) da *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC - *enterotoxigenic Escherichia coli*) apresenta uma subunidade A de 27 kDa com atividade enzimática de adenosina difosfato ribosilação (ADP - *adenosine diphosphate*) e uma subunidade B composta por cinco polipeptídios idênticos (11,5 kDa) estruturados em forma de um anel pentamérico e responsável pela ligação a receptores presentes na superfície das células hospedeiras (FAN et al., 2000; LENCER; SASLOWSKY, 2005). Além de apresentar um importante papel na patogenicidade de ETEC, a LT e seus mutantes ou derivados atóxicos são capazes de induzir potentes respostas imunológicas humorais e celulares antígeno-específica após a administração por diferentes vias (parenteral, transcutânea e de mucosa). Foi descrito que o uso de LTs como adjuvante promove ativação e modulação de linfócitos B secretores de anticorpos IgG séricos e IgA secretado em mucosas associados com a presença de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> secretores de citocinas, como INF- $\gamma$ , IL-4 IL-5, IL-6 e/ou IL10, e promovem a maturação de DCs proporcionando um aumento na capacidade de apresentação de antígeno via expressão de moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e produção de IL-1 $\beta$  via ativação dos componentes do inflamassoma culminando no desenvolvimento de células Th17 (FREYTAG; CLEMENTS, 2005; BRERETON et al., 2011; BRAGA et al., 2014; BATISTA et al., 2017). Em estudos relacionados à resposta imunológica humoral induzida pela



administração de LT e seus mutantes ou derivados atóxicos, a investigação da potência e modulação de resposta é limitada a determinação dos títulos e subclasses de anticorpos antígeno-específicos (HAAN et al., 1999; FRASER et al., 2003). Entretanto, recentemente foi demonstrado que administração das LTs com adjuvantes vacinais, além de potencializar a resposta de anticorpos contra o antígeno, modulou o espectro de reconhecimento de epítomos e induziu anticorpos com maior capacidade de neutralização, reconhecedores de epítomos importantes para resposta contra o patógeno (BATISTA et al., 2017).

O uso de peptídeos sintéticos tem sido amplamente utilizados em abordagens terapêuticas contra infecções virais, como influenza, HIV e hepatites (SKALICKOVA et al., 2015). Poucos trabalhos buscam investigar o uso de peptídeos no tratamento contra a dengue. Em estudo realizado por Schmidt e colaboradores (2010), peptídeos para a região hidrofóbica da proteína de envelope determinados a partir de análises *in silico*, foram capazes de inibir a infecção pelo DENV após interação com o domínio EDII durante a formação dos trimeros da proteína E, bloqueando a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo da célula hospedeira. De forma semelhante, Alhood e colaboradores (2016) demonstraram que peptídeos alvos para o domínio EDIII, também determinados por análises *in silico*, são capazes de inibir a ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira, por meio de alterações conformacionais na proteína de envelope do DENV2. De fato, poucos trabalhos buscam desenvolver estratégias para identificação de epítomos responsáveis pela indução de anticorpos policlonais neutralizantes sem promover exacerbação da infecção viral em células que expressam receptores FcγR (STIASNY et al., 2006; LEWIS et al., 2009; WAHALA et al., 2009; DE ALWIS et al., 2012; CHAICHANA et al., 2014).

Sabe-se que a resposta humoral gerada contra infecções causadas pelo DENV envolve a expansão de linfócitos B produtores de anticorpos com vários tipos de especificidade, afinidade a epítomos que, juntamente com outras capacidades funcionais, caracterizam a atividade neutralizante contra o vírus. A compreensão dos mecanismos envolvidos na capacidade neutralizantes dos anticorpos é atualmente estudada principalmente por meio da utilização de anticorpos monoclonais (PIERSON et al., 2009b; DE ALWIS et al., 2012; WILLIAMS et al., 2013). Entretanto, a atividade conjunta dos anticorpos em uma resposta policlonal protetora durante o processo infeccioso ou após vacinação ainda não é bem compreendida.

De fato, uma das principais dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina é a falta de conhecimento sobre os principais epítomos alvo para anticorpos neutralizantes na partícula

viral. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo maior a caracterização de epítomos presentes na proteína E do DENV em busca de alvos antigênicos para geração de uma resposta humoral protetora sem causar o fenômeno de ADE. O conhecimento gerado a partir dessa pesquisa deverá permitir que abordagens mais racionais sejam aplicadas no desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra a dengue.

## **2 OBJETIVO**

O presente projeto teve como objetivo principal identificar epítomos presentes na superfície do DENV2 capazes de gerar anticorpos neutralizantes sem promover a amplificação viral frente a células que expressem o receptor Fc $\gamma$ R. Para esse intuito, utilizamos os adjuvantes LT e seus derivados atóxicos na modulação de anticorpos neutralizantes específicos a epítomos presentes em proteínas recombinantes correspondentes aos domínios I, II (EDI/II) e III (EDIII) da proteína de envelope do DENV2. Com tais ferramentas e abordagens experimentais buscamos identificar alvos antigênicos sem os riscos inerentes ao fenômeno da ADE.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS E ADJUVANTES VACINAIS

##### 3.1.1 Proteína EDI/II de DENV2

###### 3.1.1.1 Clonagem da sequência genética correspondente ao domínio I e II da proteína E (edi/II) em vetor de expressão pET28a

O gene sintético, correspondente à sequência genética que codifica para a proteína EDI/II, foi obtido comercialmente em vetor pUC57-EI/II (GenScript). Inicialmente, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes foram transformadas com o vetor pUC57-EI/II e posteriormente foram crescidas em placas de ágar Luria Bertani (LB) contendo antibiótico canamicina (50  $\mu$ g/mL). Após processo de extração de DNA, o plasmídeo pUC57-EI/II foi submetido a análise do perfil de digestão gerados com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (Fermentas-Thermo Scientific) em gel de agarose 0,8%. O inserto liberado foi purificado do gel de agarose por kit (GE Healthcare Illustra GFX) e o produto obtido foi inserido no vetor de expressão pET28a (Novagen) previamente digerido com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. As *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes foram transformadas com o produto de ligação e a confirmação dos clones obtidos foi realizada por digestão do plasmídeo recombinante com as endonucleases acima citadas. O plasmídeo recombinante contendo a sequência *edi/II* foi denominado pET28a-EID/II e utilizado na transformação de células *E. coli* BL21 DE03 RIL e RP competentes para posteriormente avaliação da expressão da proteína EDI/II recombinante.

###### 3.1.1.2 Teste de expressão da proteína EDI/II recombinante em *E. coli* BL21 DE03 RIL ou RP

Uma alíquota do estoque congelado de *E. coli* BL21 DE03 RIL ou RP contendo o plasmídeo pET28a-EDI/II foi inoculada em 5 mL de caldo LB contendo antibiótico canamicina (50  $\mu$ g/mL), acondicionada em um tubo de ensaio e incubado a 37°C, sob agitação de 200 rpm em agitador orbital por aproximadamente 18 h. Essa cultura foi utilizada como pré-inóculo com diluição inicial de 1/100 para 150 mL de meio LB distribuídos em 3 erlenmeyers. O inóculo final foi incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até a fase de crescimento exponencial ( $DO_{600nm}$  = 0,5 - 0,6), quando foi acrescentado à cultura o indutor isopropil  $\beta$ -D-1 tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,5 mM. A cultura induzida foi mantida

à temperatura de 18°C ou 37°C sob agitação de 200 rpm em diferentes períodos de incubação (2, 4 ou 6 h).

Alíquotas foram coletadas antes e após a indução nos diferentes tempos de incubação e aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% para análise da presença de proteína EDI/II. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 15 min. a 4°C. A massa bacteriana obtida foi ressuspensa em 5 mL de tampão A (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, Glicerol 20%, pH 8,5), o extrato bacteriano foi submetido à lise em aparelho sonicador (Branson), e o lisado resultante foi centrifugado a 10000 x g por 15 min a 4°C, resultando na separação da fração solúvel (sobrenadante) e da fração insolúvel (massa de células). Alíquotas de 15 µL de cada fração em diferentes períodos de incubação e temperatura de indução foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% e utilizadas em ensaios de *Western blotting* seguido de imunodeteção.

### 3.1.1.3 Purificação da proteína EDI/II presente na fração solúvel proveniente da expressão em *E. coli* BL21 DE03 RIL

A massa bacteriana obtida foi ressuspensa em 400 mL de tampão A (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, Glicerol 20%, pH 8,5) e submetidas a lise por homogeneização à alta pressão (600 psi) utilizando o aparelho homogeneizador (APLAB 10 – Arte peças) durante 10 min. O homogenato obtido foi clarificado por centrifugação a 10.000 x g por 1 h a 4°C e filtrado em pré-filtros de lã de vidro (Millipore) e após em filtros de 0,22 µm (Millipore). A amostra foi aplicada em coluna His-Trap HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) em função da ligação da cauda de histidina da proteína EDI/II à resina de níquel. O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) com tampão A. A amostra (500 mL) foi aplicada à coluna em um fluxo baixo de 0,5 mL/min, em seguida, a coluna foi lavada com 100 mL de tampão A e foi iniciado o processo de eluição das proteínas adsorvidas à coluna sob utilização de diferentes concentrações de imidazol (100 mM, 200 mM, 400 mM e 600 mM) a partir da mistura do tampão A com o tampão B (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, Imidazol 1 M, 20% de glicerol, pH 8,5). A coluna foi regenerada com 5 vc de tampão B e lavada com mais 5 vc de tampão A, 5 vc de água mili-Q e 5 vc com solução contendo 20% de etanol. As amostras correspondentes ao pico obtido foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%.

#### *3.1.1.4 Purificação da proteína EDI/II proveniente da expressão em E. coli BL21 DE03 RIL por meio de solubilização dos corpúsculos de inclusão em tampão com ureia*

A massa bacteriana obtida foi ressuspensa em 400 mL de em tampão A (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, Glicerol 20%, pH 8,5) e lisadas por homogeneização à alta pressão (600 psi) utilizando o aparelho homogeneizador citado acima por 10 min. O homogenato obtido foi clarificado por centrifugação a 10.000 x g por 1 h a 4°C. A amostra decantada, contendo proteína EDI/II insolúvel em forma de corpúsculos de inclusão, foi submetida a condição desnaturante após adição de 10 mL/L de cultura do tampão C (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, pH 8,5, ureia 8 M) e incubada por 18 h a 4°C sob agitação. O extrato resultante da solubilização dos corpúsculos de inclusão foi centrifugado a 9000 x g por 40 min a 4°C. Em seguida, para renaturação da proteína EDI/II, 3 mL de extrato solubilizado em tampão C foram submetidos à diluição pulsada com auxílio de bomba peristáltica em velocidade de rotação suficientes para gotejamento de 250 µL/min em 2 L de tampão A sob agitação constante de 60 rpm/min. Após a renaturação, a amostra foi novamente centrifugada e filtrada em pré-filtro de lã de vidro (Millipore) e posteriormente em filtros de 0,22 µm (Millipore).

A amostra foi aplicada em coluna His-Trap HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) em função da ligação da cauda de histidina da proteína recombinante à resina de níquel. O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 5 vc com tampão A. A amostra (2 L) foi aplicada à coluna em um fluxo de 2 mL/min, em seguida a coluna foi lavada novamente com 100 mL de tampão A e foi iniciado o processo de eluição das proteínas adsorvidas à coluna sob utilização de um gradiente linear de imidazol (0 a 100 %) a partir da mistura do tampão A com o tampão B (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, Imidazol 1 M, 20% de glicerol, pH 8,5). A coluna foi regenerada com 5 vc de tampão B e lavada com mais 5 vc de tampão A, 5 vc de água mili-Q e 5 vc com solução contendo 20% de etanol. Amostras correspondentes aos picos obtidos foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%.

#### *3.1.1.5 Purificação da proteína EDI/II por solubilização dos corpúsculos de inclusão com alta pressão hidrostática*

O procedimento de solubilização dos corpúsculos de inclusão foi realizado de acordo com Malvasi e colaboradores (2011). A expressão da proteína EDI/II foi realizada como descrito anteriormente. A massa bacteriana obtida foi ressuspensa em 400 mL de em tampão A (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, Glicerol 20%, pH 8,5). As células foram lisadas por

homogeneização a alta pressão (600 psi) utilizando o aparelho homogeneizador durante 10 min. O homogenato obtido foi clarificado por centrifugação a 10.000 x g por 1 h a 4°C. A amostra decantada, contendo proteína EDI/II insolúvel em corpúsculos de inclusão, ressuspenso em 25 mL de tampão A 1 (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 5 mM, deoxicolato de sódio 0,1%, pH 8,5), posteriormente a suspensão foi sonicada por 30 segundos em aparelho sonicador (Branson). Em seguida, a suspensão com os corpúsculos de inclusão foi centrifugada a 8000 rpm por 10 min a 4°C, repetindo o procedimento de lavagem por mais 3 vezes. Os corpúsculos foram lavados duas vezes em 25 mL de tampão A 2 (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 8,5) e ressuspenso em 10 mL de tampão A2. Para determinação da pureza dos corpúsculos de inclusão, foi realizada a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda  $\lambda$  350 nm, posteriormente, a suspensão foi dividida em frações de 1 mL e armazenadas a -20°C.

Para a solubilização, os corpúsculos lavados foram diluídos em tampão de solubilização (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM, pH 8,5) acrescido dos aditivos: hidrocloreto de guanidina 1M, arginina 0,5 M, glutatona 5 mM, de modo a obter suspensões com  $DO_{350nm}$  de 1,0. Amostras de 1 mL foram colocadas em saquinhos plásticos selados, posteriormente, introduzidos em um único saco plástico maior e selado a vácuo. Os sacos plásticos foram então colocados em um vaso de pressão (R4-6-40, High Pressure Equipment) e submersos em óleo. O vaso foi fechado e pressurizado a 2,4 kbar por 16 h utilizando um compressor de ar ligado a uma bomba (PS-50, High Pressure Equipment) capaz de injetar óleo no vaso de pressão a altas pressões (MALAVASI et al., 2011).

Após a decompressão, as amostras foram retiradas dos sacos plásticos e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C, para a remoção de agregados insolúveis. Os sobrenadantes foram dialisados em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 e novamente centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4°C, para a remoção de agregados insolúveis que possam ter se formado durante o processo de diálise. Posteriormente as frações solúveis foram purificadas como descrito anteriormente. A amostra solúvel foi aplicada em coluna His-Trap HP 1 mL (GE Healthcare Life Sciences) em função da ligação da cauda de histidina da proteína recombinante à resina de níquel. O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) com tampão A. A amostra (250 mL) foi aplicada à coluna em um fluxo de 1 mL/min, em seguida a coluna foi lavada novamente com 100 mL de tampão A e foi iniciado o processo de eluição das proteínas adsorvidas à coluna sob utilização de diferentes concentrações de imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM e 600 mM) a partir da mistura do tampão A com o tampão B (Tris-

HCl 0,05 M, NaCl 0,2 M, Imidazol 1 M, 20% de glicerol, pH 8,5). A coluna foi regenerada com 5 vc de tampão B e lavada com mais 5 vc de tampão A, 5 vc de água mili-Q e 5 vc com solução contendo 20% de etanol. Amostras correspondentes aos picos obtidos foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%.

### *3.1.1.6 Purificação da proteína EDI/II por cromatografia de exclusão de tamanho*

As frações da proteína EDI/II purificadas em coluna por afinidade ao níquel foram unidas e a amostra correspondente foi aplicada em coluna Hitrap 26/60 SHR 320 mL (GE Healthcare Life Sciences) em função da separação por tamanho das proteínas. O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 1,5 vc com tampão A. A amostra (5 mL) foi aplicada à coluna em um fluxo de 1 mL/min, em seguida foi iniciado o processo de eluição das proteínas pela aplicação de 2 vc de tampão A em um fluxo de 1 mL/min. A coluna foi lavada com 2 vc de água mili-Q e 5 vc com solução contendo 20% de etanol. Amostras correspondentes aos picos obtidos foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%.

### *3.1.1.7 Análise de tamanho e distribuição das partículas da proteína recombinante EDI/II por Espalhamento de Luz Dinâmico (dynamic light scattering – DLS)*

Para avaliação dos tamanhos e dispersão das partículas de EDI/II obtida por solubilização de corpúsculos de inclusão por alta pressão ou desnaturação com ureia, procedente da expressão em *E. coli* BL21DE03 RIL, utilizamos equipamento Zetasizer Nano Z (Malvern) presente no laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do pesquisador Dr. Koiti Araki localizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Essa metodologia proporciona analisar a velocidade do movimento browniano das partículas e assim, o tamanho das partículas usando a relação de Stokes-Einstein, assim, proteínas que apresentem problemas de instabilidade e agregação são facilmente detectadas por essa técnica. As amostras de proteínas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 min. para retirada de qualquer material suspenso. A proteína EDI/II foi analisada utilizando 1 mL da suspensão da EDI/II (0,53 µg/µL) obtida por solubilização dos corpúsculos à alta pressão ou 1 mL da proteína EDI/II (0,67 µg/µL) purificada após solubilização dos corpúsculos com ureia. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo de uso do equipamento, utilizando água como



dispersante a 25°C. Os diâmetros das partículas da proteína EDI/II foram determinados em nanômetros e correspondem à média aritmética de três medições independentes.

### 3.1.1.8 Análise da estabilidade da proteína EDI/II por ensaio de deslocamento térmico (*thermoshift*)

A análise de estabilidade da proteína EDI/II, purificada a partir da expressão em *E. coli* BL21 DE03 RIL, foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Andréa Balan do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. A técnica de deslocamento térmico é utilizada para a definição da temperatura de desenovelamento ( $T_m$ ) de proteínas em diferentes soluções, assumindo como resultado que a proteína se encontra melhor enovelada em condições onde ocorre aumento da  $T_m$ . O princípio é baseado na interação do corante *Sypro Orange* com as regiões hidrofóbicas à medida que a temperatura vai aumentando (desenovelamento e exposição das regiões hidrofóbicas) e, conseqüente emissão de sinal. A proteína foi incubada em diferentes tampões com acréscimo do corante *Sypro Orange* e submetidas a um aumento gradativo de temperatura (20°C até 90°C) com 30 segundos de permanência em cada temperatura e envolveu a otimização de 2 fatores: concentração ideal do corante *Sypro Orange* e concentração da proteína recombinante. A **tabela 1** apresenta as condições testadas.

**Tabela 1.** Teste de diferentes concentrações de proteínas com diferentes concentrações corante *sypro orange*.

Proteína testada	Concentração de proteína	Concentração de Sypro Orange			Volume final
		2.5x	5x	10x	
EDI/II purificada	2,5 $\mu$ M	2.5x	5x	10x	25 $\mu$ L
	5,0 $\mu$ M	2.5x	5x	10x	25 $\mu$ L
	10,0 $\mu$ M	2.5x	5x	10x	25 $\mu$ L

## 3.1.2 Obtenção e avaliação da atividade biológica da proteína recombinante EDIII de DENV2

### 3.1.2.1 Expressão e purificação da proteína EDIII

O plasmídeo pED1D2 contendo o gene que codifica para a glicoproteína de envelope de DENV2 (NGC – *New Guinea C*), foi gentilmente cedido pela Dra. Ada Maria de B. Alves,

Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brasil) e usado como molde para as reações de PCR (AZEVEDO et al., 2011). As sequências usadas nas reações de PCR foram oligonucleotídeo iniciador senso 5'-ACATGCGAGGATCCGGAATGTCATACTCTAT-3' (a sequência sublinhada indica o sítio de restrição para a enzima *Bam*HI) e anti-senso 5'-GCCTTCTACTCGAGTTACGATAGAACTTCCTTTCTTA-3' (a sequência sublinhada indica o sítio de restrição da enzima *Xho*I) respectivamente. O produto da reação de PCR apresentando a sequência genica da *edIII* foi inserido no vetor de expressão pET28a (Novagen), gerando o plasmídeo pDEDIII.

Uma alíquota do estoque congelado da linhagem recombinante *E. coli* BL21 DE03 contendo o plasmídeo que codifica para proteína pDEDIII foi inoculada em 50 mL de caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL) e o pré-inóculo foi acondicionado em um erlenmeyer de 250 mL e incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm em agitador orbital por aproximadamente 6 h. A cultura foi utilizada como pré-inóculo com diluição inicial de 1/100 para 4 L de LB, que foram distribuídos em 4 erlenmeyers e incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm até a fase de crescimento exponencial ( $DO_{600nm} = 0,5 - 0,6$ ), quando foi acrescentado à cultura o indutor IPTG na concentração final de 0,5 mM. A cultura induzida foi mantida sob as condições descritas anteriormente por mais 4 h. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min a 4°C. A massa bacteriana obtida foi ressuspensa em 400 mL de tampão A (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, 20% de glicerol, pH 6,5). As células foram lisadas por homogeneização à alta pressão (600 psi) utilizando o aparelho homogeneizador durante 10 min. O homogenato obtido foi clarificado por centrifugação a 10000 x g por 1 h a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a amostra decantada, contendo proteína EIII insolúvel em corpúsculo de inclusão, submetida a uma condição desnaturante com a adição de 10 mL/L de cultura do tampão com ureia (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 6,5, ureia 8 M) e incubada por 18 h a 4°C. O extrato resultante da solubilização dos corpúsculos de inclusão foi centrifugado a 9000 x g por 40 min a 4°C. Para a renaturação da proteína EDIII, 10 mL de extrato solubilizado em tampão desnaturante foram submetidos à diluição pulsada com auxílio de bomba peristáltica em velocidade de rotação suficiente para gotejamento de 250 µL/min em 2 L de tampão A (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, 20% de glicerol, pH 6,5) sob agitação constante de 60 rpm. Após renaturação, a amostra foi novamente centrifugada e filtrada em pré-filtro de 0,22 µm (Millipore).

A amostra foi aplicada em coluna His-Trap HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences). O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – Avant (GE Healthcare Life

Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 5 vc com tampão A. A amostra (2 L) foi aplicada à coluna em um fluxo de 2 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada novamente com 100 mL de tampão A e foi iniciado o processo de eluição das proteínas adsorvidas à coluna sob utilização de um gradiente linear de imidazol (0 a 100 %) a partir da mistura do tampão A com o tampão B (fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, 1M de imidazol, 20% de glicerol, pH 6,5). A coluna foi regenerada com 5 vc de tampão B e lavada com mais 5 vc de tampão A, 5 vc de água mili-Q e 5 vc com solução contendo 20% de etanol. Amostras correspondentes aos picos obtidos foram aplicadas em SDS-PAGE 17,5% e as frações escolhidas foram concentradas em filtros Amicon Ultra-15 3000 MWCO (Millipore) em tampão A para a retirada do imidazol. A amostra final com EDIII purificada foi quantificada pela medida de absorbância  $\lambda$  492nm em espectrofotômetro (Gene Quant spectrophotomer GE Amershan Biosciences) (EDELHOCH, 1967).

### 3.1.2.2 *Análise da atividade biológica da proteína EDIII em células Vero*

Este ensaio foi realizado de acordo com Amorim e colaboradores (2012). Células epiteliais isolada do rim de macaco verde africano (linhagem Vero ATCC), que expressam receptores para a proteína EDIII, foram cultivadas com meio MEM (Vitrocell Embriolife) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Posteriormente, 1 x 10<sup>5</sup> células/mL foram incubadas com 100 µg/mL da proteína recombinante EDIII em meio MEM a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 30 min. Após lavagem com tampão PBS acrescido com 2% de SFB, as células Vero foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) por 10 min. Em seguida, as células foram marcadas com soro anti-EDIII por 1 h e após incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Invitrogen) por 1 h. As células Vero marcadas com FITC foram detectadas por citometria de fluxo com uso do aparelho BD LSRFortessa (BD Biosciences), os resultados foram analisados usando o programa FlowJo v10.

### 3.1.3 **Obtenção e avaliação da atividade biológica do DENV2 purificados**

#### 3.1.3.1 *Purificação do DENV2 New Guinea C*

O vírus DENV2 (NGC GeneBank: AHG97599.1) utilizado no ensaio foi gentilmente cedido pela pesquisadora Dra. Laura Helena Vera Gonzales Gil da Fundação Oswaldo Cruz em

Recife – PE. A metodologia de propagação viral foi realizada de acordo com Poggianella e colaboradores (2015), e empregou células da larva de *Aedes albopictus*, conhecida como C636 (ATCC). As células C636 infectadas foram cultivadas em meio Leibovitz-15 (Vitrocell Embriolife) suplementado com 2% de soro fetal bovino (Gibco) por 7 dias. Posteriormente o sobrenadante de cultura foi coletado, centrifugado a 300 x g por 5 min e dividido em alíquotas armazenadas em freezer -80°C. Para a purificação, uma alíquota do sobrenadante de cultura foi ressuspensa em 10 mL de tampão A (fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2). A amostra foi aplicada em coluna trocadora aniônica fraca Hi Trap ANX FF 1 mL (GE Healthcare Life Sciences). O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 5 vc de tampão A. A amostra (10 mL) foi aplicada à coluna em um fluxo de 1 mL/min e, em seguida a coluna foi lavada novamente com 10 mL de tampão A. O processo de eluição do vírus adsorvidos à coluna foi iniciado com 100% de tampão B (fosfato de sódio 0,6 M, pH 7,2). A coluna foi regenerada com 5 vc de tampão B e lavada com mais 5 vc de tampão A, seguido por 5 vc de água mili-Q. O equipamento bem como a coluna foram sanitizados com NaOH 0,5 M, lavados com água mili-Q e solução contendo 20% de etanol. Amostras correspondentes ao pico obtido foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 12,5% corado com solução de prata ou *Comassie blue*. A suspensão viral foi utilizada em ensaios de imunização e ELISA.

### 3.1.3.2 Ensaio de Imunofluorescência indireta em células Vero infectadas com vírus Dengue 2 purificado

O vírus DENV2 NCG purificado foi utilizado no mesmo dia do seu preparo para infectar células Vero (ATCC) com 90% de confluência. As células infectadas foram mantidas em meio MEM (Vitrocell Embriolife) suplementado com 2% de soro fetal bovino e incubadas por 48 h em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o meio foi descartado e os poços foram lavados 2 vezes com 100 µL de tampão PBS pH 7,2. Posteriormente foram adicionados 100 µL/poço de metanol gelado (-20°C) e a placa foi incubada por 10 min em capela, até o metanol secar totalmente. Em seguida, foi adicionado 50 µL/poço de anticorpo policlonal anti-vírus (1/500) em tampão PBS pH 7,2, e incubado por 1 h a 37°C em câmara úmida. Após a primeira marcação, a placa foi lavada 3 vezes com tampão PBS pH 7,2 e foi adicionado o anticorpo anti-IgG mouse conjugado ao FITC (BD Biosciences) (1/200) em tampão PBS pH 7,2, e incubado por 1 h a 37°C em câmara úmida. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS pH 7,2 e foi adicionado 50 µL/poço do corante para núcleo Hoechst 33342

(Life Technologies) (1/2000) em tampão PBS pH 7,2, após lavagem em tampão PBS pH 7,2, foi adicionado 50 µL/poço de glicerina tamponada (glicerina, tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,5). A visualização foi realizada em microscópio de imunofluorescência Evos FL (Thermo Fisher Scientific).

### 3.1.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão do vírus Dengue 2 purificado

O vírus DENV2 purificado foi submetido à análise de pureza por visualização em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Esse procedimento foi realizado no Centro Nacional de Pesquisas em Energias e Materiais (CNPEM) em Campinas - SP, especificamente no Laboratório Nacional de Nanobiotecnologia (LNNano), com colaboração do técnico especialista Dr. Alexandre Cassago. Primeiramente, 1 µl de cada amostra foi aplicada em uma grade de carbono para adsorção, após drenagem do excesso com papel filtro, as grades foram lavadas com 5 µl de água ultra-pura, secadas com papel filtro e lavadas por mais 2 vezes. Após a grade foi corada com 1 µl do corante acetato de uranila a 1% e incubada por 1 min. Repetimos o ciclo de lavagem e secagem com papel filtro, e em seguida, as grades foram levadas para observação em microscópio eletrônico de transmissão TEM-MS (JEOL-2100).

## 3.1.4 Purificação e caracterização da atividade biológica dos adjuvantes LT e seus derivados LT-K63 e LTB

### 3.1.4.1 Clonagem do adjuvante LTB

A amplificação do gene *eltB* que codifica para a subunidade B da proteína LT (LTB) de da linhagem de referência H10407 de *Escherichia coli* enterotoxigênica (*genbank* GI: 408994) foi realizada através da reação PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores senso 5'-CAGAAGGCGGAATGACATATGAATAA-3' (sequência sublinhada corresponde ao sítio de restrição da enzima *NdeI*) e anti-senso 5'-TTAAAAGCATGTCTCTCGAGAGAACC-3' (sequência sublinhada corresponde ao sítio de restrição da enzima *XhoI*). O produto da reação de PCR foi inserido dentro dos sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *XhoI* do vetor de expressão pET22b (Novagen-Merck Bioscience), gerando o plasmídeo pET22bLTB, utilizado na transformação de células de *E. coli* BL21 DE03 pLys competentes para expressão da proteína LTB.

### 3.1.4.2 Expressão e purificação dos adjuvantes LT, LT-K63 e LTB

As proteínas LT, LT-K63 e LTB foram obtidas de linhagens de *E. coli* albergando o plasmídeo pML19 ou pET22bLTB. A purificação das proteínas LT e LT-K63 foi realizada de acordo com Lasaro e colaboradores (2009) e Rodrigues e colaboradores (2011), já a expressão da proteína LTB foi realizada de acordo com Maeda e colaboradores (2017). Uma alíquota do estoque congelado da linhagem recombinante contendo o plasmídeo que codifica para proteína LT, LT-K63 ou LTB foi inoculada em 50 mL de caldo TB (*Terrific Broth*) contendo ampicilina (100 µg/mL) e o pré-inóculo foi acondicionado em um erlenmeyer de 250 mL e incubado a 37 °C, sob agitação de 200 rpm em agitador orbital por aproximadamente 18 h. A cultura foi utilizada como pré-inóculo com diluição inicial de 1/100 para 3 L de meio TB distribuídos em 4 erlenmeyers. A produção das proteínas LT ou LT-K63 foi realizada por expressão constitutiva do gene *eltAB* em culturas de *E. coli* albergando o pML19 em agitação de 230 rpm, em agitador orbital, na temperatura de 37°C por aproximadamente 22 h (LASARO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011). Para a expressão da proteína LTB foi realizado a indução com 0,75 mM de IPTG do gene *eltB* em culturas de *E. coli* contendo o pET22bLTB por sob agitação a 200 rpm, em agitador orbital, por 6 h na temperatura de 37°C (MAEDA et al., 2017). Após esse período de incubação a cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min a 4°C. A massa bacteriana obtida foi ressuspensa em 400 mL de tampão TEAN sem sal (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,001 M, NaN<sub>3</sub> 0,003 M, pH 7,4). O extrato bacteriano passou por lise a alta pressão (600 psi) utilizando o aparelho homogeneizador (APLAB 10 – Arte peças) durante 2 min. O homogenato obtido foi clarificado por centrifugação a 10000 x g por 1 h a 4°C. O sobrenadante foi filtrado com pré-filtro de 0,22 µm da marca Millipore. A amostra obtida ao final desse processo denominou-se homogenato clarificado.

A proteína LT, LT-K63 ou LTB foi purificada por cromatografia de afinidade em resina Galactose-gel (Pierce, Immobilized D-Galactose Gel) empacotada em coluna XK 16/20 da Amersham Biosciences (1,6 cm Ø e 20 cm altura). O processo de purificação automatizado foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia). A coluna foi previamente equilibrada com 5 vc de tampão TEAN com sal (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,001 M, NaN<sub>3</sub> 0,003 M, NaCl 0,2 M, pH 7,4). O homogenato clarificado (500 mL) foi aplicado à coluna em um fluxo de 0,4 mL/min. A coluna foi lavada novamente com 5 vc de tampão TEAN com sal e foi iniciada a eluição das proteínas adsorvidas à coluna após injeção de 100% de TEAN com sal acrescido de 0,3 M de D-galactose. A coluna foi regenerada com 5 vc de solução contendo ureia 6 M, lavada com 5 vc de água mili-Q e 5 vc de água contendo 20% de etanol. Amostra correspondente ao

pico obtido para LT, LT-K63 ou LTB foi dialisada e concentrada em filtros Amicon Ultra-15 30000 MWCO (Millipore) em tampão TEAN com sal para a retirada do eluente D-galactose. A análise de pureza da proteína foi observada em gel de poliacrilamida a 17,5%. A quantificação da concentração de LT, LT-K63 ou LTB foi analisada pela medida de absorvância em espectrofotômetro (Gene Quant spectrophotometer GE Amershan Biosciences), segundo procedimento descrito por Edelhoich (1967).

#### 3.1.4.3 Avaliação da capacidade de ligação dos adjuvantes LT, LT-K63 e LTB ao gangliosídeo GM1 por ELISA

Para avaliar a ligação dos adjuvantes LT, LT-K63 e LTB ao monosialotetrahexosilgangliosídeo (GM1 – *monosialotetrahexosylganglioside*), realizamos o ensaio GM1-ELISA de acordo com Lasaro e colaboradores (2006). Poços alternados de uma microplaca de poliestireno Polysorp (Nunc) foram sensibilizados com gangliosídeo GM1 (1 µg/mL) (Sigma Aldrich) em tampão PBS (pH 7,4) e incubados à temperatura ambiente em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS 1x contendo 0,05% de Tween-20 (PBST). Após a lavagem, foi feito o bloqueio adicionando-se 200 µL da solução BSA a 0,1% em PBST, e as placas foram incubadas durante 2 h a 37°C. Após novo ciclo de lavagem (3x), 100 µL da solução contendo LT, LT-K63 ou LTB foram adicionados aos poços em duplicata. Depois de um novo ciclo de lavagem (3x), foram adicionados 100 µL do soro anti-LT (1/1.000) e subsequentemente anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase (HRP) (Sigma Aldrich) na diluição 1/3000) diluídos em solução de BSA a 0,1% em PBST. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e a revelação foi realizada com 100 µL/poço da solução com substrato OPD (ortofenilenodiamina) por 10 min a temperatura ambiente e a reação foi interrompida com 50 µL por poço de ácido sulfúrico a 1 M. A leitura da densidade óptica foi realizada a  $\lambda_{492nm}$  em leitor de placa (Epoch Biotek).

#### 3.1.4.4 Análise do efeito citotônico dos adjuvantes LT e LTB em células Y1

A avaliação do efeito citotônico da LT e LTB em culturas de células adrenal Y1 foi realizada de acordo com Rodrigues e colaboradores (2011). Células Y1 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços (Corning) e expostas a 1 µg de LT ou LTB ou tampão PBS como controle negativo, diluídos em meio DMEM (Vitrocell Embriolife) suplementado

com 2% de SFB (Vitrocell Embriolife). O efeito citotônico nas células Y1 foram acompanhados durante 8 h e visualizados em microscópio Evos FL (Thermo Fisher Scientific).

### 3.2 REMOÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DOS ADJUVANTES E ANTÍGENOS UTILIZADOS NAS IMUNIZAÇÕES

O protocolo para a remoção do lipopolissacarídeo (LPS) utilizou resina de poli-lisina, de acordo com as especificações do fabricante (Pierce®High-Capacity Endotoxin Removal Resin Thermo Scientific). Para a remoção de LPS da proteína EDI/II foi utilizado o tampão Tris-HCl a 50 mM, NaCl 0,2 M, pH 8,0 para proteína EDIII foi utilizado o tampão fosfato de sódio a 50 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,0, enquanto que para LT, LT-K63 e LTB utilizamos o tampão fosfato de sódio a 50 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,4. A concentração de endotoxina (EU - unidade endotóxica) presente nas proteínas tratadas após o tratamento foi determinada com o kit Limulus Amebocyte Lysate LAL QCL-1000 (Lonza). As amostras apresentaram quantidades < 0,02 EU/μg de proteína, abaixo dos valores permitidos para formulações vacinais utilizando proteínas recombinantes < 3,6 EU/100 μL da formulação vacinal (MALYALA; SINGH, 2008).

### 3.3 ENSAIO DE IMUNIZAÇÃO COM EDI/II, EDIII OU DENV2 PURIFICADO

#### 3.3.1 Imunização com EDI/II, EDIII ou DENV2 purificado pela via intramuscular

Camundongos machos das linhagens Balb/c, com 6 a 8 semanas de idade, foram utilizados para os ensaios de imunização e obtidos junto ao Biotério de Isogênicos da Parasitologia-ICBII/USP (Comissão de Ética no uso de animais (CEUA nº 063). O protocolo de imunização consistiu da administração intramuscular em 4 doses: com intervalos de 15 dias entre a 1ª e 2ª dose, e intervalo de 7 dias entre a 2ª, 3ª e 4ª dose. Os antígenos vacinais foram administrados em quantidades equimolares com base na dose da proteína EDIII utilizada na imunização. Cada dose inoculada nos animais consistiu de 100 μL de solução salina apirogênica, sendo aplicados 50 μL/pata traseira contendo: 25 μg da proteína EDI/II ou a proteína em combinação com 1 μg de LT-K63; 10 μg de EDIII ou a proteína em combinação com 1 μg de LT-K63 ou 15 μg de DENV2 purificado administrado com 50 μg de hidróxido de alumínio comercializado pela empresa Reheis. O sangue foi coletado pelo plexo submandibular um dia antes de cada dose e 14 dias após a última dose. Os soros dos animais foram recolhidos após a coagulação do sangue a 37°C por 30 min e retração do coágulo a 4°C por 30 min, seguida



de centrifugação refrigerada a 3.000 x g por 30 min. As amostras de soros foram estocadas a -20°C até realização de ensaio ou ensaios de neutralização e ADE.

### 3.3.2 Imunização com EDIII pela via subcutânea

Camundongos fêmeas das linhagens Balb/c, com 6 a 8 semanas de idade, foram utilizados para os ensaios de imunização e foram obtidos junto ao Biotério de Isogênicos da Parasitologia-ICBII/USP (Comissão de Ética no uso de animais ((CEUA) nº 198). O protocolo de imunização consistiu da administração subcutânea em 3 doses com intervalo de 14 dias. Cada dose inoculada nos animais consistiu de 100 µL de PBS contendo 10 µg da proteína EIII ou a proteína em combinação com 1 µg de LT, 3,2 µg LTB ou 12,5 µg Alúmen. O sangue foi coletado pelo plexo submandibular um dia antes de cada dose e duas semanas após a última dose. Os soros dos animais foram recolhidos após a coagulação do sangue a 37°C por 30 min e retração do coágulo a 4°C por 30 min, seguida de centrifugação refrigerada a 3.000 x g por 15 min. As amostras de soros foram estocadas a -20°C até realização de ensaio de ELISA ou ensaios de neutralização e afinidade dos anticorpos.

## 3.4 CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

### 3.4.1 Análise da resposta humoral

#### 3.4.1.1 ELISA com a proteína EDI/II

Poços alternados de microplacas de poliestireno Costar (Nunc) foram sensibilizados por 18 h a 4°C com proteína EDI/II (2,5 µg/mL). As placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS - *phosphate buffered saline*) 1x contendo 0,05% de Tween-20 (PBST). Após a lavagem foi feito o bloqueio adicionando-se 200 µL da solução 3% de gelatina em PBST, e as placas foram incubadas durante 1 h a 37°C. Após novo ciclo de lavagem (3x), 100 µL dos soros testes foram adicionados em duplicata, diluídos por diluição seriada e incubados a temperatura ambiente por 1 h e 30 min. Depois de um novo ciclo de lavagem (3x) foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-IgG total de humano ou anti-IgG total de camundongo ou anti-IgG2a aos poços na diluição de 1/3000 ou anti-IgG1 na diluição de 1/10000 conjugados à peroxidase (Sigma Aldrich). Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e a

revelação foi realizada com 100 µL/poço da solução reveladora contendo substrato OPD por 10 min à temperatura ambiente e a reação foi interrompida com 50 µL por poço de ácido sulfúrico a 1 M. A leitura da densidade óptica foi realizada no comprimento de onda  $\lambda_{492\text{nm}}$  em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems). Para calcular os títulos de anticorpos EDI/II-específicos usamos o gráfico de dispersão apresentando a equação da reta e regressão linear ( $R^2 > 0,96$ ) através da utilização do programa Microsoft Excel.

#### 3.4.1.2 ELISA com a proteína EDIII

O ELISA com anticorpos anti-EDIII foi realizado de acordo com Amorim e colaboradores (2012). Poços alternados de microplacas de poliestireno Maxisorp (Thermo Fisher Scientific) foram sensibilizados por 18 h a 4 °C com proteína EDIII (1 µg/mL) em tampão PBS. Para ELISA usando condições desnaturantes, a proteína EDIII foi submetida ao tratamento de aquecimento a 100 °C por 15 min e usada para sensibilização das placas. As placas foram bloqueadas com 200 µL da solução 3% de gelatina em PBST e incubadas durante 2 h a 37°C. Após novo ciclo de lavagem (3x), 100 µL dos soros testes ou anticorpos IgG EDIII-específicos purificados foram adicionados em duplicata, diluídos por diluição seriada e incubados a temperatura ambiente por 1 h e 30 min. Depois de um novo ciclo de lavagem (3x) foram adicionados 100 µL do anticorpo de humano anti-IgG total ou de camundongo anti-IgG total ou anti-IgG2a aos poços na diluição de 1/3000 ou anti-IgG1 na diluição de 1:10.000 conjugados a peroxidase (Sigma Aldrich). O procedimento de revelação para obtenção da absorbância de  $\lambda_{492\text{nm}}$  e cálculo dos títulos de anticorpos foram realizados como descrito anteriormente.

#### 3.4.1.3 ELISA com DENV2 purificado

Para esse ensaio foi utilizado o protocolo de acordo com Wahala e colaboradores (2009). Poços alternados de uma microplaca de poliestireno Costar (Nunc) foram sensibilizados por 2 h à temperatura ambiente com DENV2 purificado (2,0 µg/mL) em tampão Bi-Carbonato (Carbonato 35 mM, Bicarbonato 15 mM, pH 9,6). As placas foram lavadas três vezes com PBS 1x contendo 0,05% de Tween-20 (PBST). Após a lavagem, foi feito o bloqueio adicionando-se 200 µL da solução de PBST acrescido de 3% de leite e 0,5% de BSA, e as placas foram incubadas durante 2 h a 37°C. Após novo ciclo de lavagem (3x), 100 µL dos soros testes diluídos foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 1 h. Depois de um novo ciclo de lavagem

(3x), foram adicionados 100  $\mu$ L do anticorpo de humano anti-IgG total ou camundongo anti-IgG total ou anti-IgG2a aos poços na diluição de 1/3000 ou anti-IgG1 na diluição de 1/10000 conjugados à peroxidase (Sigma Aldrich) e incubadas durante 1 h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e a revelação e cálculos dos títulos de anticorpos DENV2-específicos foram feitos como descrito no protocolo acima.

#### 3.4.1.4 Determinação afinidade dos anticorpos IgG anti-EDIII

A afinidade dos anticorpos IgG anti-EDIII foi medida usando o protocolo de ELISA modificado com tratamento com solução de tiocianato de amônio, de acordo com Lasaro e colaboradores (2009). Placas foram sensibilizadas com a proteína EDIII, como descrito no protocolo acima. Os soros dos animais imunizados com EDIII, sozinha ou em combinação com os adjuvantes LT ou LTB, foram testados na diluição correspondente ao  $\lambda_{492\text{nm}}$  de 0,8, enquanto que os anticorpos IgG EDIII-específicos purificados foram analisados ao  $\lambda_{492\text{nm}}$  de 0,5. Após a incubação com os soros ou anticorpos purificados, diferentes concentrações de tiocianato de amônio diluídos em tampão PBS (0,0 M, 0,025 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M, 0,4 M, 0,6 M, 0,8 M, 1,0 M, 2,0 M ou 4,0 M) foram adicionados aos poços e incubados por 15 min. As placas foram lavadas 3x com solução de PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBST), e incubadas com anticorpo de camundongo anti-IgG conjugado com peroxidase. A porcentagem de anticorpos ligados à proteína EDIII foi determinada utilizando a equação:  $\text{absorbância } \lambda_{492\text{nm}} \text{ na presença de tiocianato de amônio} \times 100 / \text{absorbância } \lambda_{492\text{nm}} \text{ na ausência de tiocianato de amônio}$ .

#### 3.4.1.5 Determinação da capacidade de neutralização viral dos anticorpos antígeno-específicos em células Vero

A análise de neutralização foi determinada por meio do teste de redução de placa viral (PRNT - *Plaque Reduction Neutralization Teste*), de acordo com Poggianella e colaboradores (2015). Os vírus DENV1 (GeneBank: JX669467), DENV2 (New Guinea GeneBank: AHG97599.1), DENV3 (GeneBank: KC425219), DENV4 (GU289913.1) foram gentilmente cedidos pela pesquisadora Dra. Laura Helena Vera Gonzales Gil da Fundação Oswaldo Cruz em Recife – PE. O vírus ZIKV (ZIKV<sup>BR</sup>) foi gentilmente cedido pelo pesquisador Dr. Edison Durigon do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os vírus foram cultivados de acordo com o protocolo descrito no item 3.1.3 deste trabalho. Células Vero foram mantidas em meio DMEM (Vitrocell Embriolife)

suplementado com 10% de SFB e plaqueadas em placas de 24 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) 24 h antes da infecção. As amostras de soro dos animais imunizados foram previamente inativadas, quanto às proteínas do complemento, por 30 min a  $56^\circ\text{C}$  e submetidas à diluição seriada em meio DMEM. Os anticorpos IgG anti-EDIII purificados foram testados em diferentes concentrações. Os soros e anticorpos IgG EDIII-específicos provenientes da imunização pela via subcutânea foram incubados com 200 UFP/mL de DENV2. As amostras de soro dos animais imunizados pela via intramuscular foram incubadas com 200 UFP/mL do DENV1, DENV2, DENV3 ou ZIKV e 150 UFP/mL do DENV4. As misturas de soro ou anticorpos purificados + vírus foram incubadas por 1 h e depois adicionadas nas células Vero por 1h a  $37^\circ\text{C}$ . A suspensão viral foi removida e 1 mL de meio DMEM completo (2,5% de SFB, 1% de carboximetilcelulose (Synth)) foi adicionado sobre as células Vero. Após a incubação de 5 dias para DENV4 e ZIKV, 7 dias para DENV2 e DENV4 ou 10 dias para DENV1, as células foram fixadas por 15 min com solução de formaldeído 4% em PBS e marcadas com cristal violeta por 10 min. A porcentagem de redução de placas foi calculada em relação ao controle positivo (poços com células expostas apenas com os DENV ou ZIKV). Títulos de neutralização (redução de 50% da UFP - PRNT<sub>50</sub>) dos anticorpos foram expressos por diluição do soro ou concentração de IgG.

#### 3.4.1.6 Determinação da capacidade de neutralização viral dos anticorpos antígeno-específicos em células K562 ou U937

Para ensaio de neutralização viral com as células K562 ou U937, os *pools* de soro de cada grupo de imunização diluídos seriadamente ( $1/20$  a  $1/2 \times 10^7$ ) ou diferentes concentrações dos anticorpos controle mAbs 2H2 (específico para a proteína prM de DENV2) ou 4G2 (específico para o loop de fusão da glicoproteína de envelope de *Flavivírus*) foram misturados com o DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 ou ZIKV na multiplicidade de infecção (MOI - *Multiplicity Of Infection*) de 0,1. As misturas foram incubadas por 30 min a  $37^\circ\text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . As misturas soro + vírus correspondentes a cada diluição foram adicionados nos respectivos poços contendo células das linhagens K562 ou U937 ( $5,0 \times 10^4$  células/poço). Após incubação de 1 h, as placas foram centrifugadas a  $500 \times g$  por 5 min e os sobrenadantes removidos. As células foram lavadas 2 vezes e adicionado meio RPMI suplementado com 2% de SFB às placas que, em seguida, foram incubadas por 24 h, para as células K562, e 48 h, para as células U937, a  $37^\circ\text{C}$  em estufa com 5%  $\text{CO}_2$ . As placas foram centrifugadas a 1300 rpm por 5 min e os sobrenadantes foram coletados e armazenados no freezer  $-80^\circ\text{C}$  para o ensaio de RT-PCR. As células foram fixadas e permeabilizadas com uso do kit Cytotfix/Cytoperm (BD

Biosciences) e marcadas com anticorpo mAb 4G2 por 30 min e posteriormente com anticorpo anti-IgG mouse conjugado com Alexa 488 (BD Biosciences). As células fluorescentes foram medidas em BD LSRFortessa (BD Biosciences) e os dados foram analisados com o programa FlowJo v10 para determinar a quantidade de células marcadas.

#### *3.4.1.7 Determinação da capacidade de neutralização viral dos anticorpos antígeno-específicos em modelo animal*

Para a realização deste ensaio, primeiramente determinamos a dose letal  $DL_{50}$  e  $DL_{90}$  nos animais AG129 e BALB/c respectivamente. Animais da linhagem BALB/c foram obtidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. Os animais foram anestesiados e, posteriormente, inoculados, pela via intracraniana, com diferentes doses (40  $\mu$ L) do vírus DENV2 NCG ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  UFP/animal). Após a inoculação os animais foram acompanhados quanto à mortalidade por um período de 21 dias. Os animais da linhagem AG129, nocautes para receptores de interferons: rIFN- $\alpha$ , rIFN- $\beta$  e rIFN- $\gamma$ , foram obtidos a partir da colaboração com a pesquisadora Dra Sujan Shresta do Centro de Doenças Infecciosas do Instituto La Jolla de Alergia e Imunologia – Califórnia. As matrizes recebidas foram mantidas em quarentena no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo. Posteriormente a certificação de qualidade dos animais e estabelecimento da colônia, os animais foram testados quanto à susceptibilidade à infecção por vírus DENV2 S221, também cedido pela pesquisadora Dra Sujan Shresta (ZELLWEGER; PRESTWOOD; SHRESTA, 2010). Para o ensaio de infecção, o vírus DENV2 S221 foi inoculado nos animais AG129 pela via intravenosa no volume final de 50  $\mu$ L de meio MEM, contendo  $1 \times 10^4$  UFP ou  $1 \times 10^5$  UFP/animal. Após a inoculação os animais foram acompanhados quanto à mortalidade por um período de 21 dias.

A capacidade de neutralização viral dos soros obtidos foi determinada de acordo com Zellweger e colaboradores (2015). A concentração de  $10^4$  UFP da cepa S221 de DENV2 foi incubada com os soros (diluídos 1/20), inativados quanto às proteínas do complemento, por 30 min a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente as misturas (soro ou meio MEM + vírus) foram administradas pela via intravenosa nos respectivos grupos de animais AG129 não imunizados. Após a inoculação os animais foram acompanhados quanto à mortalidade por um período de 21 dias. A capacidade de neutralização viral foi determinada de acordo com porcentagem de sobrevivência dos animais.

#### 3.4.1.8 Purificação dos anticorpos IgG anti-EDIII

Para a purificação de anticorpos EDIII-específicos foi utilizada coluna His-Trap HP 1 mL (GE Healthcare Life Science) acoplada em aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia). A coluna foi previamente equilibrada com 5 vc de tampão A e uma suspensão de 5 mg de proteína EDIII purificada foi aplicada à coluna em um fluxo 0,05 mL/min. Posteriormente a coluna foi lavada com 5 vc de tampão de ligação (fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,4) e a suspensão de soro, previamente delipidado, foi aplicada à coluna em fluxo de 0,05 mL/min. A coluna foi novamente lavada com 5 vc de tampão equilíbrio e foi iniciada a eluição das anticorpos EDIII-específicos adsorvidos à proteína EDIII com tampão de eluição (glicina 0,1 M, pH 4,0). A fração eluída em tubos eppendorf contendo tampão de neutralização (Tris-HCl 1M pH 9,0) foi denominada F2. A coluna foi regenerada com 5 vc de tampão ligação e em novo ciclo de purificação de anticorpos foi feito para cada grupo de soros. Por fim, a coluna foi lavada com 5 vc de água mili-Q e 5 vc com solução contendo 20% de etanol. Amostras correspondentes aos picos obtidos na fração F2 foram dialisadas em membrana de celulose (Dialysis tubing - Sigma-Aldrich) de 12 kDa em tampão PBS (pH 7,4).

Para a obtenção dos anticorpos IgG, amostras dos anticorpos purificados EDIII-específicos foram aplicadas à coluna de proteína G-Sepharose (1 mL) acoplada ao aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia). Etapas de purificação e diálise dos anticorpos purificados foram realizadas como descrito anteriormente. Posteriormente à diálise, as amostras de IgG EDIII-específico foram concentradas em sistema de centriplus YM-100 (Amicon) 100 kDa e a concentração de anticorpos foi determinada por ensaio de dosagem com proteína com kit BCA (Pierce BCA protein-Thermo Scientific). A eficiência do método de purificação foi avaliada pela técnica de ELISA e eletroforese de gel de SDS-PAGE a 15%.

#### 3.4.1.9 Análise da Imunoassinatura dos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados.

O ensaio de *Microarray* foi realizado em colaboração com o pesquisador Dr. Stephen Albert Johnston e Dra Milene Tavares Batista, do Centro de Inovação em Medicina do Instituto de Biodesign da Universidade do Estado de Arizona, Arizona, EUA. Os slides foram fabricados usando síntese *in situ* de 330.000 (CIM330K) peptídeos de sequencias randômicas não naturais (DONNELL et al., 2015). As análises estatísticas dos dados do *microarray* foram feitas com o programa JMP 12 (Software de descoberta estatística do SAS), importando as análises de dados do programa Microsoft Excel e os dados das imagens processadas do GenePix Pro-6.0

(Molecular Devices, Sunnyvale, CA). As intensidades brutas foram normalizadas para cada slide pela divisão de todos os valores por matriz pela mediana (mediana normalizada). Pontos de má qualidade foram excluídos das análises marcando os respectivos pontos como ausentes após inspeção visual. Valores menores que 0,01 foram configurados para 0,01 e os valores das matrizes duplicadas foram calculados em médias e usados nas análises. Peptídeos importantes foram determinados por teste T *Student two-tailed* com testes de comparação múltiplas *Bensamini e Hochberg* e aplicada a correlação para valor de  $p < 0,05$ .

Para a análise do componente principal utilizamos peptídeos identificados como significativos para cada abordagem vacinal e análises feitas com o software JMP 12 (STAFFORD et al., 2014). A predição do reconhecimento de epítomos foi baseada na lista de peptídeos informativos comparado com a sequência da proteína EDIII do vírus DENV2 cepa NGC (AHG97599.1) usando o GuiTope (HALPERIN et al., 2012). A substituição dos aminoácidos da matriz foi promovida pela biblioteca de peptídeos e a sequência da proteína. Foi selecionado um peso de inversão de 1. As pontuações subtraídas da biblioteca foram retornadas usando a média de 10 amostragens aleatórias da biblioteca de peptídeos e um corte mínimo de pontuação de 8,0. Resultados foram representados graficamente usando o GraphPad Prism v. 5 usando uma média móvel de 15.

#### 3.4.1.10 Determinação da sequência Logos dos anticorpos IgG EDIII-específicos

Para cada grupo de anticorpos IgG anti-EDIII purificados, foram selecionados sequências de 25 peptídeos com sinal equivalente a maior intensidade de ligação para gerar as regiões consensus com a proteína EDIII. Utilizamos o programa GLAM2 (<http://memesuite.org/tools/glam2>) com largura inicial de 7 aminoácidos e ajustes de configuração padrão (BATISTA et al., 2017).

### 3.4.2 Análise da resposta celular

#### 3.4.2.1 Marcação de citocinas intracelular

Os animais imunizados com os antígenos EDIII ou DENV2 purificado pela i.m, foram eutanasiados 15 dias após a última dose de imunização. Os baços foram removidos, macerados e tratados por 2 min com tampão de lise para hemácias ACK (NH<sub>4</sub>CL 123,0 mM; KHCO<sub>3</sub> 8,0

mM; EDTA 1 mM). Os esplenócitos foram centrifugadas a 1300 rpm por 5 min e ressuspensos em meio RPMI (Gibco). Os esplenócitos ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram cultivados por 48 h a 37°C em placa para cultura (Corning) com 200  $\mu$ L de meio RPMI contendo IL-2 (5 ng/mL), Brefeldina (10  $\mu$ g/mL) (GolgiPlug; BD Biosciences) e presença ou ausência do estímulo com a proteína EDIII ou DENV2 purificado (10  $\mu$ g/mL). Após lavagens com tampão PBS suplementado com 2% de SFB, as células foram marcadas com anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos anti-CD4 FITC e anti-CD8 Alexa 700 (BD Biosciences) e incubadas por 30 min a 4°C. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas por kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) por 10 min e marcadas com anticorpos anti-INF- $\gamma$  PE; anti-IL-10 BV605 e anti-IL-4 BV421 (BD Biosciences) por 30 min a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas e ressuspensas em 200  $\mu$ L de tampão MACS (tampão PBS; BSA 0,5%; EDTA 2 mM). As amostras foram examinadas por citometria de fluxo, usando o aparelho BD LSRFortessa (BD Biosciences), e os dados analisados com o programa FlowJo v10.

#### *3.4.2.2 Análise do perfil de citocinas secretadas*

Para avaliação da produção de citocinas, os esplenócitos proveniente de baços de animais imunizados foram obtidos e processados de acordo com o protocolo descrito acima. Cerca de  $1 \times 10^6$  células/poço foram cultivadas por 72 h a 37°C em placa para cultura (Corning) com 200  $\mu$ L de meio RPMI, na presença ou ausência do estímulo com a proteína EDIII (10  $\mu$ g/mL). Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1300 rpm por 5 min e o sobrenadante acondicionado em freezer -80°C. As citocinas secretadas foram analisadas com kit Th1/Th2, de acordo com as especificações do fabricante (Cytometric Bead Array cytokine – BD Biosciences). As amostras foram examinadas por citometria de fluxo usando equipamento BD LSRFortessa (BD Biosciences). Os resultados foram analisados com o programa FCAP array (BD Biosciences). A análise da citocina IL-5 foi realizada por ELISA, segundo o protocolo descrito pelo fabricante (Mouse IL-5 ELISA set BD Biosciences).

### 3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DO PEPTÍDEO 47 DE DENV2

#### **3.5.1 Ensaio de competição com peptídeo 47 de DENV2.**

Esse ensaio foi adaptado a partir do protocolo descrito previamente por Alhoot e colaboradores (2013). Células Vero foram cultivadas em meio MEM suplementado com 2% de



SFB e incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 18 h. A proteína EDIII de DENV2, íntegra ou desnaturada, bem como o peptídeo 47 foram preparados em diferentes concentrações molares e misturados com o vírus DENV2 cepa NGC (Multiplicidade de infecção de 1,0). Em seguida, as misturas foram adicionadas a células Vero e incubadas 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 1 h. Os sobrenadantes foram removidos e adicionado meio MEM suplementando com 2% de SFB e as placas incubadas por 18 h. Posteriormente, as culturas foram lavadas com tampão PBS e tratadas com 50 µL/poço de tripsina (2,5 mg/mL) mais EDTA a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 10 min para remoção das células. As células Vero foram ressuspensas em PBS contendo 5% de SFB e posteriormente fixadas e permeabilizadas com kit Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience) por 10 min. Após incubação, as células foram tratadas com o mAb 4G2 (10 µg/mL) por 30 min. Subsequentemente marcadas com anticorpo anti-IgG mouse conjugado com Alexa 488 (BD Biosciences) por mais 30 min. As células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo usando aparelho BD LSRFortessa e os dados foram analisados no software FlowJo v.10 para determinar a quantidade de células Vero DENV-positivas.

A análise de replicação viral pela determinação da quantidade de cópias de RNA foi realizada 24 h após a infecção (WAGNER et al., 2004). O RNA viral foi extraído de 100 µL de células Vero infectadas usando o método fenol guanidina isotiocianato (Trizol - *guanidine isothiocyanate phenol*, Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. O ensaio de RT-PCR foi realizado de acordo com Wagner e colaboradores (2004), utilizando para os oligonucleotídeos senso DENV 5'-AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC-'3 e antisenso DENV 5'-GGCCYTCTGTGCCTGGAWTGATG-'3 e a sonda com gene marcado DENV 5'-FAM- AACAGCATATTGACGCTGGGARAGACC-TAMRA -'3 (LU et al., 2012). O ensaio foi realizado utilizando 5 µL do RNA extraído, 1 µL da mistura de iniciadores/sonda (10 pM/µL) e 9 µL do reagente AgPathIDTM OneStep RT-PCR (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.5.2 Análise estrutural do peptídeo 47 de DENV2

A sequência de aminoácidos compreendendo ao epítipo predito foi indicada no modelo de estrutura quaternária da glicoproteína de envelope do DENV2 (PDB número de acesso 1OKE) usando o programa PyMol v1.8.4.0.

### 3.5.3 Modelagem molecular da estrutura do peptídeo 47 de DENV2 e seu correspondente no vírus ZIKA

A modelagem dos peptídeos foi realizada em colaboração com a equipe liderada pelo prof. Dr. Glaucius Oliva do Instituto de Física de São Carlos, Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos - CIBFar/CEPID, da Universidade de São Paulo. A modelagem foi feita partindo de (1) uma sequência não estruturada de aminoácidos, gerada pelo programa PyMOL, seguida de (2) uma etapa inicial de minimização de energia e equilíbrio na caixa de solvente e (3) a subsequente simulação de dinâmica molecular por 100 nanosegundos. Essas etapas foram realizadas utilizando o pacote de programas para dinâmica molecular GROMACS 5.1.4, com parâmetros para minimização de energia, equilíbrio do sistema e dinâmica molecular descritos na tabela abaixo.

**Tabela 2** – Parâmetros utilizados para a minimização de energia do sistema, equilíbrio do sistema e dinâmica molecular.

Parâmetro	Valor
<b>Minimização</b>	
Passos de minimização	50.000
Algoritmo	Steepest Descent Minimization
<b>Equilíbrio</b>	
Tempo de simulação	1 ns
Integrador	Clássico (Leap-frog integrator)
<b>Dinâmica</b>	
Modelo de água	Simple Point Charge/Effective
Tipo de caixa de simulação	Cúbica. 2 nm > peptídeo
Íons	Na <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>
Campo de força	OPLS-AA/L all-atom force field
Tempo de simulação	100 ns

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas com subsequente teste de *Tukey* ou *Bonferroni*. As avaliações de sobrevivências foram realizadas por *Survival curve* e posterior teste de *Mantel Cox*. Para análise de imunoassinatura foi utilizado o teste *T Student two-tailed* com testes de comparação múltiplas *Bensamini* e *Hochberg*. A significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ .

## 4 RESULTADOS

O presente trabalho buscou identificar epítomos presentes na proteína de envelope do DENV2 capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes sem promover o fenômeno de ADE. Para melhor compreensão do trabalho os resultados apresentados foram divididos em três etapas. Na primeira e segunda etapa, buscamos avaliar a resposta de anticorpos neutralizantes contra os domínios EDI/II e EDIII e vírus DENV2 purificado através da imunização pela via intramuscular. E na terceira etapa, procuramos investigar a atividade adjuvante da LT e seu derivado atóxico LTB na modulação de epítomos para EDIII importantes para neutralização do DENV2.

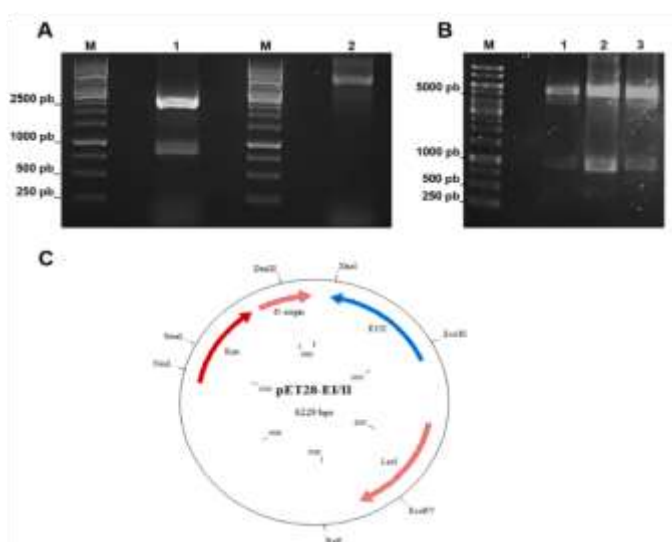
### 4.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA NA IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR COM A PROTEÍNA RECOMBINANTE EDI/II DENV2

#### 4.1.1 Clonagem da sequência genética *edi/II* em vetor de expressão pET28a e expressão da proteína recombinante

A sequência nucleotídica *edi/II*, que codifica para a proteína recombinante EDI/II (domínio I/II da proteína E do envelope do vírus dengue tipo 2), foi adquirida comercialmente a partir do plasmídeo pUC57-EI/II. O inserto correspondente à sequência *edi/II* foi extraído após digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, (**Figura 5A**). O produto de digestão correspondente ao tamanho aproximado de 900 pb foi purificado e subsequentemente clonado no vetor para expressão pET28a, gerando o plasmídeo denominado pET28a-EDI/II, (**Figura 5C**). O rastreamento dos plasmídeos recombinantes apresentando à sequência *edi/II* foi realizado por análise de restrição enzimática utilizando as mesmas enzimas citadas anteriormente (**Figura 5B**).

Para análise de expressão da proteína recombinante EDI/II, realizamos testes em duas linhagens de *E. coli*: as linhagens BL21 DE3 RP e BL21 DE3 RIL. Inicialmente os ensaios foram realizados em pequena escala na presença de 0,5 mM de IPTG. A expressão da proteína EDI/II foi observada após 2, 4 e 6 h de indução na temperatura de 37°C e de 6 e 18 h de indução para a temperatura de 18°C. Alíquotas, antes e pós-indução, foram ajustadas a uma D.O<sub>600nm</sub> de 3,0 e, juntamente com as frações de material solúvel e insolúvel, foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12,5%. Observamos em todas as condições testadas um aumento da expressão da proteína EDI/II por meio da visualização da banda correspondente ao tamanho esperado de 37 kDa (**Figura 6**). As temperaturas de cultivo, 18°C e 37°C, não influenciaram na produção

da proteína EDI/II pelas linhagens testadas. Entretanto, o período máximo de indução analisado de 6 h, para a temperatura de 37°C, e 18 h para a temperatura de 18°C, proporcionou um aumento expressivo na expressão da proteína EDI/II, presente majoritariamente na fração insolúvel do extrato celular de ambas as linhagens *E. coli* BL21 DE3 RP (**Figura 6A a 6D**) e *E. coli* BL21 DE3 RIL, (**Figura 6E e 6H**). Evidenciamos uma pequena quantidade da proteína EDI/II expressa na fração solúvel do extrato celular da linhagem *E. coli* BL21 DE3 RIL após 18 h de indução na temperatura de 18°C, (**Figura 6E a 6G**).

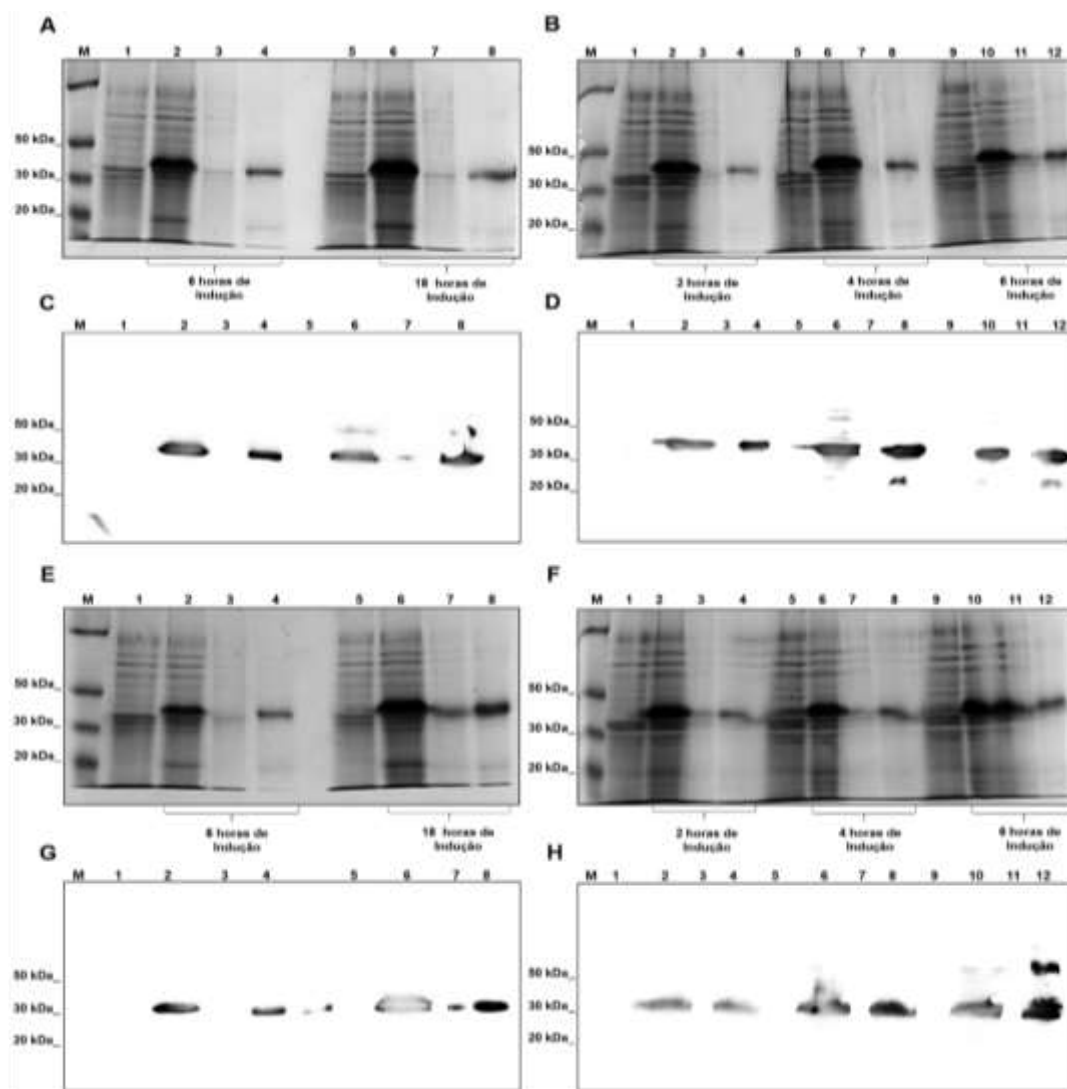


**Figura 5. Clonagem da sequência *eI/II* em vetor de expressão pET28a.** (A) O vetor pUC57-*eI/II*, albergando o gene sintético, e o vetor pET28a vazio foram digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *EcoRI* e analisados em gel com 0,8 % de agarose. M – marcador de massa molecular de 1 kb (Fermentas); amostras: poço 1, plasmídeo pUC57-*eI/II* digerido; poço 2, plasmídeo pET28a vazio digerido. (B) Células DH5α foram transformadas com o produto de ligação pET28a-*eI/II* e os clones provenientes foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *EcoRI* e analisados em gel de agarose a 0,8 %. M – marcador de massa molecular de 1 kb (Fermentas); amostras: poços 1 a 3, clones do plasmídeo pET28a-*eI/II* digerido. (C) Representação esquemática do plasmídeo pET28a-*eI/II*. Kan, gene de resistência ao antibiótico canamicina; fl origin, origem de replicação; *lacI*, gene que codifica o repressor Lac.

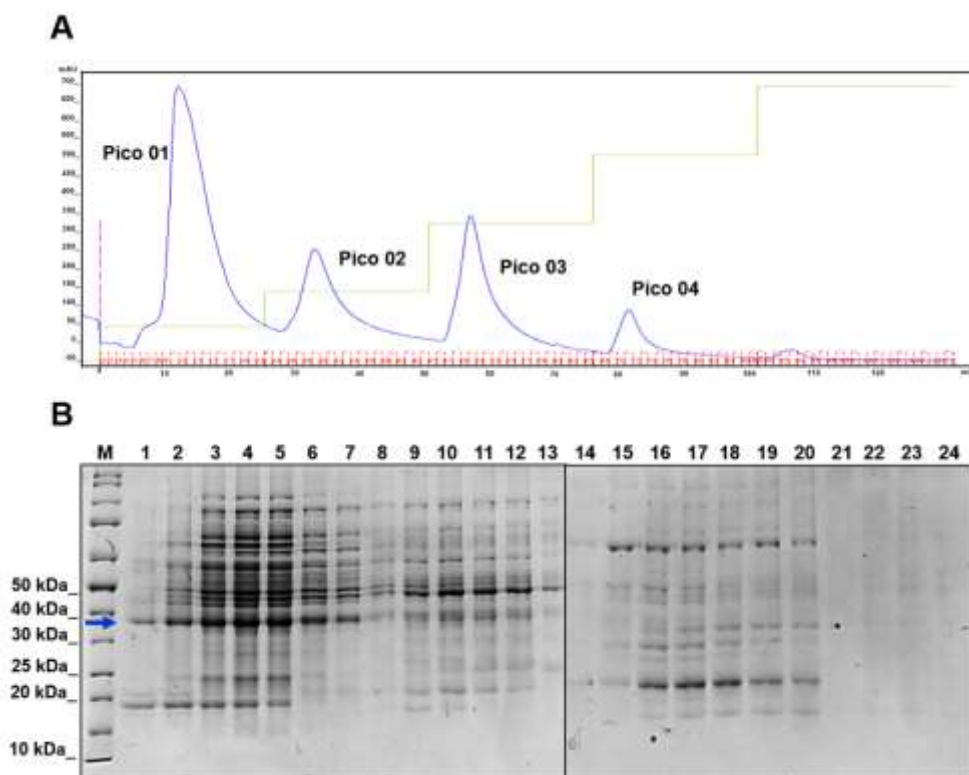
#### 4.1.2 Purificação da proteína recombinante EDI/II e do adjuvante LT-K63

Para purificação da proteína EDI/II, utilizamos o extrato celular solúvel, bem como, o extrato celular insolúvel obtido após indução da expressão na linhagem *E. coli* BL21 DE3 RIL incubada na temperatura de 18°C. Inicialmente, analisamos a purificação da proteína EDI/II presente na fração solúvel do extrato bacteriano. Para o processo de purificação utilizamos a cromatografia de afinidade ao níquel e o procedimento de eluição resultou no surgimento de quatro picos de acordo com a concentração de imidazol utilizada (100 mM, 200 mM, 400 mM e 600 mM), (**Figura 7A**). A pureza das frações obtidas nos quatros picos foi avaliada em gel de poliacrilamida a 12,5%. Como podemos observar, os picos 01 e 02 apresentaram a presença da proteína EDI/II em tamanho esperado de 37 kDa, (**Figura 7B**). Nos picos 03 e 04 não foi

possível evidenciar a presença da banda correspondente à proteína. Apesar de obtermos uma pequena quantidade da proteína EDI/II expressa na fração solúvel, verificamos a presença de muitos contaminantes no processo de purificação, (**Figura 7B**). Sendo assim, não utilizamos a fração solúvel do extrato de *E. coli* BL21 DE3 RIL para os experimentos posteriores.



**Figura 6. Expressão da proteína recombinante EDI/II em células de *E. coli* BL21 DE3 RP e RIL nas temperaturas de 18 °C e 37 °C.** (A, B, E, F) Géis de poliacrilaamida a 12,5% carregado com 10 µL de extratos celulares de *E. coli* BL21 DE3 RP ou *E. coli* BL21 DE3 RIL obtidos antes e após a indução da expressão da proteína de EI/II com 0,5 mM de IPTG em diferentes temperaturas (18 °C e 37 °C), corados com *Coomassie Blue*. (C, D, G, H) *Western-blotting*, seguido por imunodeteccção da proteína EDI/II expressa, utilizando anticorpos anti-cauda de histidina (Sigma Aldrich). (A, C, E, G) Cultura de *E. coli* BL21 DE3 RP (A e C) ou *E. coli* BL21 DE3 RIL (E e G) induzida à temperatura de 18 °C. Amostras: M - marcador de massa molecular (Fermentas); poços 1 e 5, extratos celulares anteriores à indução; poços 2 e 6, extratos celulares pós-indução com IPTG por 6 e 18 h respectivamente; poços 3 e 7, frações solúveis; poços 4 e 8, frações insolúveis. (B, D, F, H) Cultura de *E. coli* BL21 DE3 RP (B e D) ou *E. coli* BL21 DE3 RIL (F e H) induzidas à temperatura de 37 °C. Amostras: M - marcador de massa molecular (ThermoFisher Scientific Pierce™ Prestained Protein MW Marker); poços 1, 5 e 9, extratos celulares anteriores à indução; poços 2, 6 e 10, extratos celulares pós-indução com IPTG nos tempos de 2, 4 e 6 h respectivamente; poços 3, 7 e 11, frações solúveis; poços 4, 8 e 12, frações insolúveis.

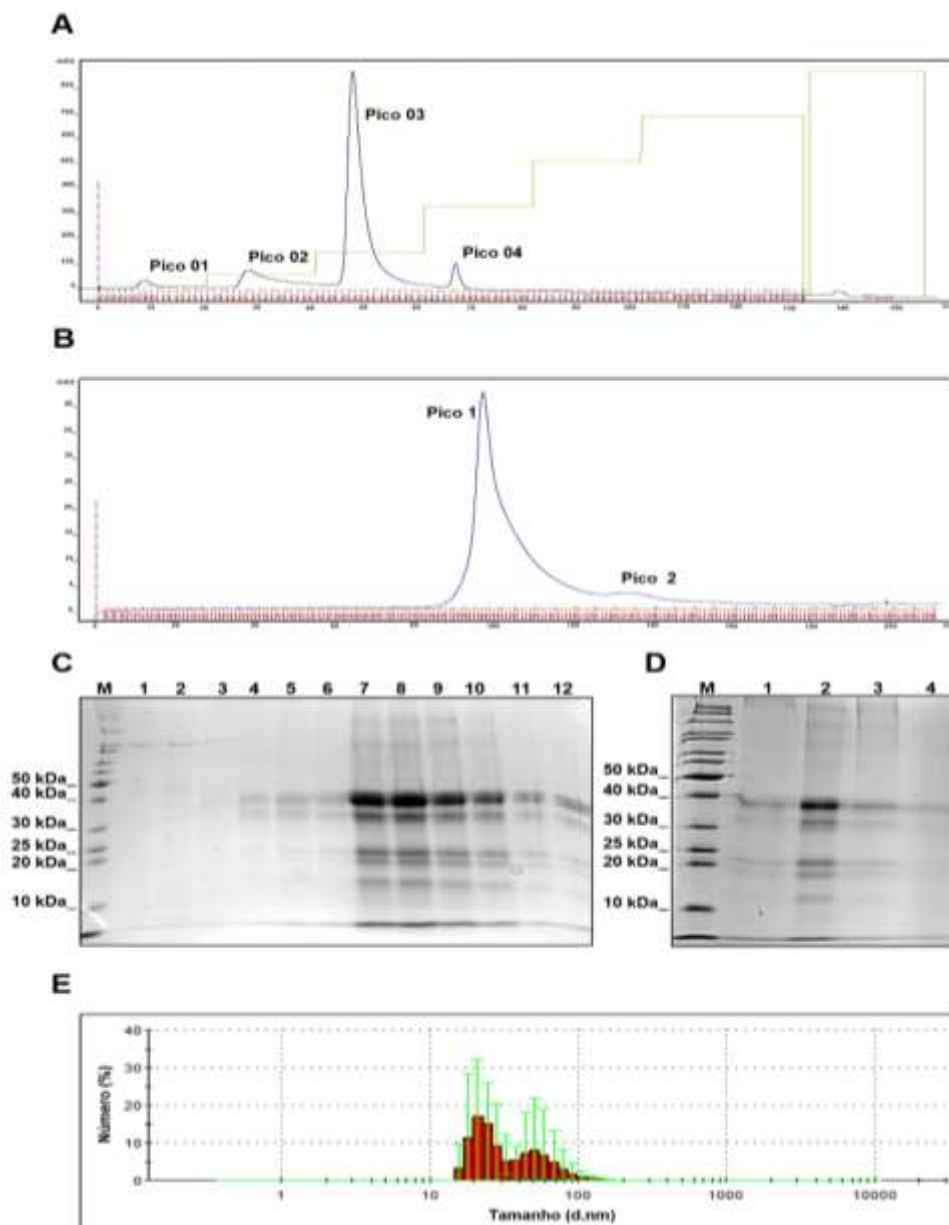


**Figura 7. Purificação da proteína EDI/II obtida na fração solúvel após indução da expressão em *E. BL21 DE3 Ril* por 18 h a temperatura de 18 °C. (A) Cromatograma da purificação de proteína EDI/II em coluna de afinidade ao níquel eluída em diferentes concentrações de imidazol. (B) Géis de poliacrilamida a 12,5 % contendo frações de purificação da proteína EDI/II. Amostras: M – marcador de massa molecular (ThermoFisher Scientific PageRuler™ Unstained Protein Ladder); poços 1 a 8, frações de eluição correspondentes à concentração de 100 mM de imidazol; poços 9 a 13, frações de eluição correspondentes à concentração de 200 mM de imidazol; poços 14 a 20, frações de eluição correspondentes à concentração de 400 mM de imidazol; poços 21 a 24, frações de eluição correspondentes à concentração 600 mM de imidazol.**

Utilizamos para o procedimento de purificação de EDI/II a fração insolúvel após indução da expressão em linhagem de *E. coli* BL21 DE3 RIL com intuito de aumentar a quantidade e melhorar a qualidade da proteína recombinante. Para renaturação da proteína insolúvel presente em forma de corpúsculos de inclusão no citoplasma de *E. coli* BL21 DE3 RIL, empregamos duas estratégias. A primeira foi realizada em colaboração com a professora Dra Ligia Morganti Ferreira Dias, do Instituto de Pesquisa Energéticas Nucleares (IPEN) – USP, e emprega o uso de alta pressão hidrostática capaz de solubilizar proteínas insolúveis presentes em corpúsculos de inclusão. A segunda estratégia foi utilizada tampão contendo agente caotrópico desnaturante em alta concentração (tampão contendo 8M de ureia). A solubilização dos corpúsculos por pressão hidrostática foi realizada de acordo com Malavasi e colaboradores (2011). Após centrifugação e filtragem, o homogenato foi aplicado em coluna de afinidade ao níquel e a eluição foi realizada com diferentes concentrações de imidazol (**Figura 8A**). Podemos observar que, o procedimento de eluição com as diferentes concentrações de imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM e 400 mM) resultou em 4 picos, (**Figura 8A**). Com intuito

de verificar o grau de pureza, as frações correspondentes aos picos foram aplicadas em gel poliacrilamida a 12,5%, (**Figura 8C**). Constatamos a presença da banda característica da proteína EDI/II (37 kDa) apenas nos picos 02 e 03 correspondentes às eluições com 100 mM e 200 mM de imidazol, respectivamente. Entretanto, observamos maior concentração da proteína EDI/II no pico 03, (**Figura 8C**). Nos demais picos não foi possível identificar a proteína purificada.

Na tentativa de melhorar a pureza da proteína EDI/II eluída com 200 mM de imidazol, aplicamos as frações correspondentes ao pico 03 em coluna de exclusão de tamanho Hitrap 26/60 SHR. O cromatograma relacionado à purificação pode ser visualizado na **Figura 8B**. Verificamos a presença de dois picos com diferentes tempos de retenção: o pico 01 surgiu com 150 min; e o pico 02 com 180 min. A pureza das frações correlacionadas aos picos foi analisada em gel de poliacrilamida a 12,5%, (**Figura 8D**). Observamos a banda esperada para a proteína EDI/II, bem como, o mesmo perfil de contaminantes presentes nas frações obtidas após purificação por afinidade ao níquel. Demonstrando que o procedimento de purificação por exclusão de tamanho não foi suficiente para remoção das outras proteínas presentes concomitantemente com a proteína EDI/II, (**Figura 8D**). Com intuito de analisarmos o tamanho das partículas de proteína EDI/II utilizamos a técnica de espalhamento de Luz dinâmico (DLS - *Dynamic Light Scattering*), (**Figura 8E**). Identificamos que a proteína EDI/II obtida por meio da solubilização dos corpúsculos de inclusão por alta pressão apresentou variações no tamanho de distribuição de partículas em solução com partículas com diâmetro médio nanomodal (d.nm - *diameter nanomol medium*) entre 10 e 100 d.nm, (**Figura 8E**). Essa variação no tamanho pode ter sido causada pela presença de outras proteínas não removidas após a utilização dos dois métodos de purificação. Observamos que a proteína EDI/II purificada apresentava-se instável, agregando em diferentes condições testadas (dados não mostrados) e obtivemos um baixo rendimento da proteína purificada, aproximadamente 1,34 mg de EDI/II purificada por litro de cultura.

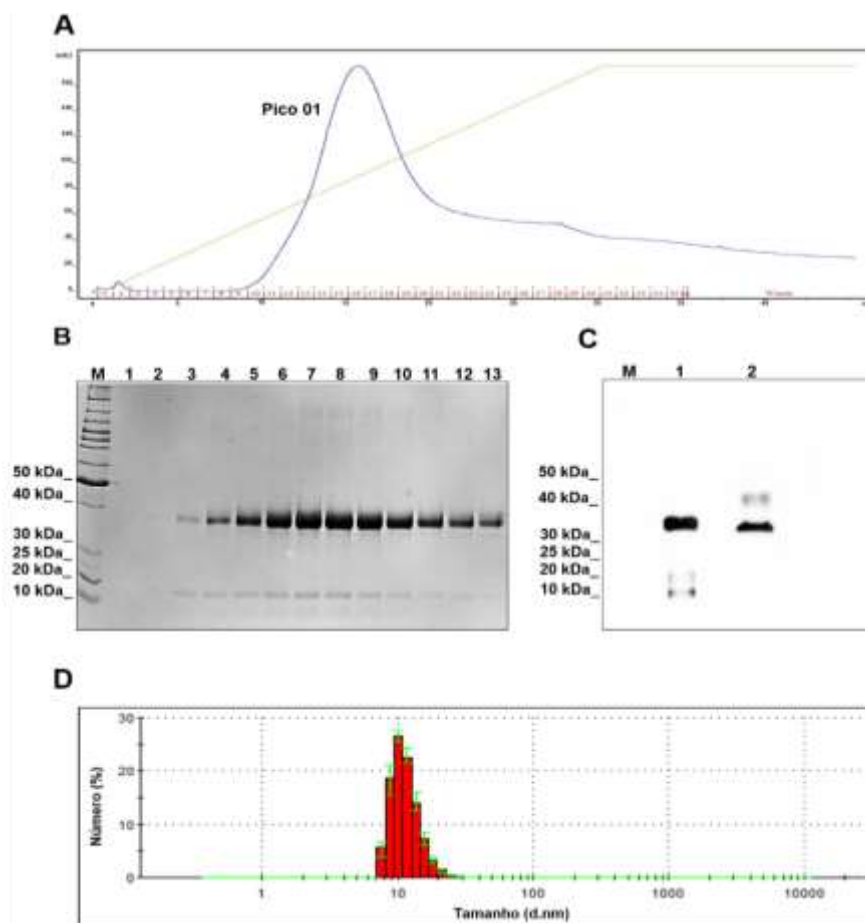


**Figura 8. Purificação e análise de distribuição de partículas da proteína EDI/II expressa após solubilização dos corpúsculos de inclusão em alta pressão de 1.4 bar.** A proteína EDI/II foi obtida após a expressão em *E. BL21 DE3* Ril por 18 a 18 °C (A) Cromatograma da proteína EDI/II purificada em coluna de afinidade ao níquel utilizando diferentes concentrações de imidazol. (B) Cromatograma da purificação de EDI/II em coluna de exclusão de tamanho Hitrap 26/60 SHR, utilizando 1 mL do eluato correspondente à proteína purificada em coluna de afinidade ao níquel eluída na concentração de 200 mM de imidazol. (C) Gel de poliacrilamida a 12,5 % com a proteína EDI/II purificada por afinidade ao níquel. Amostras: M – marcador de massa molecular (ThermoFisher Scientific PageRuler™ Unstained Protein Ladder); poços 1 a 3, frações de eluição correspondentes à concentração de 50 mM de imidazol; poços 4 a 6, frações de eluição correspondentes à concentração de 100 mM de imidazol; poços 7 a 10, frações de eluição correspondentes à concentração de 200 mM de imidazol; poços 11 e 12, frações de eluição correspondentes à concentração de 400 mM de imidazol. (D) Gel de poliacrilamida a 12,5 % da proteína EDI/II purificada em coluna de exclusão de tamanho. Amostras: M – marcador de massa molecular (Fermentas); poços 1 a 3, frações correspondentes ao pico 1 (150 min); poço 4, fração correspondente ao pico 2 (180 min). (E) Histograma com diâmetro médio nanomodal (d.nm) e distribuição das partículas de proteína recombinante EDI/II por Espalhamento de Luz Dinâmico (*dynamic light scattering* – DLS). Os desvios mostrados no gráfico foram calculados a partir das médias de 3 análises de DLS da proteína purificada EDI/II.



Após avaliarmos o emprego da alta pressão hidrostática, a solubilização dos corpúsculos de inclusão foi feita com tampão contendo 6M de ureia. Em seguida, a proteína foi renaturada em 2 litros de tampão A utilizando a técnica de diluição pulsada com velocidade de rotação e fluxo reduzido (AMORIM et al., 2010). O homogenato resultante foi aplicado em coluna de afinidade ao níquel. Para o processo de eluição utilizamos o gradiente linear de concentração de imidazol (0 a 1M) e o cromatograma correspondente à purificação pode ser observado na **Figura 9**. Verificamos que o processo de eluição resultou na formação de um único pico, eluído com 460 mM de imidazol, (**Figura 9A**). A pureza das frações obtidas foi evidenciada em gel de poliacrilamida a 12,5%, (**Figura 9B**). Podemos verificar, a presença majoritária da banda característica para a proteína EDI/II em tamanho esperado de 37 kDa e visualizamos a presença minoritária de outra banda com aproximadamente 10 kDa, (**Figura 9B**). Para confirmação, a fração relacionada ao pico foi analisada em ensaio de *Western blotting*, seguido de imunodeteção com anticorpo anti-cauda de histidina, (**Figura 9C**). Como esperado, observamos a presença de uma banda compatível com o tamanho da proteína EDI/II purificada (37 kDa), bem como uma banda minoritária (10 kDa), demonstrando que provavelmente esta banda pode ser resultante de produto de degradação da proteína EDI/II purificada, (**Figura 9C**).

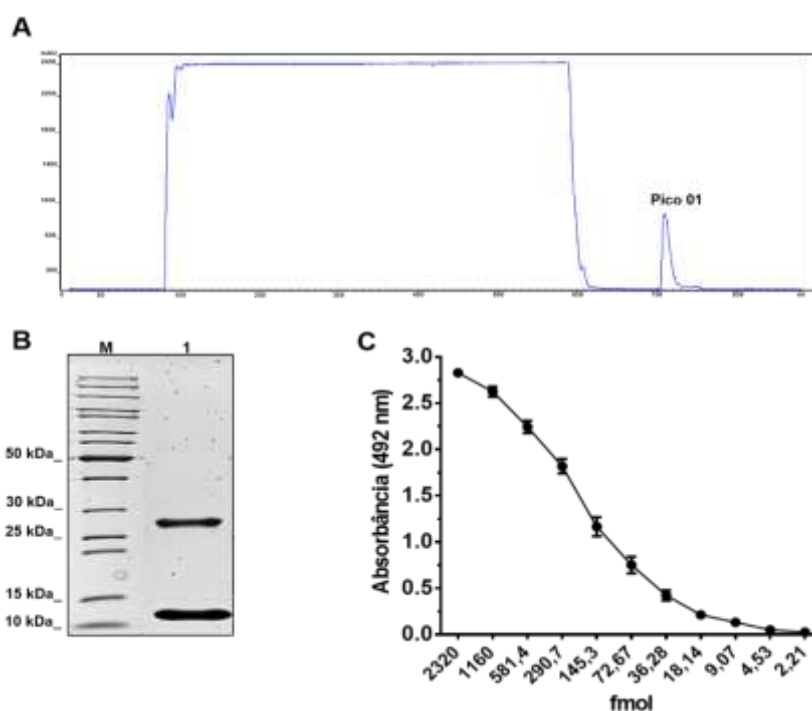
Com intuito de comparar a eficácia da solubilização dos corpúsculos de inclusão em tampão com ureia em relação ao emprego de alta pressão hidrostática, também realizamos ensaio de DLS com a proteína EDI/II purificada obtido pelo método de desnaturação com ureia seguido por renaturação, (**Figura 9D**). Evidenciamos que a proteína EDI/II purificada após solubilização dos corpúsculos de inclusão em tampão contendo 6M de ureia foi capaz de proporcionar partículas de proteína com características mais homogêneas e com tamanho de aproximadamente de 10 d.nm, padrão de tamanho e distribuição de partículas diferentes do resultado encontrado com relação à proteína EDI/II purificada por meio da solubilização dos corpúsculos de inclusão com alta pressão hidrostática, (**Figura 9D**). Obtivemos no final, um rendimento de aproximadamente 6,32 mg de EDI/II por litro de cultura, resultado superior ao obtido com a técnica de solubilização mencionada anteriormente. Entretanto, verificamos que a proteína EDI/II purificada demonstrava-se instável durante o processo de armazenamento à 20°C, sendo possível visualizar constantemente a formação de agregados insolúveis. Com intuito de aumentar a estabilidade proteica, adicionamos 30% de glicerol à proteína EDI/II purificada possibilitando utilizá-la em ensaios de imunização e avaliação da resposta imunológica gerada.



**Figura 9.** Purificação e análise de distribuição de partículas da proteína EDI/II obtida após solubilização dos corpúsculos de inclusão em tampão contendo ureia 6 M. (A) Cromatograma da purificação de proteína EDI/II em coluna de afinidade ao níquel obtida após eluição em gradiente de concentração de imidazol. (B) Gel de poliacrilamida a 12,5 % das frações obtidas após a purificação. Amostras: M – marcador de massa molecular (ThermoFisher Scientific PageRuler™ Unstained Protein Ladder); poços 1 a 13, frações correspondentes ao pico 01, eluídas com 420 mM de imidazol. (C) *Western blotting* seguido por imunodeteção da proteína EDI/II com anticorpos anti-cauda de histidina (Sigma Aldrich). Amostras: M – marcador de massa molecular; poço 1, proteína recombinante EDI/II purificada; poço 2, proteína recombinante NS1 (DENV2) utilizada como controle positivo. (D) Histograma com diâmetro médio nanomodal (d.nm) e distribuição das partículas de proteína recombinante EDI/II por Espalhamento de Luz Dinâmico (dynamic light scattering – DLS). Os desvios mostrados no gráfico foram calculados a partir das médias de 3 análises de DLS da proteína EDI/II.

Após obtermos o antígeno EDI/II purificado, partimos para a purificação do adjuvante LT-K63, derivado atóxico da toxina termo-lábil (LT) de ETEC. Para tal utilizamos cromatografia de afinidade à galactose e eluição com tampão contendo 0,3 M de D-galactose. O cromatograma resultante pode ser observado na **Figura 10A**. Como resultado, evidenciamos a presença de pico único resultante da eluição com 0,3 M de D-galactose. Para verificar a pureza da proteína purificada, as frações relacionadas ao pico foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 17,5%, (**Figura 10B**). Constatamos que a proteína LT-K63 purificada apresentou os perfis eletroforéticos esperados quando submetida ao processo de aquecimento a 100°C e visualizamos a presença de duas bandas: uma correspondente à subunidade A, com

aproximadamente 27 kDa, e uma banda, relacionada aos monômeros da subunidade B, com 11,6 kDa, (**Figura 10B**). Posteriormente ao processo de purificação da proteína LT-K63, avaliamos se a mesma preservava a atividade biológica de ligação da subunidade B ao GM1 por ELISA. Como observado na **Figura 10C**, a proteína LT-K63 purificada mantém a capacidade de interação ao GM1 de maneira dose dependente. Esse resultado indicou que o procedimento de purificação resultou em uma proteína com alto grau de pureza e atividade biológica preservada.



**Figura 10. Purificação e análise da atividade biológica do adjuvante LT-K63.** (A) Cromatograma da proteína LT-K63 purificada por cromatografia de afinidade à D-galactose. O pico 1 corresponde à proteína LT-K63 eluída (B) Gel de poliacrilamida das proteínas purificadas por cromatografia de afinidade. M, marcador de peso molecular (PageRuler Unstained Protein Ladder - Fermentas); linhas 1, EDI/II (3,0 µg); linha 2, LT-K63 (3,0 µg). (C) Ensaio de ligação ao GM1 com a proteína recombinante LT-K63 por ELISA. Dados são representativos de 2 experimentos independentes.

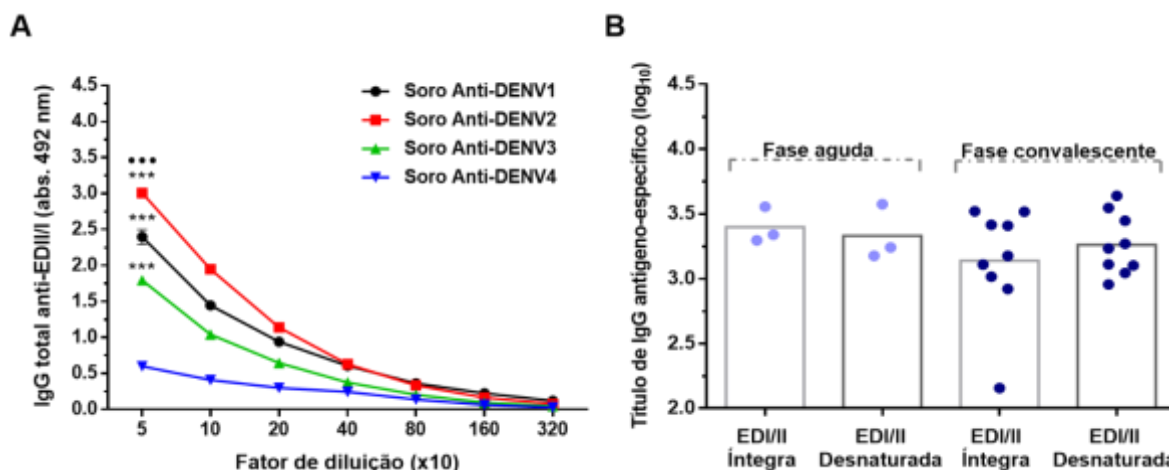
#### 4.1.3 Avaliação da antigenicidade da proteína recombinante EDI/II

Para avaliarmos a antigenicidade da proteína recombinante EDI/II de DENV2, realizamos ensaios de ELISA com amostras de soro de indivíduos previamente infectados com vírus Dengue, (**Figura 11**). Para esta análise os soros de indivíduos, obtidos em ambas as fases aguda ou convalescente da infecção por DENV2, foram obtidos com a pesquisadora Dra. Camila Romano do Instituto de Medicina Tropical - USP. Soros de indivíduos específicos para um determinado sorotipo de DENV foram obtidos com o pesquisador Dr. Paolo Zanotto, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II - USP. Podemos

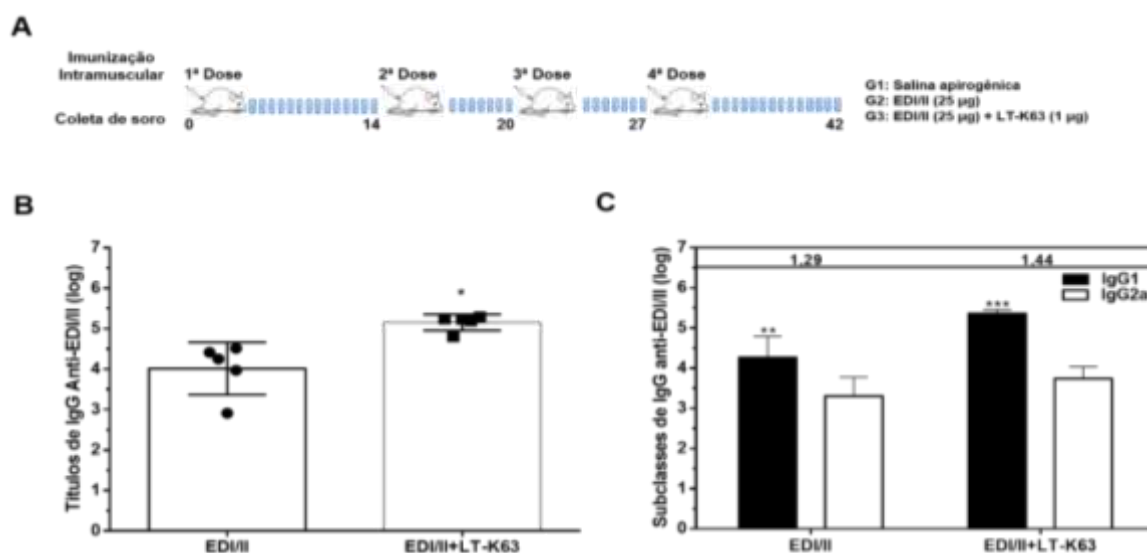
observar que a proteína EDI/II foi reconhecida por anticorpos IgG em ELISA com soros de indivíduos previamente infectados com diferentes sorotipos de DENV, (**Figura 11A**). Entre as amostras sorotipos-específicas verificamos que o soro de indivíduo DENV2 positivo demonstrou, como esperado maior reatividade em relação aos demais soros testados, (**Figura 11A**). Verificamos que os anticorpos IgG presentes nos soros de indivíduos infectados por DENV1 e DENV3 também foram capazes reconhecer a proteína EDI/II purificada, enquanto o soro de indivíduo infectado por DENV4 apresentou a menor reatividade à proteína recombinante, (**Figura 11A**). Com intuito de analisar se os anticorpos de humanos apresentavam diferenças no padrão de reconhecimento de epítomos conformacionais ou lineares presentes na proteína EDI/II, realizamos ensaio de ELISA sensibilizando a placa com proteína submetida, ou não, a desnaturação por aquecimento a 100°C. Os soros de indivíduos de fase aguda ou convalescente apresentaram anticorpos IgG capazes de reconhecer epítomos lineares bem como, epítomos conformacionais presentes na proteína EDI/II purificada (**Figura 11B**).

#### **4.1.4 Ensaio de imunização e avaliação das respostas de anticorpos EDI/II-específicas**

As proteínas purificadas (EDI/II e LT-K63) foram submetidas a tratamento em coluna de poli-lisina para remoção LPS. A concentração de endotoxina após o tratamento foi inferior a  $< 0,03$  EU/ $\mu$ g de proteína e  $< 3,6$  EU/dose (100  $\mu$ L da formulação vacinal), valores compatíveis para administração de proteínas recombinantes por via parenteral em seres humanos (MALYALA; SINGH, 2008). Os ensaios de imunização foram realizados com a linhagem de camundongos BALB/c utilizando a via intramuscular. Os animais foram divididos em 3 grupos para imunização: Controle (salina apirogênica), EDI/II e EDI/II + LT-K63. O protocolo vacinal consistiu em 4 doses com intervalo de 14 dias entre a 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> dose, e 7 dias entre 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> dose. O sangue dos animais foi coletado um dia antes de cada dose e 14 dias após a última dose, (**Figura 12A**). A imunização com EDI/II coadministrada com o adjuvante LT-K63 proporcionou maiores títulos de anticorpos IgG EDI/II-específicos em relação ao soro dos animais imunizados somente com o antígeno, (**Figura 12B**). Ao analisarmos o perfil de subclasses de IgG sérico verificamos que a imunização com EDI/II ou EDI/II em combinação com LT-K63 resultou em resposta antígeno-específica com perfil misto Th1/Th2 com tendência para um padrão de resposta do tipo Th2, (**Figura 12C**).

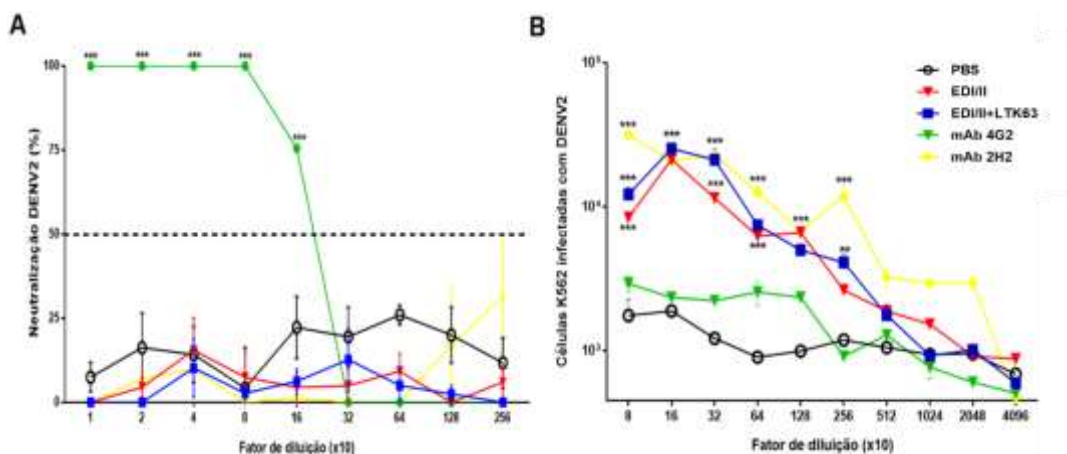


**Figura 11. Avaliação da antigenicidade da proteína recombinante EDI/II por ELISA com amostras de indivíduos.** (A) Soros de indivíduos infectados com os diferentes sorotipos de vírus DENV (DENV1 a DENV4) foram submetidos à análise por ELISA com a proteína EDI/II purificada. As diferenças entre os grupos nos parâmetros avaliados foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de Tukey, onde \*\*\* indica  $p < 0,001$  em relação aos valores de absorbância obtidos com soro de paciente infectado com DENV4; onde \*\*\* indica  $p < 0,001$  em relação aos valores de absorbância obtidos com soro de paciente infectado com DENV1, DENV3 e DENV4. Os valores das absorbâncias foram determinados a partir de 1 experimento. (B) Títulos de anticorpos IgG EDI/II-específicos em soros de indivíduos provenientes de fase aguda (símbolo roxo-claro) ou fase convalescente (símbolo roxo-escuro) de infecção pelo DENV, determinados por ELISA com a proteína EDI/II íntegra ou desnaturada por calor à 100 °C em fase sólida. Os valores dos títulos mostrados foram determinados a partir de 1 experimento.



**Figura 12. Esquema de imunização e análise de respostas humorais EDI/II-específica induzida após imunização.** (A-C) Camundongos BALB/c machos foram imunizados pela via intramuscular com 4 doses de EDI/II (25 µg) ou EDI/II coadministrada com LT-K63 (1 µg). (A) Representação esquemática do protocolo de vacinação. (B) Títulos dos anticorpos IgG anti-EDI/II encontrados nos soros dos animais imunizados após a quarta dose vacinal e determinados por ELISA. (C) Perfil de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a), títulos observados nos soros dos animais após a quarta dose da imunização. Os valores dos títulos foram determinados a partir de 2 experimentos independentes com no mínimo 5 animais por grupo. Os desvios padrões estão mostrados no gráfico e foram calculados a partir das médias de títulos de IgG entre soros das duas imunizações. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de Tukey, onde \* $p < 0,05$  refere-se à comparação com os títulos de IgG anti-EDI/II encontrados no grupo de animais imunizados somente com o antígeno; \*\*\* $p < 0,001$  refere-se a comparações com os títulos de IgG1 EDI/II-específico encontrados no grupo de animais imunizados com somente com o antígeno e em comparação aos títulos de IgG2a anti-EDI/II encontrados no grupo de animais imunizado com o antígeno ou com o antígeno coadministrado com LT-K63; onde \*\* $p < 0,01$ , refere-se à comparação com os títulos de IgG2a anti-EDI/II encontrados no grupo de animais imunizados somente com o antígeno.

Nessa etapa do estudo procuramos determinar se os anticorpos gerados durante a imunização seriam capazes de neutralizar a ligação das partículas virais de DENV2 a receptores presentes nas células Vero. Consideramos como título neutralizante a última diluição dos soros capaz de neutralizar 50 % das unidades formadoras de placas (AMORIM et al., 2012). Para o controle experimental, utilizamos os mAbs 4G2 (anticorpo neutralizante) e o mAb 2H2 (anticorpo não neutralizante) (EPITOPES; CRILL; CHANG, 2004; WANG et al., 2013; WATTERSON et al., 2016). Podemos observar que a imunização com a proteína EDI/II ou em combinação com o adjuvante LT-K63, não gerou a produção de anticorpos com capacidade de neutralizar o DENV2, verificamos que apenas o mAb 4G2 foi capaz de inibir a infecção viral em células Vero, (**Figura 13A**). Após avaliação da capacidade neutralizante dos anticorpos presentes no soro dos animais imunizados em células Vero, buscamos avaliar se esses anticorpos inibiam a infecção em células K562 que apresentam receptores para a porção Fc de anticorpos o fenômeno de ADE). Verificamos que os anticorpos anti-EDI/II, obtidos após imunização com EDI/II ou com o antígeno em combinação com LT-K63, proporcionaram o aumento da infecção viral em células K562 nas primeiras diluições, assim como, o mAb 2H2, (**Figura 13B**). Os resultados demonstram que anticorpos gerados contra o domínio EDI/II, gerado na forma de proteína recombinante produzida em *E. coli*, não foram capazes de neutralizar partículas de DENV2 e promoveram aumento da replicação (ADE) em condições de infecção *in vitro*.



**Figura 13. Avaliação da capacidade neutralizante dos soros de animais imunizados obtidos após administração das diferentes formulações vacinais.** (A e B) Diferentes diluições dos *pools* de soros dos diferentes grupos de imunização ou diferentes concentrações do mAb 2H2 ou mAb 4G2 foram pré-incubados com 200 UFP DENV2 (cepa New Guinea) para ensaio em células Vero ou células K562 (MOI 0,1). Em seguida, a mistura de cada diluição (DENV2 + soro ou mAb) ou apenas o DENV2 foi adicionado nos poços contendo células Vero ou células K562. (A) Ensaio de neutralização por redução de placa (PRNT) em células Vero. A porcentagem de neutralização viral das amostras de soro testadas foi calculada com base na última diluição capaz de reduzir 50% das unidades formadoras de placas (UFP) em relação aos poços incubados apenas com o DENV2. As porcentagens de neutralização foram determinadas a partir de 2 experimentos independentes com no mínimo 5 animais por grupo. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de *Tukey*. Onde \*\*\*  $p < 0,001$ , em comparação ao grupo de animais imunizados com PBS, o antígeno EDI/II sozinho ou em combinação com LT-K63 ou controle com mAb 2H2. (B) Avaliação do aumento da infecção mediada por anticorpos (ADE) em células K562. As células foram marcadas com anticorpo primário mAb 4G2 e anti-IgG mouse conjugado FITC e, posteriormente, avaliadas por citometria de fluxo em aparelho BD LSRFortessa (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram analisados por software FlowJo v10 para determinação da porcentagem de células K562 infectadas por DENV2. Os valores de neutralização e ADE foram determinados a partir de 2 experimentos independentes com no mínimo 5 animais por grupo. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de *Tukey*. Onde \*\*\* $p < 0,001$ , em comparação ao grupo de animais imunizados com o antígeno PBS ou em comparação ao mAb 4G2.

## 4.2 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS INDUZIDAS APÓS IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR COM ANTÍGENOS EDIII E PARTÍCULAS VIRAIS DE DENV2

### 4.2.1 Expressão, purificação e caracterização biológica da proteína recombinante EDIII de DENV2

Para a purificação da proteína EDIII (domínio III da proteína E do envelope do vírus dengue tipo 2), utilizamos a linhagem de *E. coli* BL21 DE3 albergando o plasmídeo pDEDIII. Primeiramente realizamos o teste de expressão da proteína na presença de 0,5 mM do indutor IPTG em diferentes tempos de indução: 2, 4 e 6 h e incubados na temperatura de 37°C. Alíquotas antes e pós-indução foram ajustadas a D.O<sub>600nm</sub> de 4,8 e o padrão de banda foi visualizado em gel de poliacrilamida a 17,5%, (**Figura 14A**). Constatamos que a proteína EDIII é expressa em todos os tempos de indução analisados, apresentando maior expressão após 6 h de indução com IPTG, (**Figura 14A**). Ao analisarmos a proteína expressa nas frações solúvel e insolúvel do extrato bacteriano, evidenciamos que a EDIII é expressa majoritariamente na fração insolúvel sob a forma de corpúsculos de inclusão (dados não mostrados), necessitando de solubilização em tampão contendo ureia. Sendo assim, para purificação da proteína EDIII utilizamos o protocolo de indução com IPTG por 6 h e, após a solubilização dos corpúsculos de inclusão, realizamos a renaturação da proteína em 2 litros de tampão A empregando a técnica de diluição pulsada em velocidade reduzida, como descrito por Amorim e colaboradores (2012). O homogenato foi injetado em coluna de afinidade ao níquel e o processo de eluição foi realizado com gradiente linear de concentração de imidazol (0 – 1M), o cromatograma de purificação da proteína EDIII pode ser visualizado na **Figura 14B**. Observamos que o processo de eluição com imidazol resultou na formação de dois picos: o pico 01, corresponde aos contaminantes eluídos com aproximadamente 200 mM de imidazol, e o pico 02, corresponde à proteína EDIII eluída com 700 mM de imidazol, (**Figura 14B**). A pureza da proteína foi determinada em gel de poliacrilamida a 17,5%, onde podemos evidenciar que a proteína EDIII purificada apresentou peso molecular em torno de 15 kDa, como esperado, (**Figura 14C**).

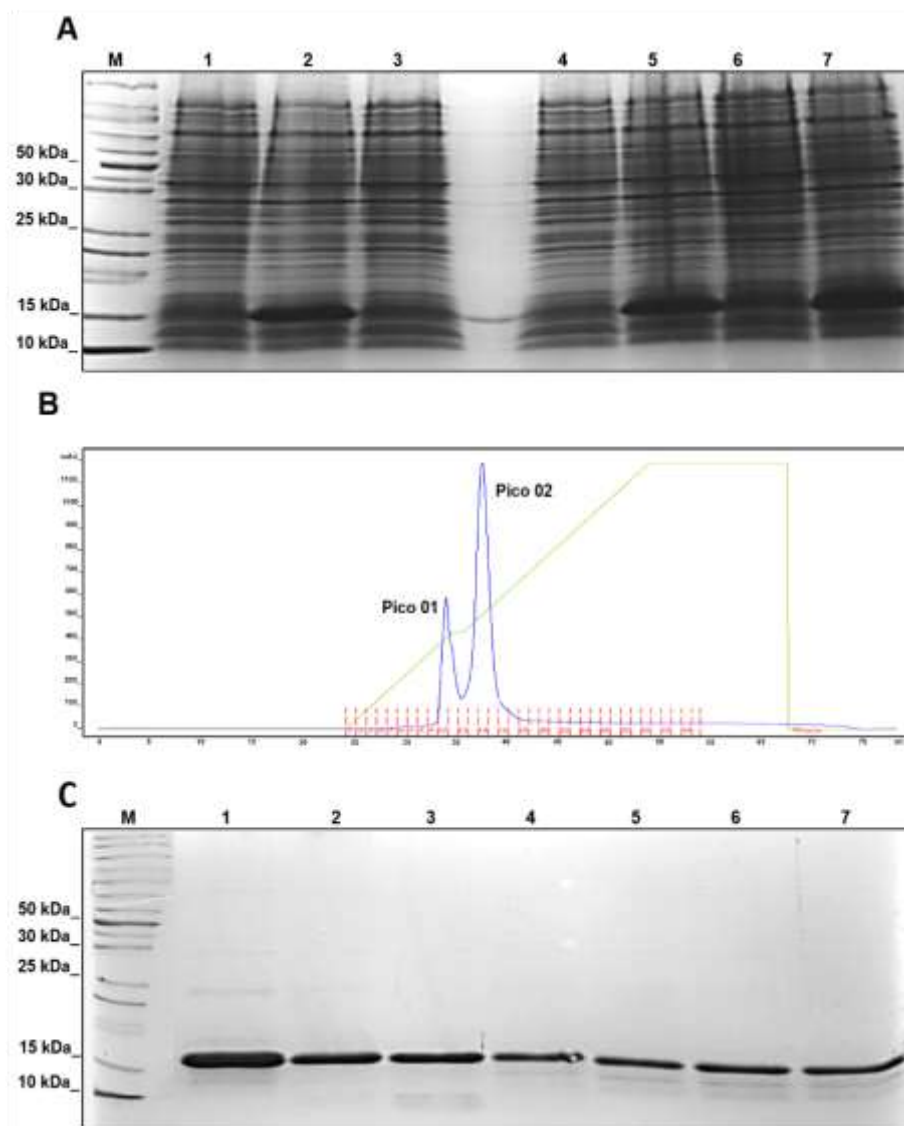
Uma vez que obtida a proteína EDIII purificada, (**Figura 15A**), iniciamos a avaliação da capacidade de interação e competição viral pelos receptores de superfície em células Vero. Para tal, utilizamos a proteína íntegra ou desnaturada por aquecimento a 100°C. Podemos observar que a proteína EDIII foi capaz de interagir com receptores de superfície presente nas células Vero, (**Figura 15B**), bem como inibir a infecção pelo DENV2, (**Figura 15C**). Entretanto quando submetemos a proteína ao processo de desnaturação por calor, evidenciamos



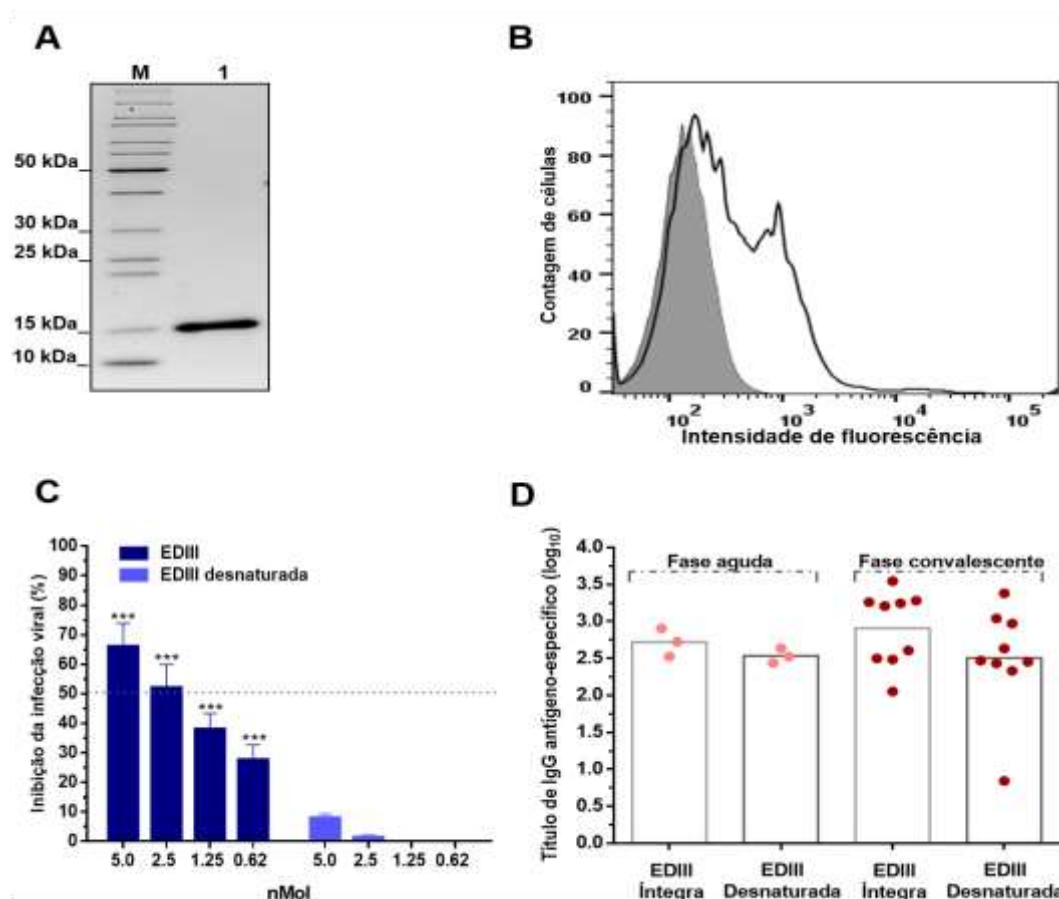
ausência da capacidade de inibição/competição pelos receptores celulares, (**Figura 15B e 15C**). Esses resultados demonstram que, apesar do processo de purificação e renovelamento, a proteína EDIII recombinante mantém atividade biológica, e consequentemente estrutura, semelhante à proteína nativa do DENV2, (**Figura 15B**).

Buscamos também investigar se a proteína recombinante seria reconhecida por anticorpos presentes no soro de indivíduos obtidos na fase aguda ou convalescente da infecção por DENV2, (**Figura 15D**). Constatamos que a proteína EDIII recombinante foi reconhecida por anticorpos IgG presentes nos soros obtidos nas diferentes fases da infecção pelo DENV2, (**Figura 15D**). Observamos ausência de diferença entre a absorvância obtida com a proteína EDIII íntegra ou quando utilizamos a proteína desnaturada por calor nos ensaios de ELISA. Esses resultados indicam que a proteína EDIII recombinante preserva epítomos conformacionais e lineares reconhecidos por anticorpos gerados durante a infecção pelo DENV2.

Para ensaios de imunização a proteína EDIII foi submetida ao tratamento em coluna de poli-lisina para remoção de LPS de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de endotoxina após o tratamento foi inferior a  $< 0,024$  EU/ $\mu$ g de proteína e  $< 3,6$  EU/dose (100  $\mu$ L da formulação vacinal), de acordo ao limite estabelecido para administração em seres humanos por via parenteral (MALYALA; SINGH, 2008).



**Figura 14. Expressão e purificação da proteína EDIII proveniente da solubilização dos corpúsculos de inclusão em tampão contendo ureia 6M.** Células de *E. coli* BL21 DE3 foram transformadas com plasmídeo pET28a-EDIII e avaliadas quanto à expressão da proteína EDIII após a indução com IPTG na temperatura de 37 °C. Purificação da EDIII foi realizada em coluna de afinidade ao níquel. (A) Gel de poliacrilamida a 17,5% carregado com 10 µL de extratos celulares, obtidos antes e após indução da produção de EDIII com 0,5 mM de IPTG, e corado com Coomassie Blue. Amostras: M - marcador de massa molecular (ThermoFisher Scientific PageRuler™ Unstained Protein Ladder); poço 1, 3, 4 e 6, extratos celulares anteriores à indução; poço 2, extrato celular pós-indução de 2 h; poço 5, extrato celular pós-indução de 4 h; poço 7, extrato celular pós-indução de 6 h. (B) Cromatograma da purificação da proteína EDIII em coluna de afinidade ao níquel utilizando gradiente de concentração de imidazol. (D) Gel de poliacrilamida a 12,5 % corresponde à purificação em coluna de afinidade ao níquel da proteína EDIII obtida no pico 2. M – marcador de massa molecular; Amostras: poços 1 a 7, frações de eluição correspondentes ao pico 2 obtido na eluição com 700 mM de imidazol.



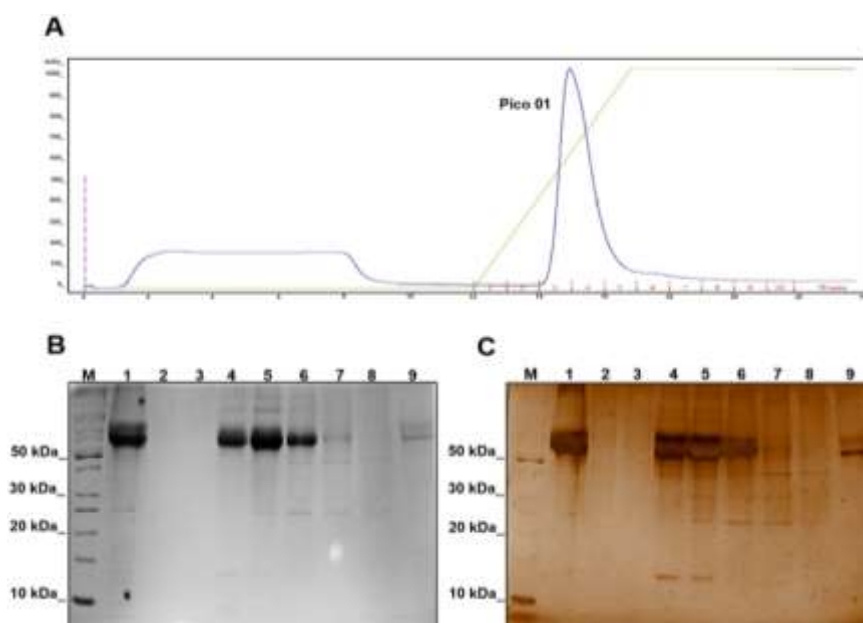
**Figura 15. Avaliação da atividade biológica e antigenicidade da proteína EDIII recombinante.** Análise da capacidade de ligação a receptores presentes na superfície de células Vero e antigenicidade frente a soros de indivíduos. (A) Gel de poliacrilamida a 17,5%, corado com *Comassie blue*, carregado com proteína EDIII purificada após cromatografia por afinidade ao níquel. Amostras: M - marcador de massa molecular (ThermoFisher Scientific PageRuler™ Unstained Protein Ladder); poço 1, proteína EDIII purificada (3 µg). (B) Ensaio de ligação em receptores presentes nas células Vero incubadas com 50 µg da proteína EDIII. As células marcadas foram avaliadas por citometria de fluxo e os resultados obtidos foram analisados por programa FlowJo v10 para determinação do número absoluto de células Vero EDIII-marcadas. Histograma em cinza representa detecção de células expostas à proteína EDIII desnaturada por calor. Histograma em branco representa detecção de células expostas à proteína EDIII íntegra. (C) Ensaio de inibição da infecção por DENV2 em células Vero incubadas com diferentes concentrações da proteína EDIII íntegra ou desnaturada por calor, previamente misturadas com vírus DENV2 (MOI 1,0). As células infectadas foram avaliadas por citometria de fluxo em aparelho BD LSRFortessa (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram analisados por programa FlowJo v10 para determinação da porcentagem de inibição da infecção do DENV2 pela proteína EDIII. (D) Avaliação da antigenicidade da proteína EDIII íntegra ou desnaturada (aquecimento a 100°C) por ELISA com soros de indivíduos em fase aguda (símbolo vermelho-claro) ou em fase convalescente (símbolo vermelho-escuro) de infecção pelo DENV.

#### 4.2.2 Purificação e caracterização biológica da cepa NGC de DENV2

Existem várias metodologias empregadas para a purificação e concentração de partículas virais, dentre elas a mais utilizada é a aplicação de gradiente de sacarose ou tartarato de potássio. Essa técnica é trabalhosa, necessitando de muito tempo para sua execução. Devido a isso, estabelecemos um procedimento simples, que concentra o vírus e é eficiente para a purificação viral permitindo obter de maneira rápida e simples o DENV2 a partir da adaptação de protocolo previamente descrito por Jensen e colaboradores (2016). Para o trabalho de

purificação viral utilizamos sobrenadante de cultura de células C636 infectadas por 7 dias com DENV2. O sobrenadante foi filtrado e submetido a um único passo de purificação utilizado cromatografia de troca aniônica, (**Figura 16**). Para o procedimento de eluição utilizamos um gradiente linear com tampão fosfato de sódio na concentração de 0,6 M. O cromatograma correspondente pode ser observado na **Figura 16A**.

Verificamos que o processo de eluição resultou na presença de um único pico e as frações correspondentes ao pico foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12,5%, (**Figura 16B e 16C**). Como podemos observar, o procedimento de purificação empregado foi eficiente para obtenção do vírus DENV2. Verificamos em ambas as colorações, a banda majoritária com aproximadamente 55 kDa representada pela glicoproteína de envelope viral, (**Figura 16B e 16C**). Também é possível visualizar, na coloração com prata, uma banda de aproximadamente 26 kDa correspondente à proteína prM nas frações mais concentradas, (**Figura 16C**). Após a purificação, a suspensão viral foi quantificada e armazenada em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de utilização.



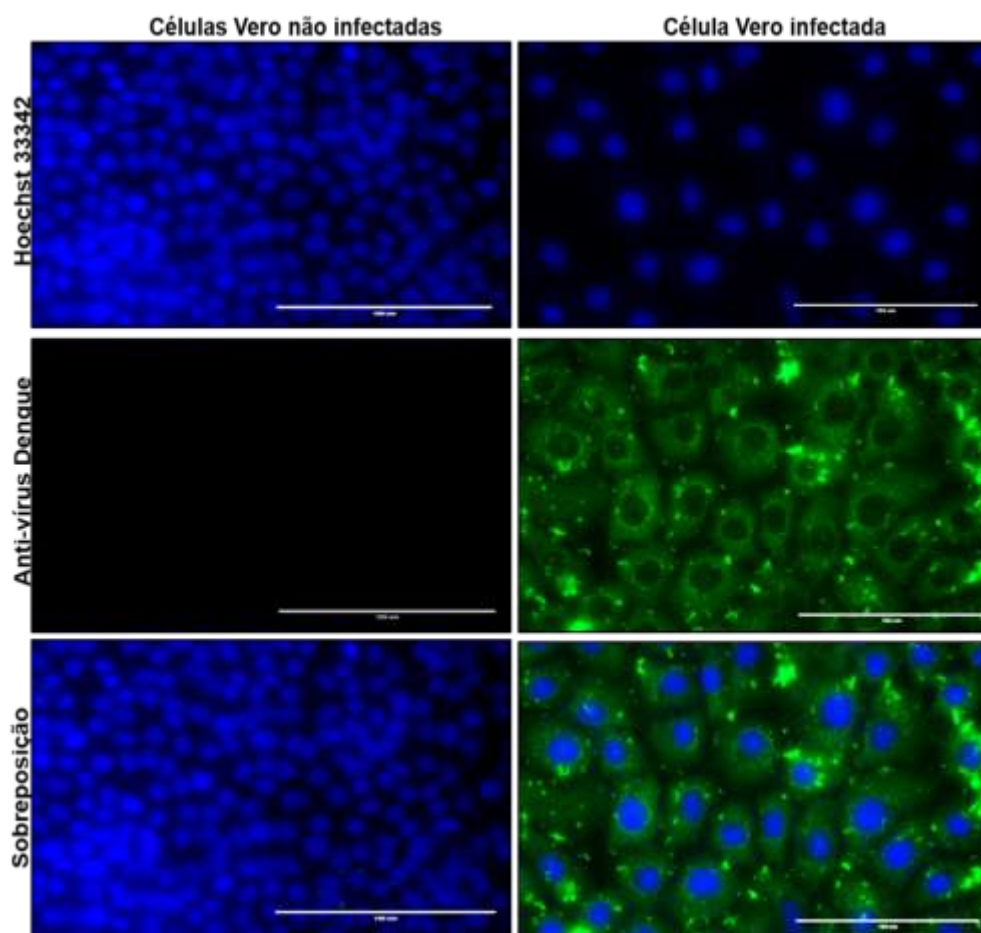
**Figura 16. Purificação do vírus DENV2 em coluna de troca iônica.** Sobrenadante de células C636 infectas por 7 dias com DENV2 foi purificado em akta FPLC (GE Healthcare). (A) Cromatograma da purificação de DENV2 em coluna de troca iônica (AXL GE Healthcare). Pico 1 representa a eluição com 600 mM de tampão fosfato de sódio. (B e C) Géis de poliacrilamida a 12,5% corados com *Coomassie Blue* (B) ou com solução de prata (C). M – marcador de massa molecular (ThermoFisher Scientific PageRuler™ Unstained Protein Ladder); Amostras: poço 1, sobrenadante da cultura de C636 infectada com DENV2 anteriormente a purificação; poços 2 a 8, frações de eluição correspondentes ao pico 1; poço 9, fração correspondente à amostra não ligada à coluna.

Uma vez obtido o DENV2 purificado, avaliamos se as partículas mantinham a capacidade de infectar células Vero. Primeiramente, as células Vero foram incubadas com o DENV2 purificado por 1 h e posteriormente analisadas por imunofluorescência para

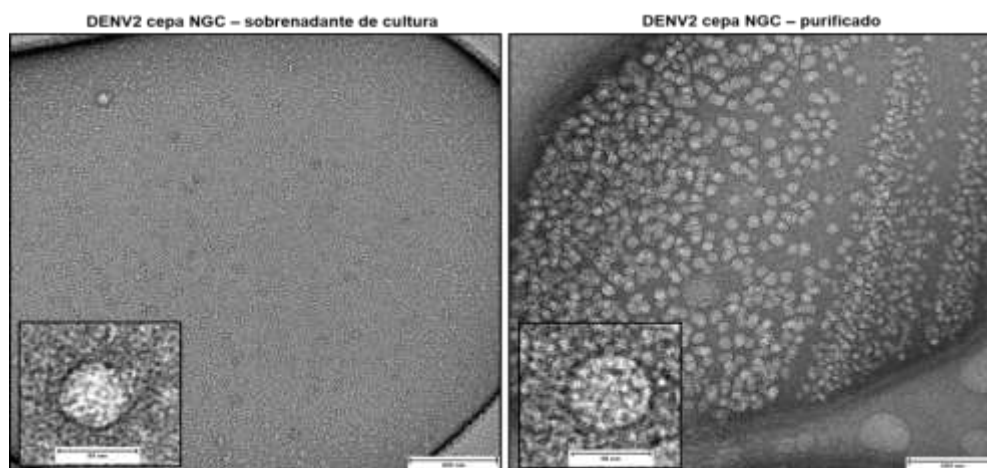
visualização de células infectadas, (**Figura 17**). Como demonstrado, o DENV2 purificado mantém a capacidade de infectar células Vero. Como indicado, podemos visualizar a presença de partículas virais no interior das células constatando que o processo de purificação não afetou a capacidade infectiva do DENV2, (**Figura 17**). Para verificarmos a qualidade do procedimento de purificação do DENV2, procuramos determinar a pureza do vírus após visualização por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando coloração negativa para as amostras de sobrenadante de células C636 infectadas e obtidas antes e após a purificação do vírus, (**Figura 18**). Observamos partículas de DENV2 com tamanho aproximado de 50 nm e em concentração elevada. Esses resultados demonstram que a metodologia estabelecida permite a purificação e concentração de DENV a partir de procedimento simples e rápido.

Subsequentemente buscamos verificar se o procedimento de purificação afeta a antigenicidade do DENV2 por meio de ensaios de ELISA. Definimos a melhor concentração de vírus a ser utilizado, de acordo com protocolo estabelecido por Alwis e colaboradores (2012). Observamos que todas as concentrações de DENV2 utilizadas (50, 100, 200 e 300 ng/poço) empregadas foram reconhecidas por anticorpos IgG DENV2-específico presente no soro de camundongos, entretanto, obtivemos maiores absorvâncias nas concentrações de 200 ou 300 ng/poço em comparação as demais concentrações utilizadas, (**Figura 19A**). Assim, para os ELISAS posteriores utilizamos a concentração de 200 ng/poço de vírus purificado.

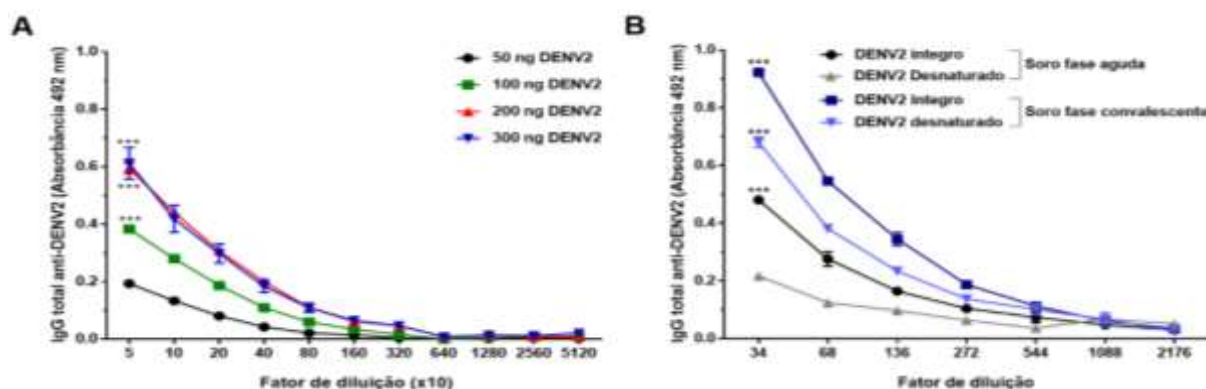
Posteriormente à padronização, analisamos a antigenicidade do DENV2 purificado frente a soros de indivíduos obtidos na fase aguda ou convalescente da infecção por DENV2. De acordo com nossos resultados, verificamos que os anticorpos IgG presentes em soros de indivíduos foram capazes de reconhecer o DENV2 purificado, (**Figura 19B**). Observamos que soros obtidos na fase convalescente apresentaram maior reatividade em relação aos soros obtidos na fase aguda da infecção viral. Quando utilizamos o vírus purificado desnaturado por calor, visualizamos a diminuição do reconhecimento dos anticorpos presentes nos soros de fase convalescente, assim como nas amostras de soro colhidas durante a fase aguda de infecção pelo DENV2.



**Figura 17. Avaliação da capacidade de infecção do DENV2 purificado por ensaio de imunofluorescência em células Vero.** Células Vero foram incubadas por 48 h com o vírus DENV2 purificado. Posteriormente à marcação, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Evos FL Thermo Scientific). O vírus foi marcado com mAb 4G2 e com anticorpo anti-IgG conjugado com FITC (fluorescência verde). Os núcleos das células Vero foram marcados com Hoechst 33342 (fluorescência azul). Aumento de 100 X.



**Figura 18. Microscopia eletrônica de transmissão do DENV2 purificado.** Amostras de sobrenadante de cultura e amostras de DENV2 (NGC) purificados foram marcadas por coloração negativa com 1% de acetato de uranila e analisadas em microscópio de transmissão TEM-MSC (JEOL-2100). Magnificação final de 125.000x



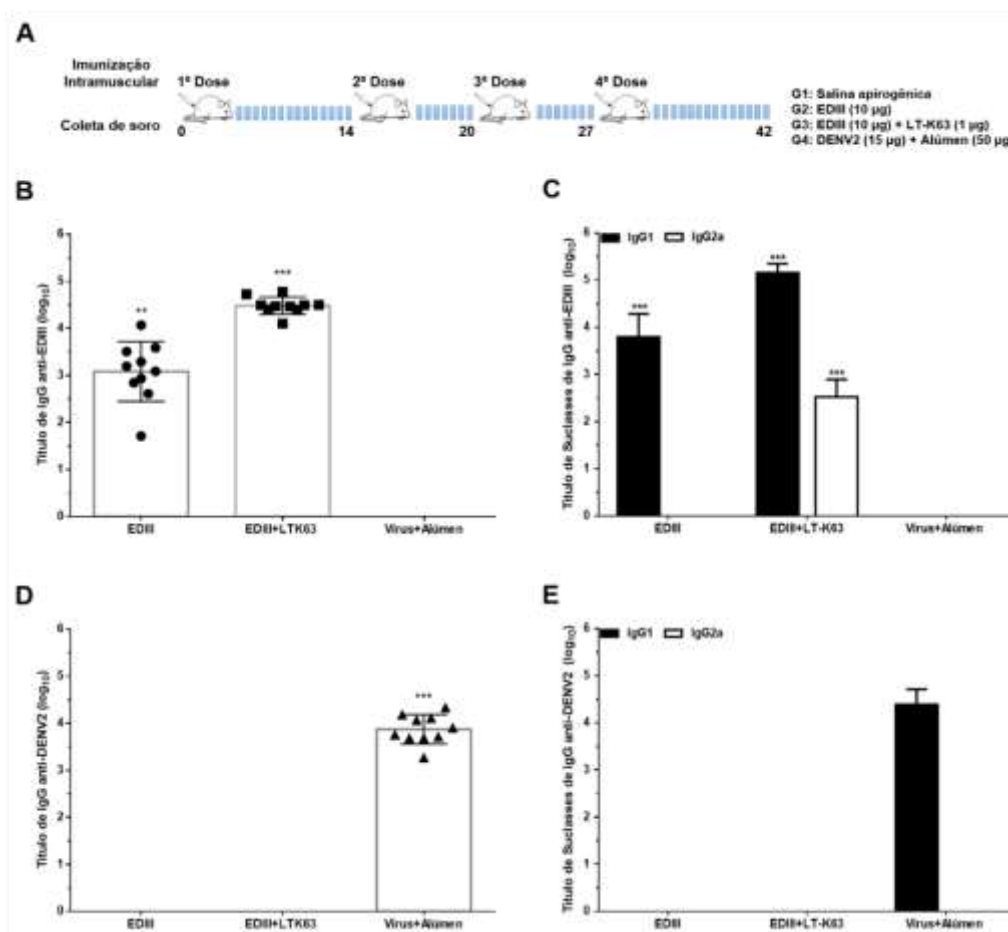
**Figura 19. Avaliação da antigenicidade do DENV2 purificado com amostras de soro de indivíduos infectados.** (A) Padronização de ELISA foi feita com diferentes quantidades de DENV2 purificado (50, 100, 200 e 300 ng/poço) para sensibilização das microplacas. (B) DENV2 purificado (200 ng/poço), inteiro ou desnaturado (aquecimento a 100 °C), foi utilizado para sensibilização de placas em ELISA e testadas com soros de indivíduos de fase aguda ou convalescente após infecção com DENV. As diferenças entre os parâmetros avaliados foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de *Tukey*. (A) \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em comparação à sensibilização com 50 ng/poço do vírus DENV2 purificado ( $p < 0,001$ ). (B) \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em comparação à absorbância obtida com soro de paciente de fase aguda utilizando DENV2 desnaturado ( $p < 0,001$ ). Os valores de absorbância para ambos os ensaios foram determinados a partir de 1 experimento.

#### 4.2.3 Ensaio de imunização e avaliação da resposta humoral anti-EDIII e anti-DENV2

Uma vez que obtidos os antígenos EDIII e DENV2 purificados, iniciamos experimentos de imunização com camundongos BALB/c. Os animais foram distribuídos em 4 grupos e submetidos ao regime vacinal conforme apresentado na **Figura 20A**. Como podemos verificar, a administração da proteína EDIII com LT-K63 como adjuvante proporcionou maiores títulos de anticorpos IgG EDIII-específicos em relação aos animais imunizados somente com o antígeno, (**Figura 20B**). Visualizamos que os anticorpos IgG gerados durante a administração, dessas formulações não foram capazes de reconhecer o antígeno DENV2 empregado no ELISA, (**Figura 20D**). De forma semelhante, a formulação vacinal contendo DENV2 com Alúmen como adjuvante, não induziu a produção de anticorpos IgG capazes de reconhecer a proteína EDIII recombinante, (**Figura 20B**) mas que foram reativos com as partículas de DENV2, (**Figura 20D**). Entretanto em ensaio de Elisa com a proteína EDIII ou vírus DENV2 purificado desnaturados por calor, observamos a capacidade de ligação dos anticorpos à epítomos lineares dos antígenos empregados desnaturados (dados não mostrados).

Com relação ao perfil de respostas imunológicas desencadeadas durante a imunização, verificamos que os animais imunizados somente com o antígeno apresentaram resposta humoral anti-EDIII indicativa para o perfil Th2, (**Figura 20C**). O mesmo perfil de resposta foi visto em animais imunizados com DENV2 coadministrado com Alúmen como adjuvante, (**Figura 20E**). Por outro lado, a imunização com EDIII combinado com LT-K63 apresentou uma resposta

humoral EDIII-específica indicativa para um perfil misto, Th1/Th2, com tendência para um padrão de resposta do tipo Th2, (**Figura 20C**). Semelhante ao observado anteriormente, animais imunizados com as formulações contendo EDIII sozinha ou em combinação com LT-k63, não induziram IgG capazes de reconhecer o DENV2, (**Figura 20E**), bem como o soro dos animais que receberam DENV2 com Alúmen não reagiram com a proteína EDIII, (**Figura 20C**).



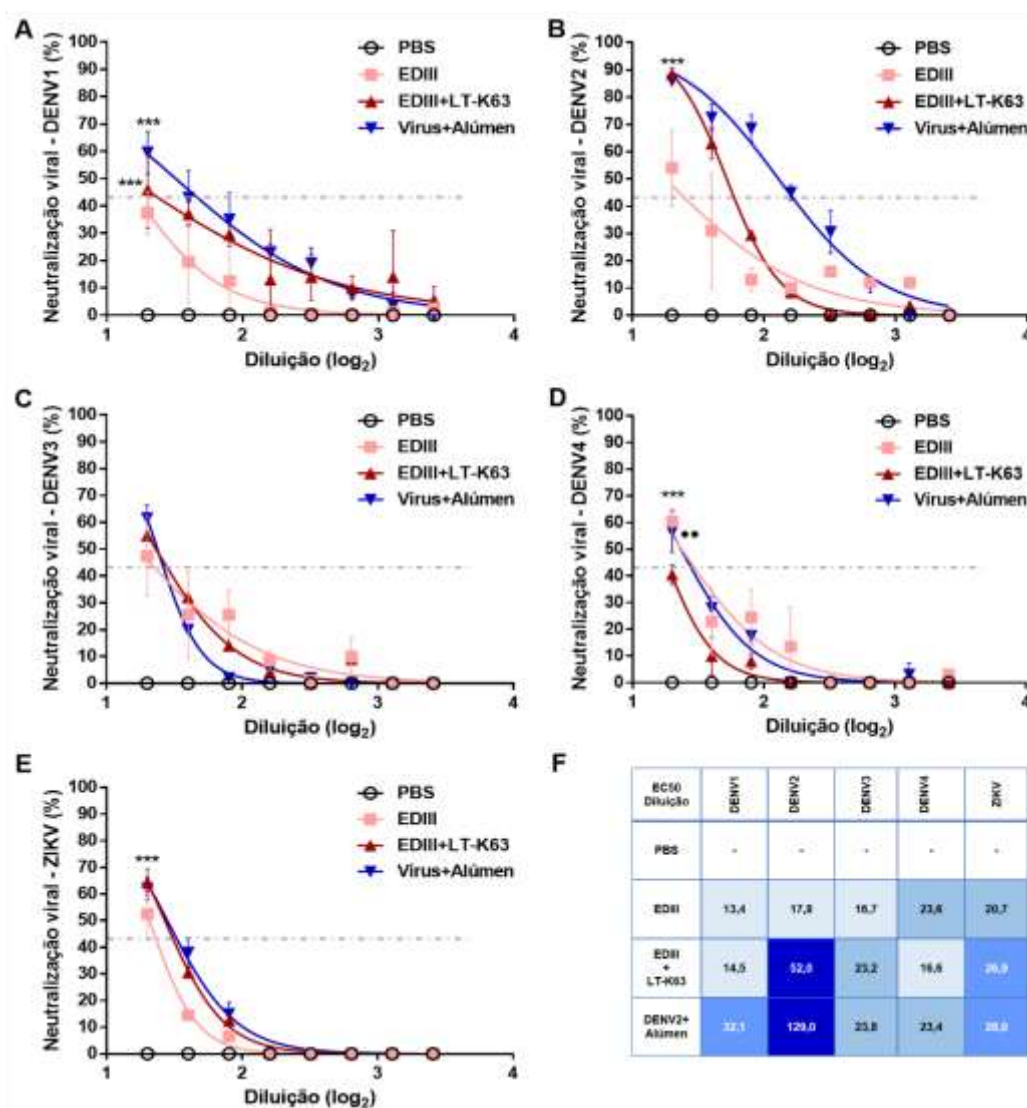
**Figura 20. Esquema de imunização e análise da resposta humoral anti-EDIII e anti-DENV2 em camundongos imunizados.** (A a F) Camundongos BALB/c machos foram imunizados pela via intramuscular com 4 doses de EDIII (10 µg) ou EDIII coadministrada com LT-K63 (1 µg), ou DENV2 (15 µg) coadministrado com Alúmen (50 µg). (A) Representação esquemática do protocolo de vacinação. (B) Títulos dos anticorpos IgG anti-EDIII encontrados nos soros dos animais imunizados após a quarta dose vacinal, e determinados por ELISA. (C) Perfis de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) observados nos soros dos animais após a quarta dose da imunização. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de *Tukey*. (B) \*\*\* indica diferença em comparação ao título de IgG anti-EDIII encontrado no grupo de animais imunizados com EDIII ( $p < 0,001$ ); \*\* indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao título de IgG anti-EDIII encontrado no grupo de animais imunizados com DENV2 coadministrado com Alúmen ( $p < 0,01$ ). (C) \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em comparação aos títulos de IgG1 e IgG2a anti-EDIII encontrados no grupo de animais imunizados somente com o antígeno, ou o antígeno coadministrado com LT-K63, ou o grupo de animais imunizados com DENV2 e Alúmen ( $p < 0,001$ ). (D) Títulos dos anticorpos IgG anti-DENV2 em soros dos animais imunizados após a quarta dose vacinal. (E) Perfil de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) observados nos soros dos animais após a quarta dose da imunização. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de *Tukey*, (D) \*\*\* $p < 0,001$ , em comparação ao título de IgG anti-DENV2 encontrado no grupo de animais imunizados com EDIII ou EDIII em combinação com LT-K63. Os valores dos títulos foram determinados a partir de 2 experimentos independentes com no mínimo 10 animais por grupo. Os desvios padrões estão mostrados nos gráficos e foram calculados a partir das médias de títulos de IgG ou subclasses de IgG entre imunizações com as diferentes formulações vacinais.



#### 4.2.4 Avaliação da capacidade de soroneutralização em ensaio *in vitro* e *in vivo*

Nesta fase do estudo, buscamos analisar se os anticorpos produzidos com as diferentes formulações vacinais seriam capazes de neutralizar a infecção pelos diferentes tipos de DENV (DENV1 a DENV4) e ZIKV em células Vero. Consideramos o título neutralizante a última diluição capaz de neutralizar 50 % das unidades formadoras de placas (AMORIM et al., 2012). Podemos observar que os soros dos animais imunizados com DENV2 coadministrado com o adjuvante Alúmen ou EDIII em combinação com LT-K63 como adjuvante, apresentam maior capacidade de neutralização de DENV1, DENV2 e ZIKV, em comparação aos soros dos animais imunizados apenas com EDIII, (**Figura 21A, 21B, 21E e 21F**). Verificamos que para a neutralização de DENV4, os anticorpos presentes no soro após a administração de EDIII ou DENV2 administrado com Alúmen apresentaram maior neutralização viral em comparação ao soro dos animais imunizados com EDIII administrada com LT-K63, (**Figura 21D e 21F**). Com relação à atividade neutralizante para o DENV3, constatamos que os soros induzidos durante a administração das diferentes formulações vacinais (EDIII, EDIII+LT-K63 e DENV2+Alúmen) apresentaram capacidade de neutralização viral semelhantes, (**Figura 21C e 20F**). As informações referentes às diluições capazes de inibir 50% da infecção pelos vírus foram medidas pelos cálculos de EC50, como apresentado na **Figura 21F**.

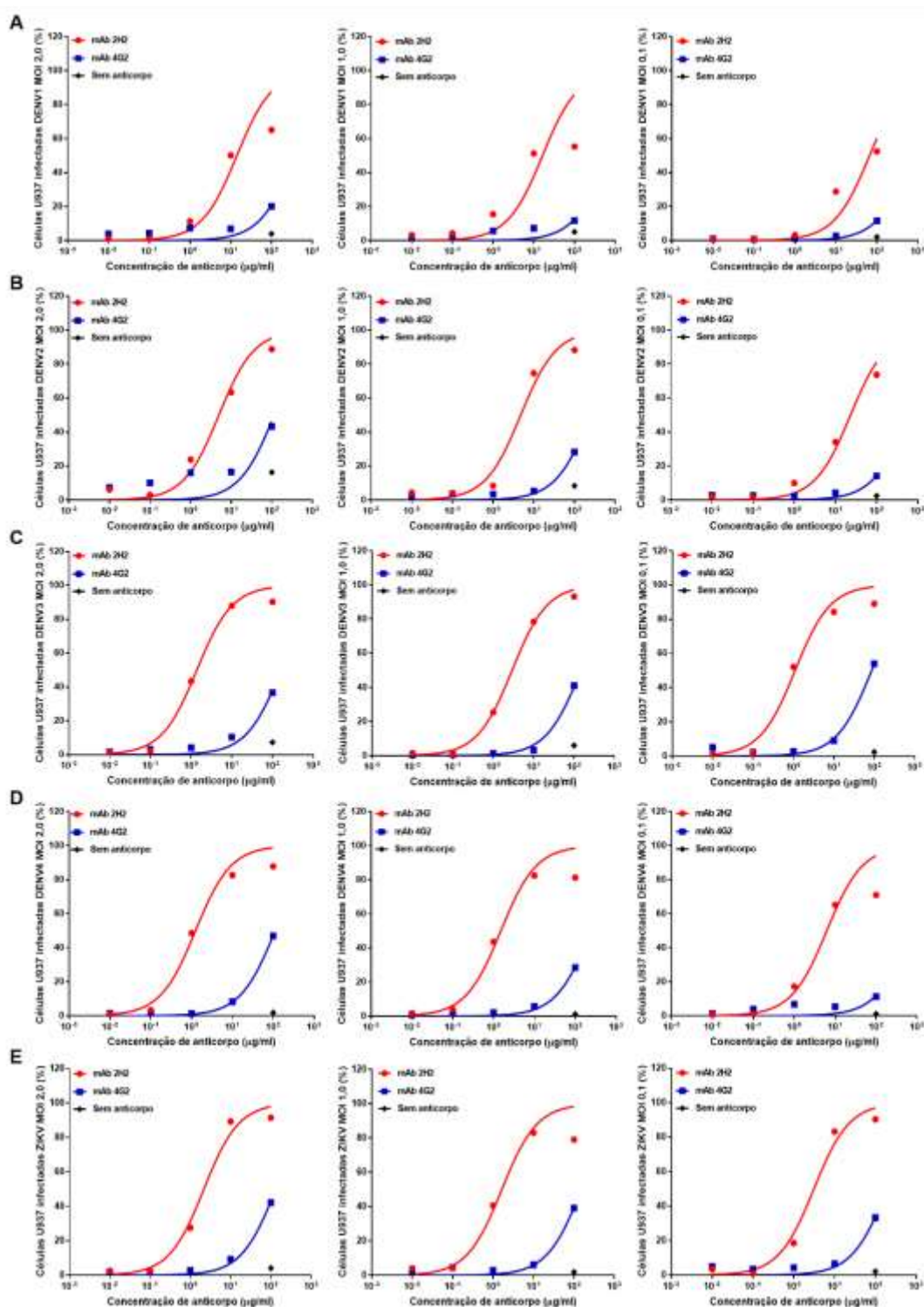
Em seguida, procuramos verificar se os anticorpos presentes no soro dos animais imunizados eram capazes de neutralizar a infecção por cada um dos quatro tipos de DENV (DENV1 a DENV4) e ZIKV em células U937 sem promoverem a exacerbação da infecção viral (fenômeno de ADE), uma vez que essa linhagem celular apresenta receptores para a porção Fc dos anticorpos. Primeiramente realizamos a padronização da MOI necessária (2,0, 1,0 e 0,1) dos vírus DENVs e ZIKV para o ensaio de ADE. Para isso, os mAbs 2H2 e 4G2 foram diluídos e misturados com as respectivas concentrações de vírus testadas. Como visto na **Figura 22**, verificamos que os mAbs 2H2 e 4G2 foram capazes de promover aumento da infecção em todas as concentrações de vírus testadas, (**Figura 22A – 22E**). Para avaliação com as amostras de soro dos animais imunizados empregamos a MOI de 0,1 para todos os vírus analisados.



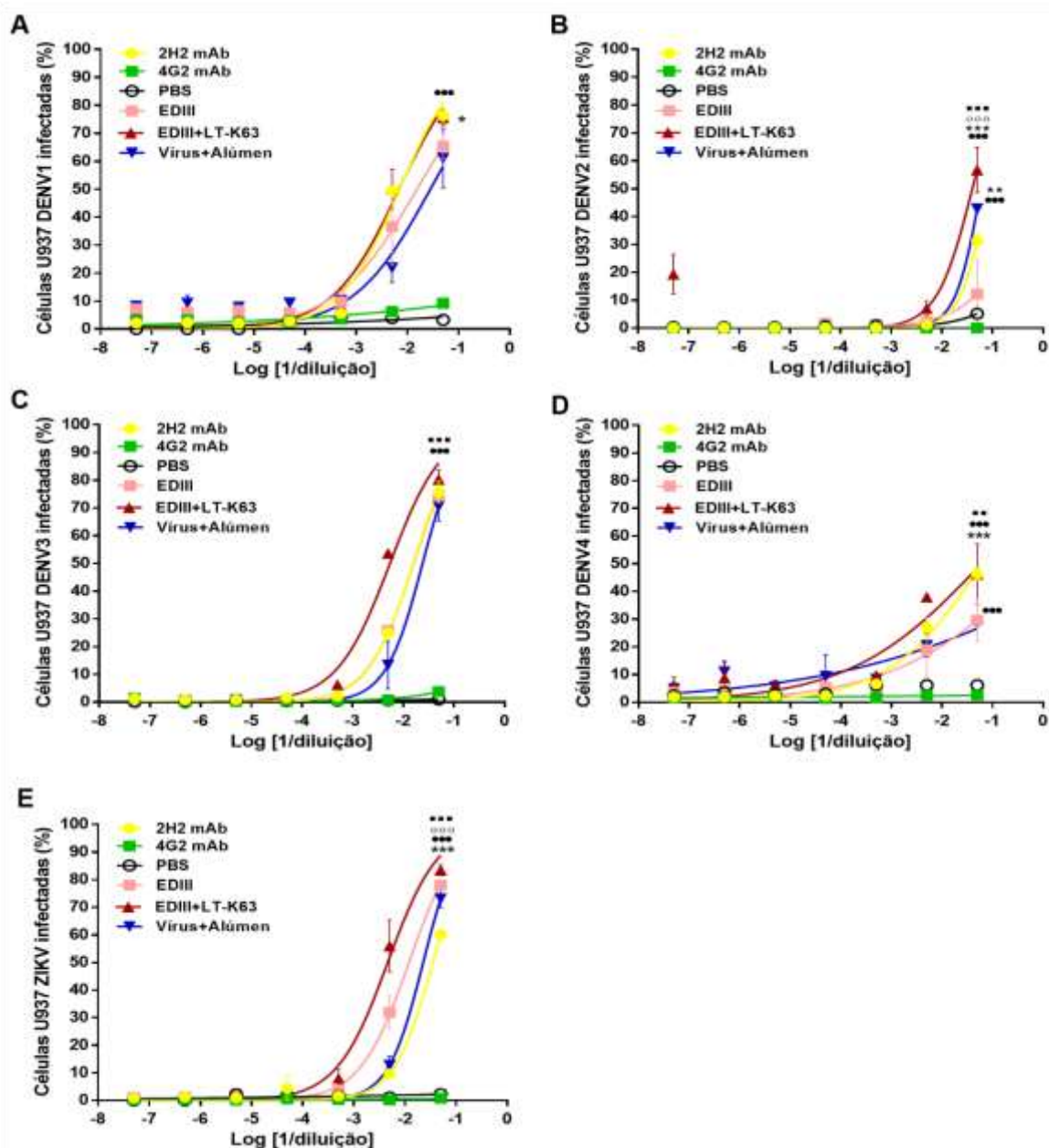
**Figura 21. Avaliação da capacidade neutralizante de soros de animais imunizados com as diferentes formulações vacinais.** (A a F) Diferentes diluições do pool de soros de cada grupo de imunização foram pré-incubadas com (A) 200 UFP de DENV1 (GeneBank: JX669467), (B) 200 UFP de DENV2 (New Guinea GeneBank: AHG97599.1), (C) 200 UFP de DENV3 (GeneBank: KC425219), (D) 150 UFP de DENV4 (GU289913.1), (E) 200 UFP de ZIKV (ZIKV<sup>BR</sup>), por 30 min., em seguida, as misturas de cada diluição (Vírus + soro) ou apenas o vírus foram adicionados a poços contendo células Vero. As células Vero infectadas foram incubadas por diferentes períodos em estufa de CO<sub>2</sub>: DENV1 (10 dias), DENV2 (7 dias), DENV3 (7 dias) DENV4 (5 dias), ZIKV (5 dias). (F) As concentrações efetivas de inibição de 50% (EC50) dos soros obtidos nas imunizações para cada vírus analisado foram determinadas por análise de curva de regressão não-linear (Graphpad Prism software). As porcentagens de neutralização viral das amostras de soro testados foram calculadas com base na última diluição capaz de reduzir 50% da UFP em relação aos poços incubados apenas com o vírus. As porcentagens de neutralização foram determinadas a partir de 2 experimentos independentes com no mínimo 10 animais por grupo. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados foram determinadas por *two way* ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de *Tukey*. (A, B e E) \*\*\*  $p < 0,001$ , em comparação ao grupo de animais imunizados com o antígeno EDIII sozinho. (D) \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$  em comparação ao grupo de animais imunizados com o antígeno coadministrado com LT-K63.

Inicialmente, buscamos identificar as células U937 infectadas por citometria de fluxo, (Figura 23). Constatamos que os soros obtidos dos animais imunizados com as diferentes formulações vacinais proporcionaram, em determinadas diluições, aumento da infecção pelos diferentes vírus utilizados (DENV1 a DENV4 e ZIKV) em comparação aos controles PBS e

mAb 4G2, (**Figura 23**). Dentre os grupos vacinais, amostras de soro de animais imunizados com EDIII apresentaram menor capacidade de promover a exacerbação da infecção para DENV2, DENV4 e ZIKV, em comparação às amostras colhidas de animais imunizados com EDIII coadministrada com LT-K63 ou DENV2 coadministrado com Alúmen, (**Figura 23B, 23D e 23E**). O soro dos animais imunizados com EDIII combinado com LT-K63 apresentou maiores percentuais de células U937 infectadas por DENV2, DENV3, DENV4 e ZIKV em comparação aos soros gerados após administração de DENV2 em combinação com Alúmen como adjuvante, (**Figura 23B, 23C, 23D e 23E**), bem como em relação ao controle mAb 2H2, (**Figura 23B e 23E**).

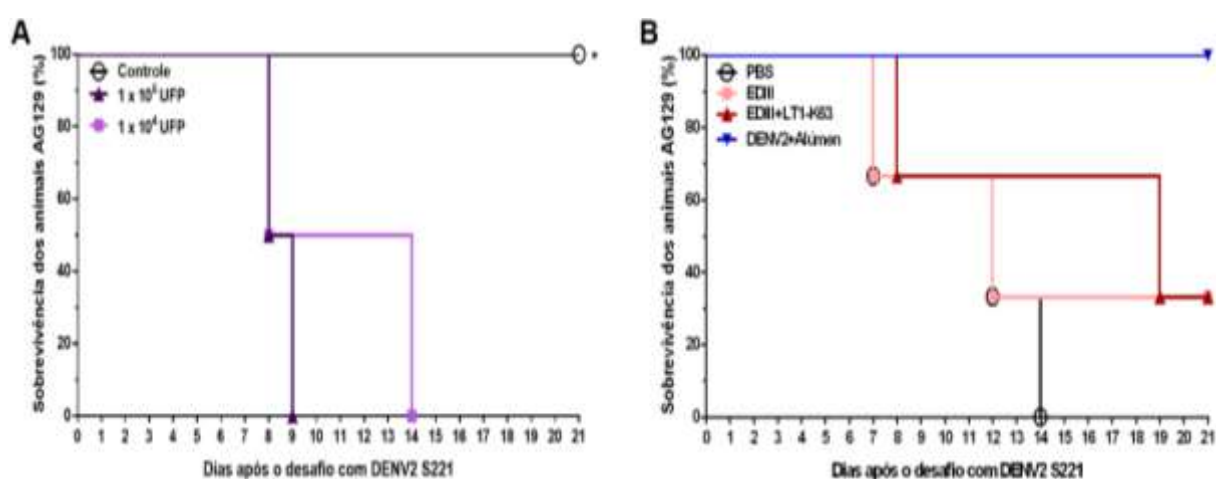


**Figura 22. Padronização do ensaio de ADE em células U937 com os diferentes sorotipos de DENV e ZIKV.** (A a E) Células U937 foram incubadas com diferentes concentrações do mAb 2H2, específico para proteína prM de DENV2 e o mAb 4G2 (ATCC), específico para EDI/II (loop de fusão) de flavivírus, previamente misturadas com diferentes MOIs (2,0; 1,0; 0,1) de (A) DENV1 (GeneBank: JX669467), (B) DENV2 (New Guinea GeneBank: AHG97599.1), (C) DENV3 (GeneBank: KC425219), (4) DENV4 (GU289913.1), (E) ZIKV (ZIKV<sup>BR</sup>). As células marcadas com mAb 4G2 e com anticorpo anti-IgG mouse conjugado com Alexa 488 (BD Bioscience) foram avaliadas por citometria de fluxo em aparelho BD LSRFortessa (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram analisados por software FlowJo v10 para determinação da porcentagem de células U937 infectadas.



**Figura 23. Ensaio de ADE em células U937 para os quatro sorotipos de DENV e ZIKV por citometria de fluxo.** (A a F) Diferentes diluições do *pool* de soros de cada grupo de imunização, ou diferentes concentrações do mAb 2H2, ou mAb 4G2 foram incubadas com MOI 0,1 de (A) DENV1 (GeneBank: JX669467), (B) DENV2 (New Guinea GeneBank: AHG97599.1), (C) DENV3 (GeneBank: KC425219), (D) DENV4 (GU289913.1), (E) ZIKV (ZIKV<sup>BR</sup>). Em seguida, as misturas com cada diluição (Vírus + soro ou mAbs) ou apenas o vírus, foram adicionados aos poços contendo células U937. As células U937 foram marcadas com o mAb 4G2 e o anticorpo anti-IgG mouse conjugado com Alexa 488 (BD Bioscience). As células U937 marcadas foram avaliadas por citometria de fluxo em aparelho BD LSRFortessa (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram analisados por software FlowJo v10 para determinação da porcentagem de células U937 infectadas. As porcentagens de ADE foram determinados a partir de 2 experimentos independentes com no mínimo 10 animais por grupo. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de *Tukey*. (A) \* $p < 0,05$ , em comparação ao grupo de animais imunizados com DENV2 + Alúmen. (B, D e E) \*\*\* $p < 0,001$ , em comparação ao grupo de animais imunizados com o antígeno EDIII. (B) \*\* $p < 0,01$ , em comparação ao grupo de animais imunizados com o antígeno EDIII. (B, C e E) \*\*\* $p < 0,001$  em comparação ao grupo de animais imunizados com DENV2 + Alúmen. (D) \*\* $p < 0,01$  em comparação ao grupo de animais imunizados com DENV2 + Alúmen. (A – E) \*\*\* $p < 0,001$ , em comparação ao controle PBS ou mAb 4G2. (B e E) \*\*\* $p < 0,001$ , em comparação ao mAb 2H2.

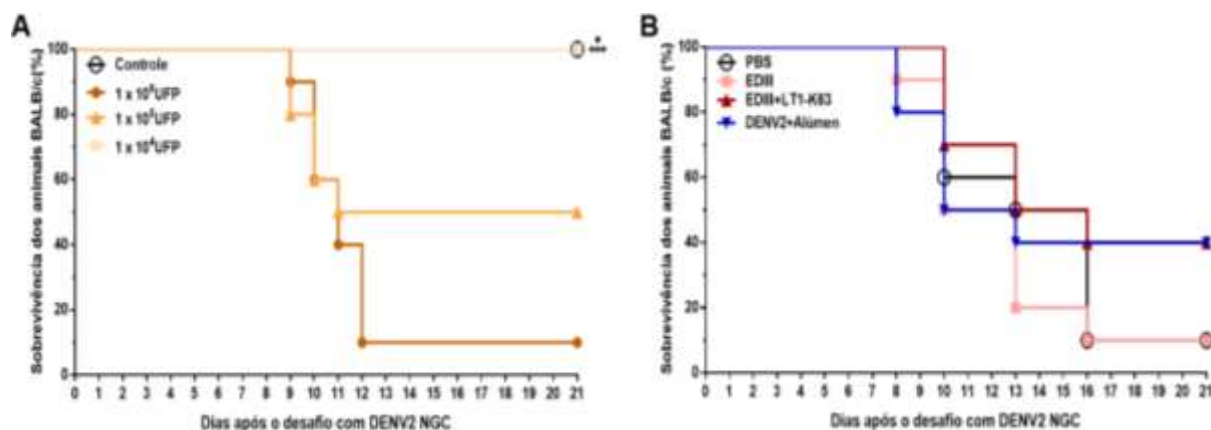
Com intuito de determinar *in vivo* a eficácia dos anticorpos presentes nos soros testados, primeiramente buscamos avaliar a dose letal em animais AG129 pré-ímmunes e nocautes para os receptores de interferon (rIFN) rIFN- $\alpha$ , rIFN - $\gamma$ , e rIFN - $\beta$ . Para o desafio utilizamos o vírus DENV2 cepa S221 administrado pela via intravenosa, (**Figura 24**). Em ambas as doses administradas, verificamos 100% de letalidade, a partir do dia 9 após o desafio, enquanto que a dose  $1 \times 10^4$  UFP proporcionou a letalidade completa no dia 14, (**Figura 24A**). Para os ensaios de soroneutralização, verificamos que soros provenientes de animais imunizados com a formulação contendo DENV2 purificado em combinação com o adjuvante Alúmen proporcionou 100% de sobrevivência após o desafio em comparação aos soros derivados dos demais grupos de imunização, (**Figura 24B**). Os animais AG129 que receberam o vírus S221 combinado com soro proveniente da imunização com a proteína EDIII, isolada ou coadministrada com LT-K63, apresentaram cerca de 35% de proteção, (**Figura 24B**). Animais inoculados com o vírus S221 juntamente com soro obtido de animais não imunizados (PBS) comportaram-se de maneira semelhante ao grupo controle de AG129 que recebeu apenas o vírus S221, (**Figura 24B**).



**Figura 24. Avaliação da capacidade de neutralização viral de soros dos animais imunizados.** (A) Animais AG129 foram inoculados com vírus DENV2 da cepa S221 ( $1 \times 10^4$  ou  $1 \times 10^5$  UFP/animal) pela via intravenosa e acompanhados por 21 dias para a determinação da porcentagem de sobrevivência. As porcentagens de sobrevivência foram determinadas a partir de 1 experimento com no mínimo 5 animais por grupo. As diferenças entre os grupos de infecção para os parâmetros avaliados foram determinadas por *Survival curve* e posterior teste de *Mantel Cox*, onde  $*p < 0,05$ , em comparação ao grupo de animais que recebeu a dose de  $1 \times 10^4$  UFP/animal. (B) Ensaio de neutralização viral *in vivo* com soros dos diferentes grupos vacinais. Os soros foram diluídos 1:20 e misturados com  $1 \times 10^4$  UFP/animal de vírus S221 e, posteriormente, administrados nos animais AG129 pela via intravenosa. As porcentagens de sobrevivência foram determinadas após 21 dias de acompanhamento. As porcentagens de sobrevivência foram determinadas a partir de 2 experimentos independentes com no mínimo 5 animais por grupo. As diferenças entre os grupos para os parâmetros avaliados foram determinadas por *Survival curve* e posterior teste de *Mantel Cox*, onde  $*p < 0,05$ , em comparação ao grupo que recebeu soro de animal do grupo de imunização com PBS.

#### 4.2.5 Avaliação da capacidade de proteção induzida pela imunização

Para determinação da capacidade protetora promovida pelas diferentes formulações vacinais, definimos a dose letal 90 (DL<sub>90</sub>) em animais BALB/c desafiados pela via intracraniana com diferentes quantidades ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFP/dose) do vírus DENV2 cepa NGC. Como podemos observar na **Figura 25A**, animais que receberam a menor dose de vírus ( $1 \times 10^4$  UFP/dose) não apresentaram letalidade. O grupo de animais que recebeu a dose de  $1 \times 10^5$  UFP apresentou cerca de 50% de letalidade, enquanto que os animais desafiados com a dose de  $1 \times 10^6$  UFP apresentaram 90% de letalidade, (**Figura 25A**). Desta forma, para avaliação da eficácia protetora das diferentes formulações vacinais, os animais foram desafiados 15 dias após a última dose vacinal com  $1 \times 10^6$  UFP/animal do vírus NGC e a sobrevivência acompanhada por 21 dias, (**Figura 25B**). Verificamos que os animais que receberam PBS ou imunizados com o antígeno EDIII apresentaram cerca de 10% de sobrevivência. Os animais imunizados com EDIII coadministrada com o adjuvante LT-K63 e os animais imunizados com o DENV2 combinado com Alúmen apresentaram cerca de 40% de sobrevivência, (**Figura 25B**).



**Figura 25. Ensaio de desafio dos animais imunizados com DENV2 (NGC).** (A) Animais BALB/c machos foram anestesiados e posteriormente inoculados com diferentes doses de vírus DENV2 cepa NGC ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  ou  $1 \times 10^6$  UFP/animal) pela via intracraniana. Os animais foram acompanhados por 21 dias para determinação da DL<sub>90</sub>. As porcentagens de sobrevivência foram determinadas a partir de 1 experimento com no mínimo 10 animais por grupo. As diferenças entre os grupos de infecção para os parâmetros avaliados foram determinadas por *Survival curve* e posterior teste de *Mantel Cox*. (A) \*\*\* $p < 0,001$ , em comparação ao grupo de animais que recebeu a dose de  $1 \times 10^6$  UFP/animal; onde \* $p < 0,05$ , em comparação ao grupo que recebeu a dose de  $1 \times 10^5$  UFP/animal. (B) Quinze dias após a 4 dose vacinal, os animais BALB/c machos foram anestesiados e desafiados pela via intracraniana com  $1 \times 10^6$  UFP/animal de DENV2 (NGC). Os animais foram acompanhados por 21 dias para determinação das porcentagens de sobrevivência após o desafio letal. As porcentagens de sobrevivência foram determinadas a partir de 1 experimento com no mínimo 10 animais por grupo.

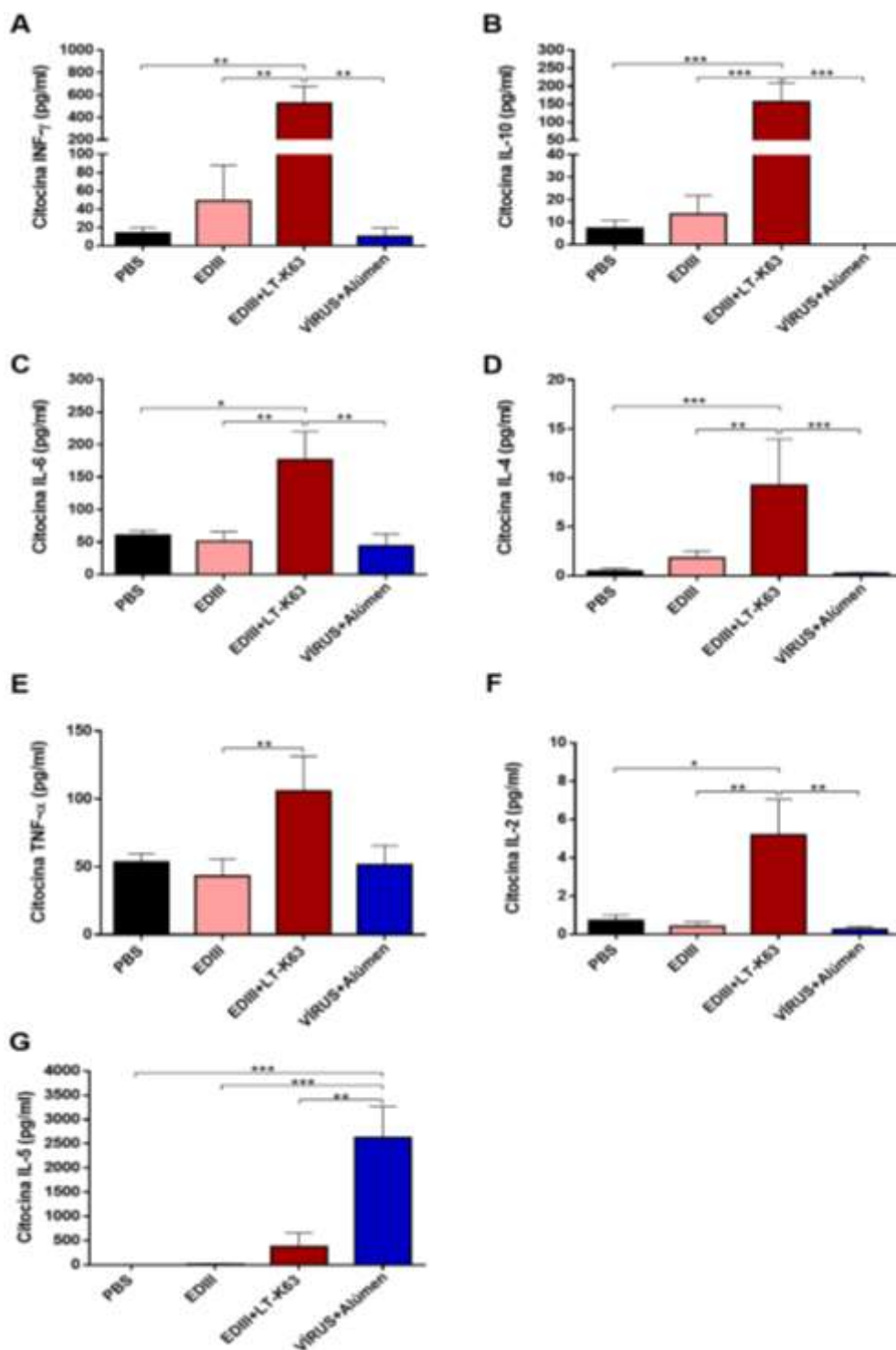
#### 4.2.6 Análise das respostas celulares antígeno-específica nos animais imunizados

Após avaliarmos a resposta humoral induzida pela administração das diferentes formulações vacinais, procuramos caracterizar as respostas celulares antígeno-específicas

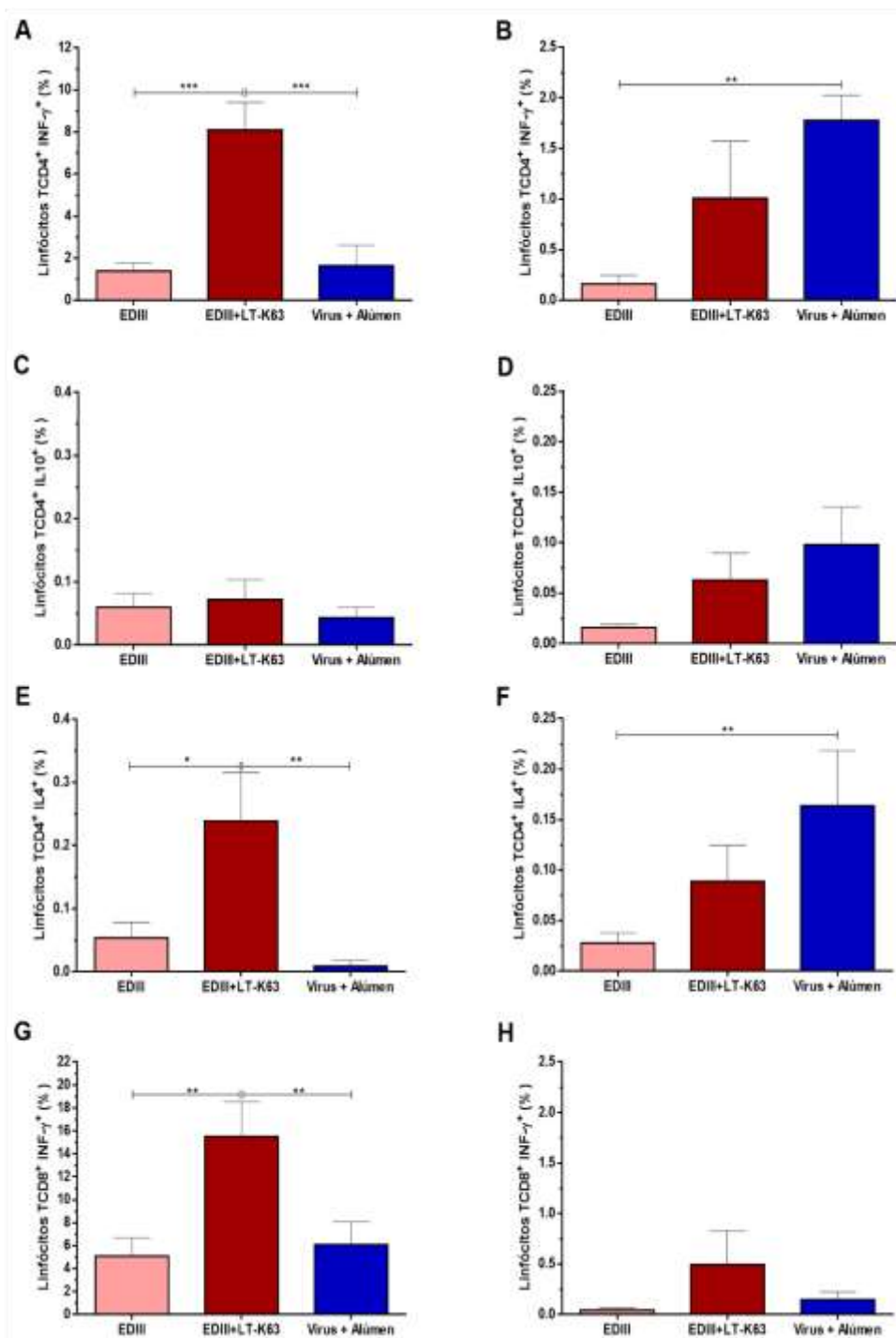
proporcionadas pelas imunizações. Para essa avaliação, 15 dias após a última dose vacinal os animais foram eutanasiados, os baços removidos, processados para obtenção dos esplenócitos que, por sua vez, foram re-estimulados *in vitro* com os antígenos EDIII ou DENV2 purificado. Inicialmente procuramos analisar a modulação de citocinas secretadas pelos esplenócitos re-estimulados com o antígeno EDIII, (**Figura 26**). Como podemos verificar na **Figura 26G**, o grupo de animais imunizados com o antígeno DENV2 purificado coadministrados com Alúmen como adjuvante vacinal, apresentou aumento na produção de IL-5 após estimulação com a proteína EDIII em comparação aos demais grupos vacinais. Diferenças nos níveis de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 foram observadas, mas não atingiram significância estatística, (**Figuras 26A, 26C, 26E e 26F**). Verificamos que a administração do antígeno EDIII levou à produção de aumentada de INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, mas em concentrações inferiores ao observado com esplenócitos obtidos de baços de animais imunizados com EDIII combinada com LT-K63, (**Figuras 26A – 26F**). A imunização com o antígeno EDIII coadministrado com o adjuvante LT-K63 levou à ativação da produção das citocinas INF- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e IL-6 (**Figura 26A – 26F**).

Após a análise das respostas de citocinas secretadas por células do sistema imune, avaliamos a expressão de citocinas acumuladas intracelularmente em linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> re-estimulados com os antígenos EDIII ou DENV2 purificado, (**Figura 27**). Quando re-estimuladas com a proteína EDIII, observamos uma quantidade maior de linfócitos TCD4<sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> e linfócitos TCD8<sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> em comparação aos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> presentes nos animais imunizados com os antígenos EDIII ou DENV2 administrado com Alúmen, (**Figura 27A, 27E e 27G**). Visualizamos ausência de diferença na frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> expressando as citocinas analisadas entre os grupos de animais que receberam as formulações com EDIII ou DENV2 + Alúmen, (**Figura 27A, 27E e 27G**). Não foram notadas diferenças em relação à frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> expressando a citocina IL-10 nos diferentes grupos de imunização, (**Figura 27C**). Quando re-estimulamos os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8 com DENV2 purificado, constatamos uma frequência maior de linfócitos TCD4<sup>+</sup> expressando INF- $\gamma$  e IL-4 nos animais imunizados com a formulação DENV2 + Alúmen em relação ao grupo de animais imunizados com EDIII, (**Figura 27B e 27F**). Não observamos diferenças significativas nos perfis de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> após a administração de EDIII + LT-K63 em relação aos animais imunizados com DENV2 e Alúmen, (**Figura 27B e 27F**). Não houve diferença na frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> nos grupos imunizados com as diferentes formulações vacinais estudadas, (**Figura 27D e 27H**).





**Figura 26.** Avaliação do perfil de citocinas secretadas nos animais imunizados frente ao estímulo *in vitro* com a proteína EDIII. Os animais imunizados foram submetidos à eutanásia após 15 dias da última dose vacinal e seus baços foram coletados para obtenção dos esplenócitos. Os esplenócitos foram reestimulados *in vitro* com a proteína EDIII (10  $\mu$ g/mL). Os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto ao perfil de citocinas (A a G) com kit Th1/Th2 mouse (BD Biosciences) *Cytometric Bead Array* (CBA) de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo em aparelho BD LSRFortessa (BD Biosciences). Os resultados obtidos foram analisados por software FCAP Array™ (BD Biosciences). (I) Análise do perfil de citocina IL-5 por kit BD OptEIA ELISA set (BD Biosciences). Os valores da concentração de citocinas secretadas foram determinados a partir de 2 experimentos com no mínimo 10 animais por grupo. Os desvios padrões estão mostrados no gráfico e foram calculados a partir das médias da concentração de citocinas entre as imunizações com EDIII sozinha ou coadministrada com LT-K63 e DENV2 coadministrado com Alúmen. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados estão indicadas nos gráficos, \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05 e foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de Tukey.



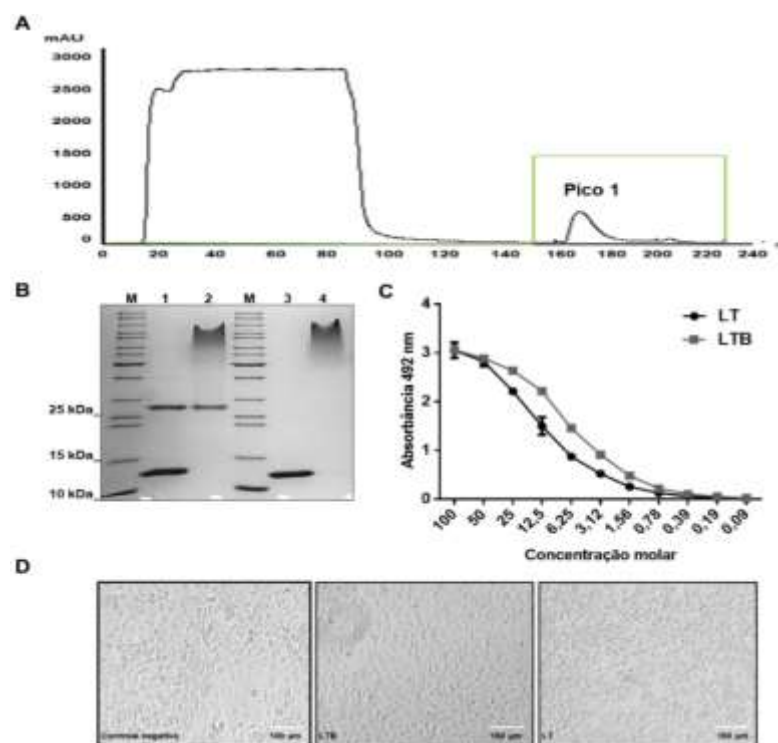
**Figura 27. Expressão intracelular de IL-4, INF- $\gamma$ , IL-10 por células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> induzida pelas imunizações.** Os animais imunizados com as diferentes formulações vacinais foram eutanasiados 15 dias após a última dose vacinal e seus baços foram coletados para obtenção dos esplenócitos. As células foram reestimuladas *in vitro* com a proteína EDIII (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (A, C, E e G) ou DENV2 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (B, D, F e H) e, em seguida, marcadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-IL-4, anti-INF- $\gamma$  e anti-IL-10. As amostras foram avaliadas por citometria de fluxo em aparelho BD LSRFortessa (BD Biosciences). Os resultados foram analisados com o software FlowJo v10 (BD Biosciences). Os valores foram determinados a partir de 2 experimentos com no mínimo 10 animais por grupo. Os desvios padrões estão mostrados nos gráficos e foram calculados a partir das médias da concentração de citocinas entre as imunizações com EDIII ou EDIII coadministrada com LT-K63 e DENV2 coadministrado com Alúmen. As diferenças entre os grupos de imunização para os parâmetros avaliados estão indicadas nos gráficos, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  e foram determinadas por ANOVA e posterior teste de comparação múltipla de Tukey.

### 4.3 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EDIII-ESPECÍFICA INDUZIDA APÓS IMUNIZAÇÃO SUBCUTÂNEA

#### 4.3.1 Purificação e caracterização da atividade biológica dos adjuvantes LT e LT-B

Para purificação dos adjuvantes LT e derivado atóxico LTB, utilizamos a cromatografia de afinidade à galactose e tampão contendo 0,3 M de D-galactose, (**Figura 28A**). Com intuito de verificar a pureza das proteínas LT e LTB purificadas, as frações foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 17,5%, (**Figura 28B**). Observamos que as proteínas purificadas apresentaram as mobilidades eletroforéticas esperadas. Quanto submetidas à desnaturação por calor, a proteína LT apresenta banda correspondente à subunidade A (27 kDa) e o monômero da subunidade B (11,6 kDa). Quando não desnaturada a proteína apresenta é visualizada como uma banda corresponde à subunidade A e a subunidade B pentamérica (55 kDa), (**Figura 28B**). Em relação à LTB, verificamos o mesmo perfil eletroforético da subunidade B de LT, (**Figura 28B**). Posteriormente à purificação de LT e LTB, avaliamos a atividade biológica das duas proteínas pela ligação ao GM1 e capacidade de promover toxicidade em células Y1, (**Figura 28C e 28D**). Como esperado, as duas proteínas foram capazes de ligar o GM1, (**Figura 28C**) Observamos efeito citotônico para a proteína LT após exposição às células Y1 e ausência deste efeito para a proteína LTB, (**Figura 28D**).

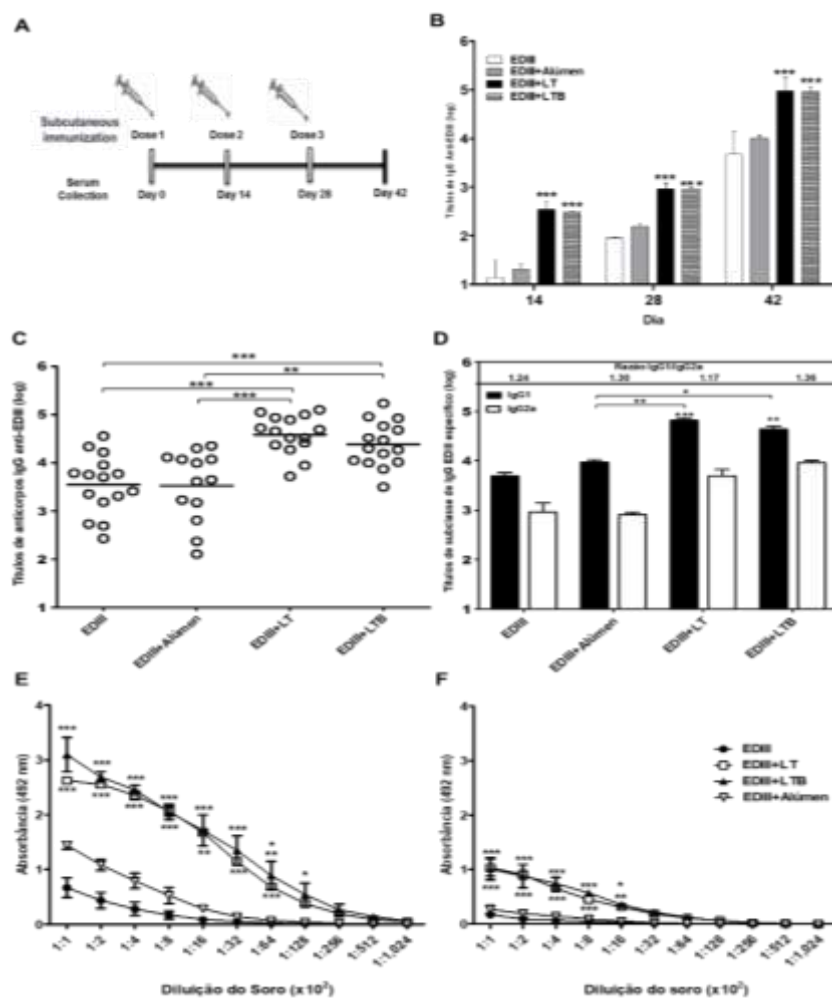
Para os ensaios de imunização, realizamos a remoção do LPS das proteínas em coluna de poli-lisina e a concentração de endotoxina após o tratamento foi inferior a  $< 0,02$  EU/ $\mu$ g de proteína e  $< 3,6$  EU/dose (100  $\mu$ L da formulação vacinal), valores esses compatíveis para a administração de proteínas recombinantes por via parenteral em seres humanos (PADMA; SINGH, 2008).



**Figura 28. Purificação e análise da atividade biológica de LT, LTB e EDIII.** (A) Cromatograma da proteína LTB purificada por cromatografia de afinidade à D-galactose. O pico 1 corresponde à proteína LTB. (B) Gel de poliacrilamida das proteínas purificadas por cromatografia de afinidade à D-galactose em condições desnaturantes (linhas 1 e 2) ou não desnaturantes (linhas 3 e 4). M, marcador de peso molecular (PageRuler Unstained Protein Ladder - Fermentas); linhas 1 e 2, LT (3,0 µg); linhas 3 e 4, LTB (3,0 µg). (C) Ensaio de ligação ao GM1 com as proteínas recombinantes LT e LTB por ELISA. Quantidades equimolares das proteínas LT (●) e LTB (■) foram usadas no ensaio. Dados são representativos de 2 experimentos independentes. Valores estão indicados como médias ± desvio padrão. (D) Ensaio com células Y1 incubadas com derivados de LT demonstrando ausência (LTB) e presença (LT) de efeito citotônico. Controle negativo representa as células não tratadas com as LTs.

Após realizarmos a purificação dos adjuvantes LT e LTB, iniciamos os procedimentos de imunização. Animais BALB/c fêmeas foram imunizadas pela via subcutânea com 3 doses, em intervalo de 15 dias entre as doses, com a proteína EDIII administrada com ou sem a combinação com os adjuvantes LT (1 µg), LTB (3,2 µg) ou Alúmen (12,5 µg), (**Figura 29A**). Podemos verificar que as imunizações com a proteína EDIII coadministrada com os adjuvantes LT ou LTB obtiveram maiores títulos de anticorpos IgG antígeno-específico, (**Figura 29B e 29C**). Observamos que as respostas de subclasses de IgG EDIII-específico nos animais vacinados não apresentaram diferenças após a administração das vacinas com os adjuvantes LT e LTB em comparação à administração do antígeno EDIII, entretanto houve um aumento significativo dos títulos de anticorpos IgG1 EDIII-específicos no soro dos animais imunizados com as LTs, (**Figura 29D**). Adicionalmente, os anticorpos antígeno-específicos provenientes dos animais vacinados foram capazes de reconhecer epítomos conformacionais e lineares do antígeno, como demonstrado pela reatividade com o antígeno íntegro ou desnaturado por calor. As amostras de soros coletadas de animais imunizados com vacinas contendo LT ou LTB

mostraram reatividade maior tanto para epítomos lineares como conformacionais em relação a amostras de soros colhidas de animais que receberam apenas a proteína EDIII ou em combinação com alúmen, (**Figura 29E, 29F**).



**Figura 29. Análise das respostas de anticorpos EDIII-específicas induzidas em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais.** (A) Representação esquemática do regime vacinal testado. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados pela via s.c. com 3 doses de EDIII (10 µg) coadministrado, ou não, com os adjuvantes LT1 (1 µg), LT1-B (3,2 µg) ou alúmen (12,5 µg). (B) Análises das respostas de anticorpos IgG antígeno-específicas encontradas nos soros coletados 2 semanas após cada dose da vacina. (C) Avaliação das respostas de IgG total anti-EDIII ou (D) das respostas de subclasses de IgG analisadas 2 semanas após a 3ª dose. (E e F) Reatividade dos anticorpos dos animais vacinados em ELISA com a proteína EDIII íntegra (E) ou com a proteína desnaturada por calor (F). Títulos de anticorpos anti-EDIII foram determinados a partir de 3 experimentos independentes com 5 animais por grupo de imunização. Valores estão representados como médias SD dos títulos de anticorpos IgG. \*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01 e \* p < 0,05, em relação aos animais imunizados com a proteína EDIII (*Two-way ANOVA* seguido do teste comparação múltiplas *Bonferroni*).

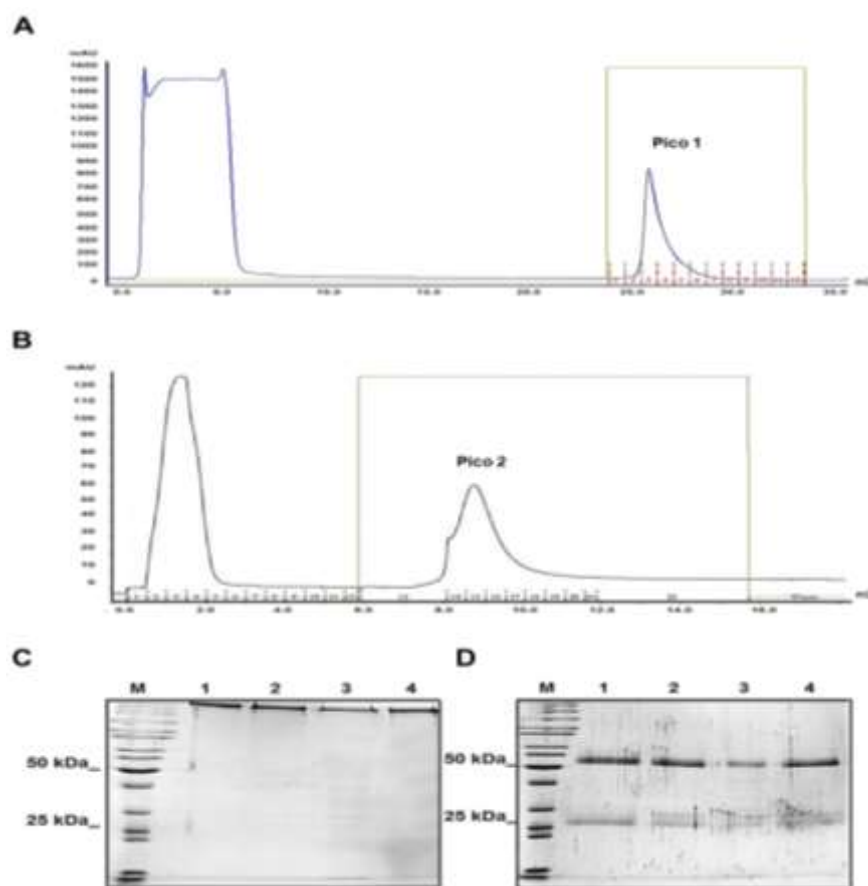
#### 4.3.2 Purificação e avaliação da afinidade e capacidade de neutralização dos anticorpos IgG EDIII-específicos

Para analisar a produção de anticorpos com atividade neutralizante foi preciso purificar os anticorpos EDIII-específicos induzidos durante as imunizações com a proteína EDIII. A purificação de anticorpos anti-EDIII foi feita por cromatografia de afinidade com a proteína

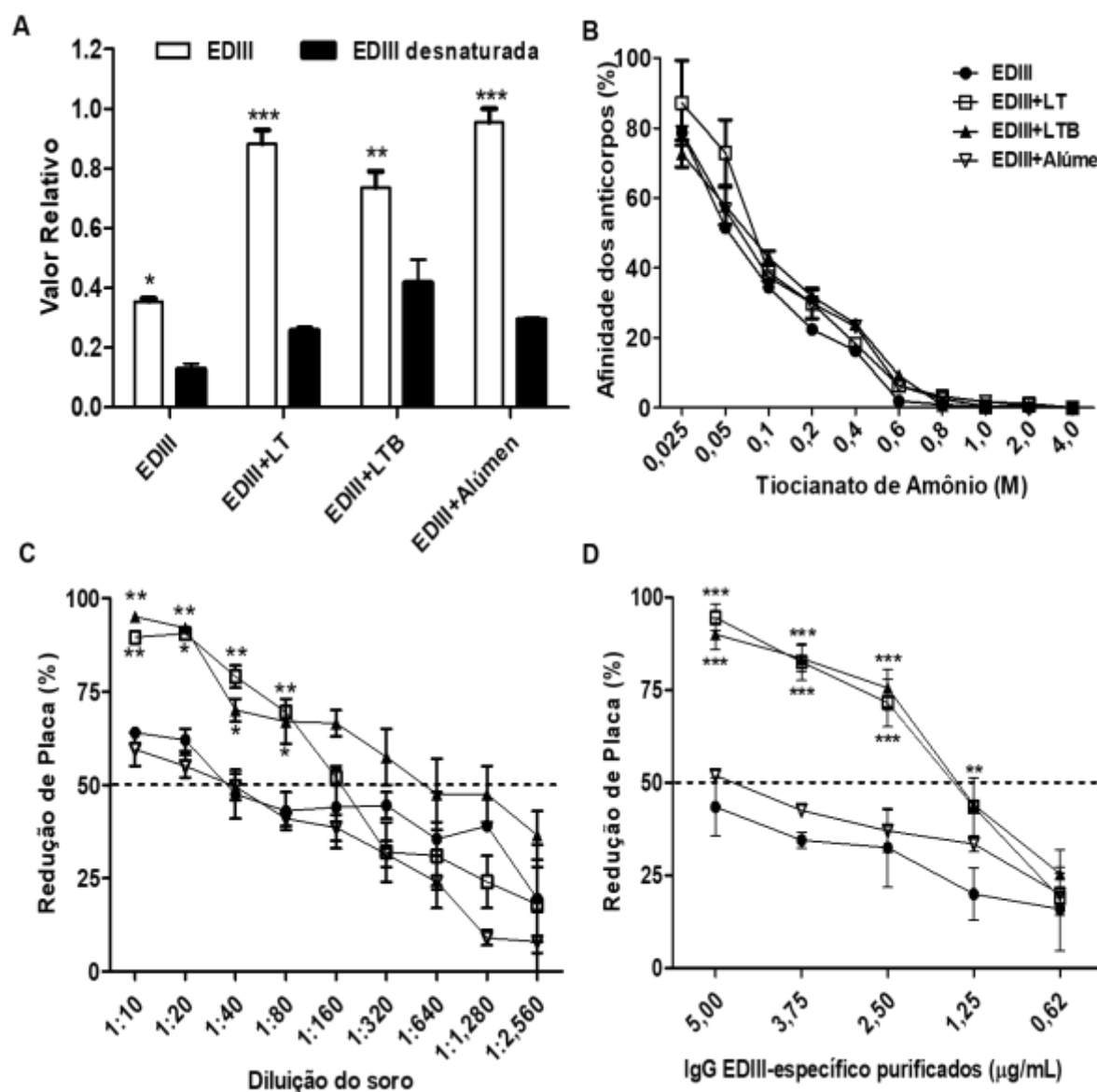
EDIII ligada à resina de níquel. O processo de eluição dos anticorpos EDIII-específicos resultou na detecção de um pico único correspondente a fração de IgG, (**Figura 30A**). As amostras obtidas após a primeira etapa de purificação foram submetidas a um novo procedimento de purificação em coluna de proteína G com afinidade à porção Fc dos anticorpos IgG, o que resultou em um pico único, (**Figura 30B**). Para determinação do grau das frações, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%. Em condições desnaturantes, visualizamos a presença de duas bandas correspondente às cadeias leves e pesadas dos anticorpos, (**Figura 30D**). Em condições não desnaturante, observa-se uma única banda de peso acima de 150 kDa correspondente ao anticorpo IgG inteiro, (**Figura 30C**).

Em seguida, os anticorpos IgG EDIII-específicos foram avaliados quanto à capacidade de reagir com o antígeno e investigamos diferenças de afinidade à proteína EDIII. Inicialmente, verificamos que os anticorpos IgG EDIII-específicos mantêm a capacidade de reagir com a proteína EDIII íntegra, mas não com a proteína desnaturada por calor, (**Figura 31A**). Esse resultado indica que os anticorpos purificados são específicos contra epítomos conformacionais presentes no antígeno EDIII

Em seguida, avaliamos a afinidade dos anticorpos purificados à proteína EDIII e não observamos diferenças significativas entre os grupos de imunização analisados, (**Figura 31B**). Com intuito de avaliar a capacidade de neutralização dos anticorpos induzidos após a administração das vacinas, incubamos os soros, e os respectivos anticorpos purificados, com partículas do vírus DENV2. Observamos uma eficiente capacidade de neutralização viral com amostras colhidas dos grupos provenientes da imunização com o antígeno coadministrado com os adjuvantes LT e LTB, mas não com as amostras derivadas de animais imunizados com EDIII ou EDIII coadministrada com Alúmen, (**Figura 31C e 31D**). Os anticorpos IgG EDIII-específicos provenientes dos animais imunizados com as formulações contendo as LT ou LTB apresentaram títulos neutralizantes (PRNT<sub>50</sub>) de aproximadamente 1,6 µg/mL, (**Figura 31D**).



**Figura 30. Purificação dos anticorpos IgG EDIII-específicos.** Anticorpos IgG EDIII-específicos foram purificados do soro de animais imunizados. (A) Cromatograma de purificação dos anticorpos antígeno-específicos purificados por afinidade à proteína EDIII imobilizada em resina de níquel. (B) Cromatograma de purificação dos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados por afinidade à proteína G. Picos 1 e 2 correspondem aos anticorpos anti-EDIII e anticorpos IgG anti-EDIII, respectivamente, obtidos após eluição com tampão glicina. (C e D) Gel de poli-acrilamida corado com *Coomassie blue* contendo os anticorpos IgG EDIII-específicos em condições não desnaturantes (C) ou desnaturantes (D). Anticorpos IgG EDIII-específicos foram purificados do soro de diferentes grupos de imunização: EDIII (linha 1), EDIII coadministrada com LT (linha 2), LTB (linha 3), ou Alúmen (linha 4). M, marcador de peso molecular (PageRuler Unstained Protein Ladder - Invitrogen).



**Figura 31. Caracterização dos anticorpos IgG EDIII-específicos obtidos de animais imunizados.** (A) Anticorpos EDIII-específicos purificados foram submetidos a testes de ELISA em placas contendo a proteína EDIII íntegra ou desnaturada por calor. Absorbância relativa de 1 corresponde a 0,368. (B) Afinidade dos anticorpos purificados ao antígeno EDIII. Os valores estão expressados pela porcentagem de anticorpos que permanecem ligados ao antígeno absorvido em fase-sólida na presença de tiocianato de amônio em relação à reação na ausência de tiocianato de amônio. Grupos de imunização foram representados por diferentes símbolos, como indicado na figura. (C e D) Teste de neutralização por redução de placa (PRNT) com o vírus DENV2 (NGC) na presença das amostras de soro diluídas seriamente (C) ou com quantidades variadas dos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados (D) de animais imunizados com as diferentes formulações vacinais. Os resultados foram baseados em 2 experimentos independentes com as amostras em duplicatas. Os valores das médias estão representados por SD. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ , diferenças significativas em relação à proteína desnaturada EDIII (A) ou para animais imunizados com a proteína EDIII (B-D). (*Two-way ANOVA* seguido de teste de comparação múltiplas *Bonferroni*).

#### 4.3.3 Determinação das imunoassinaturas dos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados

Para compreendermos a capacidade neutralizante dos anticorpos IgG anti-EDIII purificados a partir dos soros dos animais imunizados determinamos as imunoassinatura desses

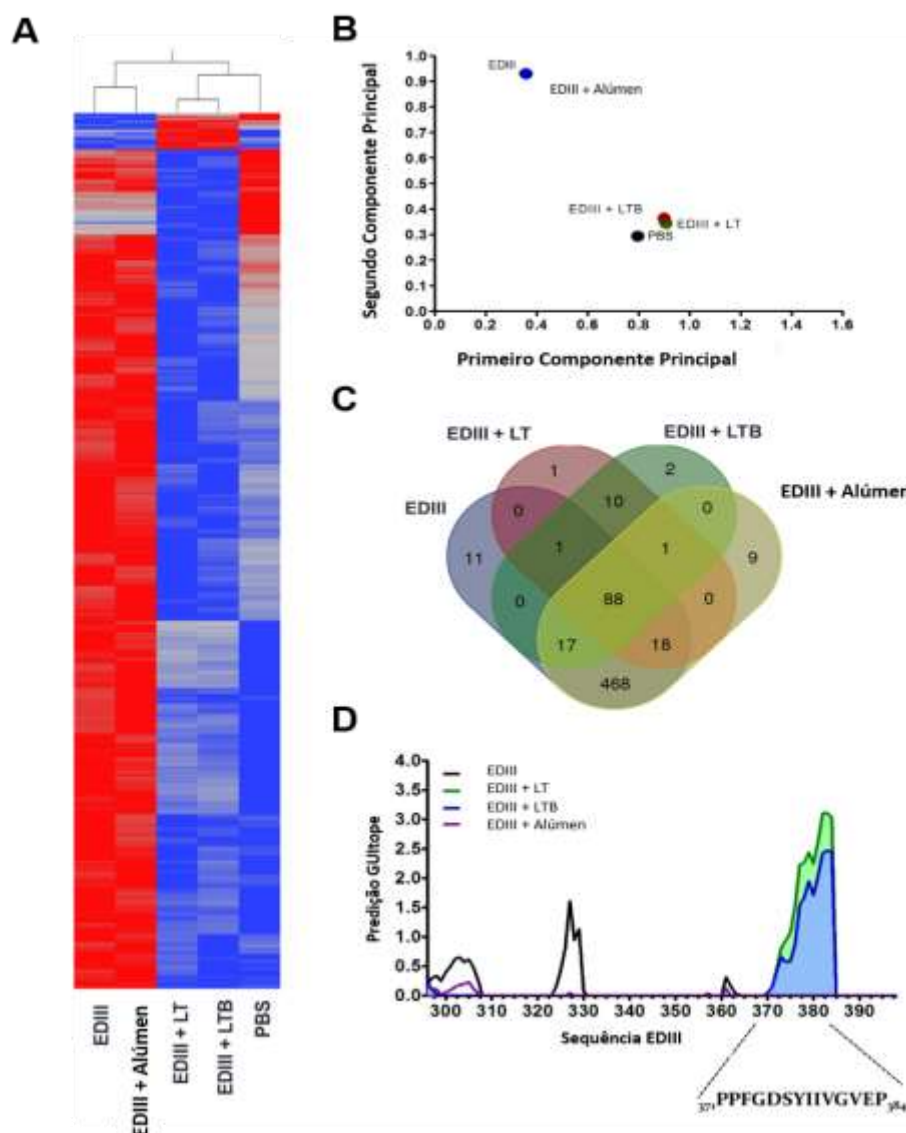


anticorpos frente a *microarrays* de peptídeos sintéticos de sequências randômicas, (**Figura 32**). A análise do perfil das sequências de peptídeos lineares reconhecidos no *microarray* demonstrou que os anticorpos provenientes dos animais imunizados com EDIII e LT ou EDIII e LTB têm assinaturas imunológicas distintas dos anticorpos gerados em animais imunizados apenas com o antígeno ou o antígeno combinado com alúmen, (**Figura 32A e 32B**). Além disso, um menor número de peptídeos é reconhecido, com alta intensidade de ligação, por anticorpos IgG EDIII-específicos provenientes dos animais imunizados com os adjuvantes LT ou LTB, sugerindo um aumento na especificidade desses anticorpos, (**Figura 32A e 32C**). Os anticorpos desenvolvidos em animais imunizados com EDIII e LT ou LTB reagiram com 119 sequências de peptídeos cada, enquanto anticorpos obtidos a partir de animais imunizados com EDIII ou EDIII coadministrado com alúmen reagiram com 605 e 603 peptídeos, respectivamente. Entre esses peptídeos apenas 10 foram reconhecidos por anticorpos obtidos dos animais imunizados com LT ou LTB e 88 peptídeos foram reconhecidos por anticorpos gerados em todos os grupos, (**Figura 32C**).

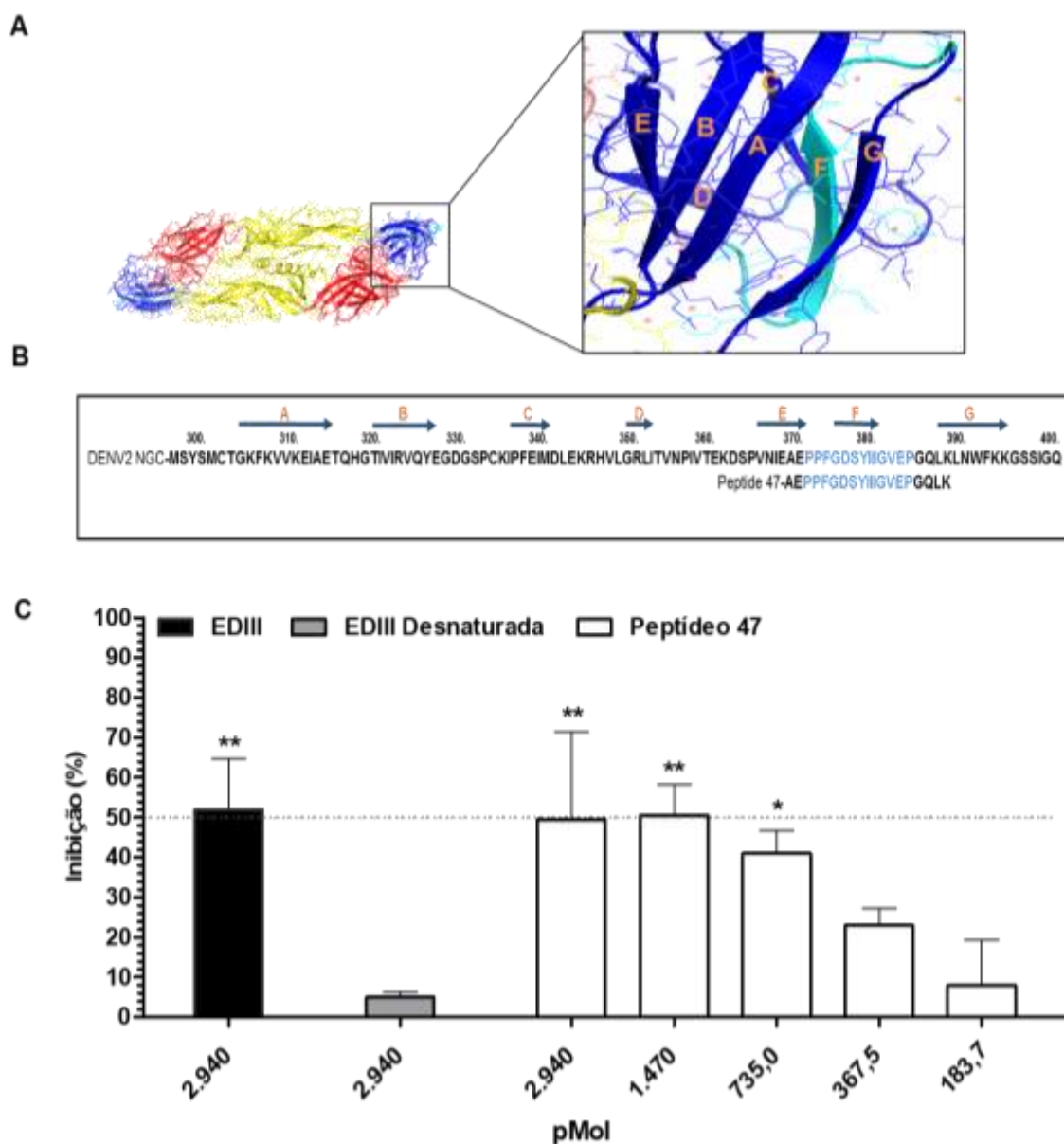
#### 4.3.4 Predição de epítipo e avaliação da atividade inibitória

Com intuito de correlacionar as sequências dos peptídeos reconhecidos pelos anticorpos IgG EDIII-específicos gerados nos diferentes grupos de imunização e os epítipos presentes na proteína EDIII, foram feitas análises com o programa *GuiTope*. Os resultados encontrados demonstram que a imunizações com LT ou LTB induzem anticorpos que reagem com uma sequência compreendidas no loop EF, folha-beta F e loop FG da proteína EDIII, compreendida pelos aminoácidos 371 a 384, (**Figura 32D, Figura 33A e 33B**).

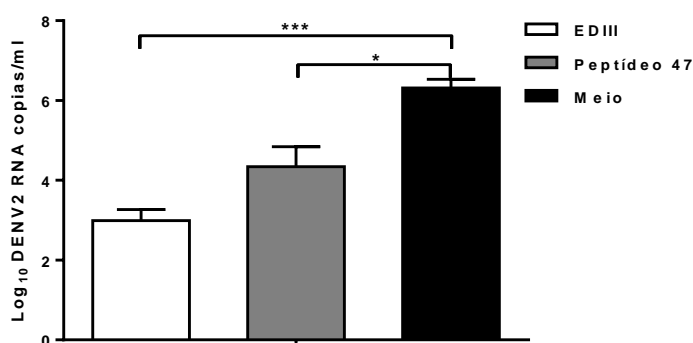
Com intuito de investigar a relevância biológica deste achado, realizamos ensaios de inibição da infecção viral com um peptídeo sintético de 20 aminoácidos que engloba a sequenciada EDIII identificada pela análise das imunoassinaturas dos anticorpos anti-EDIII, (**Figura 33B**). Como demonstrando na **Figura 33C e Figura 34**, o peptídeo EDIII<sub>369-388</sub>, denominado peptídeo 47, bloqueou a infectividade do vírus DENV2 NGC em células Vero tão bem quanto a proteína EDIII.



**Figura 32. Análise das imunoassinaturas dos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados.** (A) Mapa demonstrando as imunoassinaturas detectadas com os anticorpos IgG EDIII-específicos purificados a partir de amostras de soro dos animais submetidos ao regime vacinal. O teste *Student's T* ( $p < 3,33 \times 10^{-6}$ ) foi usado entre os grupos para selecionar os peptídeos informativos. Agrupamento hierárquico da distância de EUCLIDEAN foi usado como medida da similaridade para o grupo dos peptídeos selecionados (eixo  $x$ ) e grupos vacinais (eixo  $y$ ). A intensidade dos peptídeos está colorida, onde azul corresponde a baixa intensidade e vermelho corresponde a alta intensidade. (B) Variância da resposta imunológica entre os diferentes grupos vacinais (mistura do soro por grupo ( $n=5$ )) para todas as sequências significativas de peptídeos pela análise do componente principal (Principal Component Analysis plot – PCA), onde o primeiro e o segundo componente principal estão plotados e os indivíduos estão coloridos de acordo com os grupos de vacinação. (C) Diagrama de *Venn* entre os grupos vacinais. Resultados sumariza a sobreposição dos peptídeos com diferenças significativas acima de 1,3 vezes do grupo controle e em relação aos grupos vacinais. (D) Predição de epítipo antigênico para os grupos vacinais usando peptídeos aleatórios. Sequências de peptídeos reconhecidas pelos anticorpos de cada grupo vacinal de acordo com a predição de epítipos feita com o software *GuiTope*, usando a sequência da proteína EDIII de vírus DENV2 cepa NGC (AHG97599.1) como referência. Cada linha do gráfico representa o ponto de predição do *GuiTope* para cada grupo vacinal.



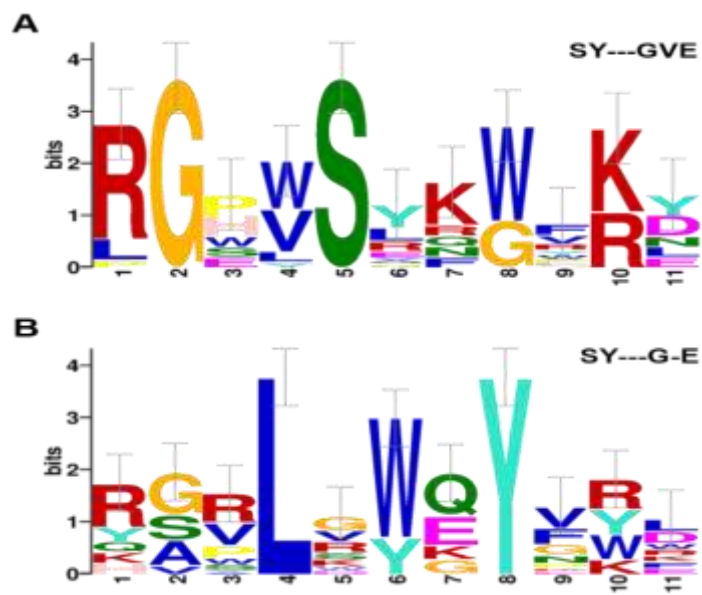
**Figura 33. Identificação do epítipo linear derivado da EDIII envolvido na ligação de DENV2 nas células Vero.** (A) Representação tridimensional (3D) do dímero da glicoproteína de envelope E do DENV2. Domínios I (amarelo), II (vermelho) e III (azul) estão destacados. Na inserção está mostrando a estrutura do domínio III da proteína E. A sequência de aminoácido marcada em azul claro corresponde ao epítipo reconhecido pelos anticorpos provenientes dos animais imunizados com as formulações vacinais contendo LT ou LTB como adjuvantes. (B) Sequência de aminoácidos da EDIII do DENV2 (número de acesso do GeneBank: AF038403.1). As posições da folha  $\beta$  de EDIII estão indicadas acima da sequência por setas em azul escuro, a sequência dos peptídeos sintéticos usados para o ensaio de competição está mostrada abaixo. O epítipo previsto pelas análises das imunoassinaturas está marcado em azul claro. (C) Inibição da infecção por DENV2. Diferentes concentrações molares da proteína EDIII ou do peptídeo 47 foram misturados com o vírus DENV2 NGC e, subsequentemente, adicionados sobre as células Vero. As células marcadas com o mAb 4G2 e, em seguida, com anticorpo anti-IgG mouse Alexa-488 conjugados foram medidas por citometria de fluxo e os números de células Vero infectadas por DENV2 foram determinadas para cada grupo. Os valores de redução foram expressos em porcentagem do número de células infectadas pelo vírus em comparação com o grupo controle (DENV2 não tratado). A linha pontilhada indica 50% de inibição da infecção viral. As barras representam a média dos valores e erro padrão das médias (SEM) de 3 experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ , diferenças significativas entre o controle DENV2 não tratado. (*Two-way ANOVA* seguido pelo teste de comparação múltiplas *Bonferroni*).



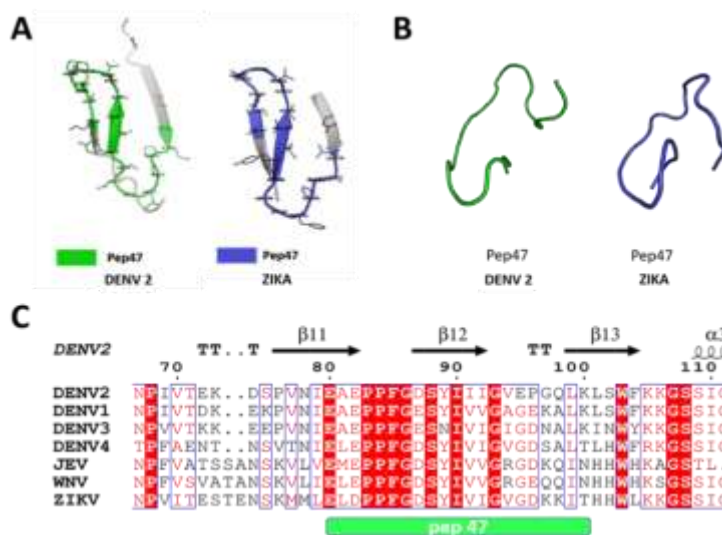
**Figura 34. Inibição da infecção pelo DENV2 com o peptídeo 47.** Células Vero foram incubadas com DENV2 (MOI = 1) previamente incubado ou não com a proteína EDIII ou peptídeo sintético 47 (2.940 pMol). O RNA de DENV2 foi quantificado através de ensaio de RT-PCR 24 h após a infecção.

A partir dos 25 peptídeos, identificados pelas análises de imunoassinatura, com maior intensidade de ligação com os anticorpos IgG EDIII-específicos foi possível demonstrar que os anticorpos gerados em animais imunizados com LT como adjuvante reagiram com a sequência predita SY-GVE, enquanto os anticorpos gerados após imunização com o adjuvante LTB reagiram com a sequência predita SY-G-E, (**Figura 35A e 35B**).

Com intuito de analisar o comportamento do peptídeo 47, realizamos avaliação ensaios de modelagem estrutural e dinâmica molecular dos peptídeos correspondentes as sequencias encontradas no DENV2 e no ZIKV, (**Figura 36A e 36B**). O peptídeo derivado da sequência do ZIKV foi definido a partir de alinhamento estrutural entre a proteína depositada no banco de dados de proteínas ID:5IRE e a sequência de aminoácidos da proteína de DENV2 ID:3J27, (**Figura 36A**). As análises dos dois peptídeos demonstraram que os mesmos não apresentam uma estrutura secundária estável. As mobilidades apresentadas por esses peptídeos podem conferir maior flexibilidade e, conseqüentemente, conformações adequadas à interação com os receptores celulares responsáveis pela ligação do vírus à célula hospedeira, (**Figura 36B**). Ao avaliarmos a sequência do peptídeo 47 para os outros sorotipos de DENV (DENV1, 3 e 4) bem como, para outros *Flavivirus* (vírus da Encefalite Japonesa e vírus do Oeste do Nilo), verificamos em todas as sequencias a presença de aminoácidos conservados (E--PPFG-S-I--G), (**Figura 36C**).



**Figura 35. Sequência Logos dos anticorpos IgG EDIII-específicos.** Sequência logos foi criada a partir dos 25 peptídeos com maior intensidade de ligação a cada grupo de anticorpos purificados, identificados pelas imunossinaturas. Comparação dos epítopos preditos reconhecidos por anticorpos IgG EDIII-específicos purificados do grupo de animais imunizados com o antígeno coadministrado com os adjuvantes (A) LT e (B) LTB



**Figura 36. Representação do peptídeo 47 de DENV2 e ZIKV.** (A) Representação dos peptídeos nas estruturas de modelagem 3J27 e 5IRE (PDB: ID:3J27 e ID:5IRE). (B) Estrutura dos peptídeos após dinâmica molecular. (C) Alinhamento de sequências de aminoácidos do EDIII entre os *Flavivírus* na região de alinhamento do peptídeo 47. As regiões sombreadas em vermelho correspondem aos resíduos de aminoácidos idênticos entre os diferentes vírus analisados e encontrados na sequência do peptídeo 47.

## 5 DISCUSSÃO

Uma das maiores dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o DENV está relacionada ao possível risco de evolução para uma resposta de anticorpos subneutralizantes, capazes de promover o aumento da infecção viral por meio do fenômeno de ADE e, em consequência, o desenvolvimento das formas graves da doença após infecção com diferentes sorotipos de DENV. Devido a isto, formulações vacinais necessitam induzir respostas imunológicas protetoras e duradouras contra os quatro sorotipos de DENV. Neste contexto, o grande desafio está relacionado com a identificação de alvos imunogênicos efetivos e relevantes no DENV que permitam a indução de respostas imunológicas protetoras. Desta forma, um conhecimento mais preciso de epítomos na proteína de envelope viral responsáveis pela geração de anticorpos neutralizantes é de fundamental importância para o futuro das pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de vacinas contra o DENV.

Neste trabalho fizemos a caracterização de epítomos presentes na proteína de envelope do DENV que fossem importantes para indução de anticorpos neutralizantes, mas sem promover a exacerbação da infecção em células apresentando receptores para a porção Fc dos anticorpos. Para essa avaliação, expressamos separadamente os domínios EDI/II e EDIII da proteína de envelope viral e coadministramos essas proteínas recombinantes com derivados, ou mutante atóxico, da toxina LT como adjuvantes vacinais. Observamos que a administração das LTs proporcionou a potencialização das respostas de anticorpos antígeno-específicos e melhorou a capacidade de neutralização viral. Demonstramos ainda, e de forma inédita, que o uso dos adjuvantes LT e LTB permitiu a identificação, por meio de análise dos padrões de imunoassinaturas de anticorpos IgG EDIII-específicos, de um peptídeo com capacidade de bloquear a infecção pelo DENV2 em ensaios *in vitro*. Esses resultados, abrem perspectivas para determinação de novos alvos antigênicos para desenvolvimento de estratégias vacinais voltadas para a prevenção da infecção causada pelo DENV.

Para compreender quais epítomos presentes na proteína de envelope do DENV2 proporcionam a indução de anticorpos neutralizantes capazes de impedir a fusão do envelope viral, baseamos nossas análises no estudo de anticorpos antígeno-específicos de produzidos em animais imunizados com a proteína EDI/II, administrada sozinha ou em combinação com o adjuvante LT-K63. Nossos dados demonstraram que a presença de LT-K63 contribuiu para aumentar os títulos de anticorpos antígeno-específicos. Além disso, a administração de LT-K63 também promoveu a modulação da resposta humoral e levou a um padrão de subclasse de IgG

misto (Th1/Th2) com predomínio de IgG1 sugestivo de resposta voltada para um perfil Th2. Em resultados prévios, a administração do adjuvante LT-K63, proporcionou a potencialização e modulação de resposta humoral antígeno-específica (RYAN et al., 1999; XU; ZHANG; XU, 2008), o que corrobora com nossos resultados.

A presença de anticorpos neutralizantes contra os domínios EDI/II da proteína de envelope viral podem levar a proteção contra infecções causadas pelo DENV. Em resultados prévios, anticorpos específicos à região de fusão presente no domínio EDII de indivíduos previamente infectados por DENV, bloqueiam a formação de trímeros responsáveis pela fusão da proteína de envelope viral com a membrana do endossomo celular (MESSER et al., 2015). Em nossos resultados, apesar de observarmos a potencialização e modulação da resposta humoral induzida pelo adjuvante LT-K63, verificamos que esses anticorpos antígeno-específicos foram incapazes de neutralizar a infecção viral em células Vero. Além disso, esses anticorpos foram capazes de promover o aumento da infecção viral (ADE) em células K562. Esses dados sugerem, que a falta de neutralização viral dos anticorpos induzidos após administração LT-K63 em células Vero e K562, pode ter sido influenciada pela instabilidade do antígeno EDI/II purificado. É conhecido que a desestabilização conformacional de antígenos pode causar mudanças na antigenicidade e na imunogenicidade e afetar a produção de anticorpos com ação neutralizante antígeno-específicos (DELAMARRE et al., 2006; JENSEN, S. M, NGUYEN, C. T, AND JEWETT, 2016; SCHEIBLHOFER et al., 2017). Em decorrência desses resultados, decidimos descontinuar as análises direcionadas para o antígeno EDI/II, enquanto o problema de instabilidade da proteína recombinante não for superado.

Na segunda etapa do trabalho, buscamos determinar quais epítomos presentes na proteína de envelope do DENV2 proporcionavam a indução de anticorpos capazes de impedir a interação do vírus aos receptores presentes nas células hospedeira. O domínio EDIII da proteína de envelope dos DENV é considerado um dos antígenos mais importantes empregados para o conhecimento da biologia infectiva do vírus, como para o desenvolvimento de estratégias vacinais contra os DENV. Com base nessas informações, baseamos nossas avaliações no estudo de anticorpos antígeno-específicos em animais imunizados com a proteína EDIII recombinante administrada com o adjuvante LT-K63. Verificamos que a administração de LT-K63 como adjuvante, aumentou a resposta de anticorpos IgG EDIII-específicos, em comparação aos outros grupos de animais imunizados. Adicionalmente, demonstramos que esse adjuvante possibilitou a imunomodulação da resposta celular como demonstrado pela presença significativa de linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores de INF- $\gamma$  e IL-4, bem como, linfócitos TCD8<sup>+</sup> produtores de INF-

$\gamma$ . A LT-K63 também induziu a produção de citocinas INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Esse padrão de citocinas corrobora a modulação de subclasses de IgG, demonstrada por esse adjuvante. Atualmente, entende-se que a imunidade protetora contra o DENV envolve a presença de anticorpos neutralizantes, bem como, a participação da resposta celular através da expansão e ativação adequada de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> produtores de INF- $\gamma$ , importantes para a resposta antiviral (YAUCH et al., 2010; WEISKOPF; SETTE, 2014; ZELLWEGER et al., 2015). O perfil de citocinas estimuladas pelo adjuvante LT-K63, modula diretamente a resposta de anticorpos antígeno-específica neutralizante, através da produção de determinadas subclasses de IgG envolvidas na neutralização, ativação e direcionamento para células que expressam receptores para a porção Fc dos anticorpos, bem como, modulação dos receptores Fc $\gamma$ R na superfície das células.

Além dos perfis imunológicos desencadeados por LT-K63, constatamos que esse adjuvante também induziu características importantes para atividade efetora dos anticorpos. Verificamos que a LT-K63 induziu a produção de anticorpos anti-EDIII com capacidade de neutralização heterotípica em células Vero. De forma semelhante, Crill e Rohering (2001) observaram que anticorpos monoclonais direcionados para o EDIII apresentam forte capacidade de bloquear a interação dos diferentes vírus DENV aos receptores presentes em células Vero. Com relação à capacidade protetora conferida pelas formulações vacinais, observamos que os animais imunizados com o antígeno EDIII co-administrado com o LT-K63 apresentaram 40% de sobrevivência, proteção também obtida nos animais imunizados com antígeno DENV2 purificado combinado com o Alúmen. Esses resultados demonstram que as respostas imunológicas direcionadas ao domínio EDIII da proteína de envelope do DENV, através da presença de anticorpos neutralizantes, bem como, pela presença de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> específicos induzidos pela administração LT-K63, estão correlacionados com proteção observada após o desafio letal.

Entretanto, apesar de observamos a proteção conferida pelo EDIII e o adjuvante LT-K63, verificamos que soros anti-EDIII também foram capazes de aumentar a infecção por todos os vírus avaliados em ensaio *in vitro*. Verificamos a partir desses resultados que a presença de anticorpos direcionados a epítomos comuns aos vírus analisados podem ser responsáveis pelo fenômeno de ADE. Nossos resultados corroboram dados apresentados no trabalho realizado por De Alwis e colaboradores (2014), em que soros de pacientes depletados para anticorpos capazes de reconhecer epítomos comuns entre os quatro tipos de DENV perdem a capacidade de desenvolver o fenômeno de ADE *in vitro* e em modelo *in vivo*. Além disso, esses epítomos



comuns entre os quatro tipos de DENV podem necessitar de altas concentrações de anticorpos para atingir a estequiometria necessária para a neutralização viral (PIERSON; DIAMOND, 2008; PIERSON et al., 2009b). Esses resultados demonstrando que mais estudos são necessários para avaliar quais regiões da proteína de envelope do DENV são responsáveis da geração de respostas de anticorpos policlonais neutralizantes e entender-se os mecanismos envolvidos na indução do ADE. Desta forma, apesar de verificarmos o aumento da infecção viral induzida pelo soro anti-EDIII obtido através da administração de LT-K63 em ensaio *in vivo*, podemos sugerir que outros componentes da resposta imunológica induzida por esse adjuvante devem ser responsáveis pela proteção observada nos animais.

Ainda com intuito de identificar epítomos importantes para a neutralização viral, a terceira e última etapa deste trabalho, buscou compreender o papel dos adjuvantes LT, e seu derivado atóxico LTB, na modulação da especificidade a epítomos presentes na proteína EDIII que fossem responsáveis pela neutralização viral. Observamos que a administração de LT e LTB foi capaz de proporcionar a potencialização da resposta de anticorpos IgG EDIII-específicos em relação aos outros grupos vacinais. Essa potencialização não estava relacionada à presença da subunidade A enzimaticamente ativa, já que o adjuvante LTB apresentou o mesmo perfil de potencialização da resposta de anticorpos anti-EDIII em comparação ao adjuvante LT.

A administração de LT e LTB também promoveu uma forte resposta de anticorpos neutralizantes, observados no soro total, bem como nos anticorpos IgG EDIII-específicos purificados a partir do soro dos animais imunizados com os adjuvantes. Esse potencial neutralizante promovido pela administração das LTs pode ser comparado a capacidade de anticorpos monoclonais, direcionados para o domínio EDIII, impedirem a infecção pelo DENV em ensaios *in vitro* (CRILL; ROEHRIG, 2001; SUKUPOLVI-PETTY et al., 2007; LOK et al., 2008; CLEMENTS; FREYTAG, 2016). Vale salientar também que a atividade neutralizante observada nos anticorpos IgG EDIII-específicos induzidos pelas LTs foi independente da afinidade desses anticorpos ao antígeno. Esse efeito de neutralização com baixa afinidade ao antígeno tem sido observado em alguns trabalhos investigando a capacidade neutralizante de certos anticorpos monoclonais (WAHALA et al., 2009; SCHIEFFELIN et al., 2010; COCKBURN et al., 2012; POGGIANELLA et al., 2015). Desta forma, podemos verificar que a administração dos adjuvantes LT ou LTB proporciona uma modulação da resposta humoral direcionada à epítomos essenciais para a indução de anticorpos com alta capacidade de neutralização viral.

Baseados na capacidade adjuvante das LTs em induzir anticorpos altamente neutralizantes independentes da afinidade ao antígeno, procuramos investigar que epítomos presentes no domínio EDIII estariam relacionados com a indução de anticorpos neutralizantes. Para essa avaliação, analisamos os padrões de imunoassinatura presentes nos anticorpos anti-EDIII purificados. Encontramos diferenças marcantes nos padrões de imunoassinatura dos anticorpos EDIII-específicos purificados a partir dos animais imunizados com as LTs, em comparação aos anticorpos purificados das imunizações com o antígeno EDIII ou o antígeno administrado em combinação com o adjuvante Alúmen. Ao contrário dos anticorpos gerados nos animais imunizados com o antígeno sem adjuvante ou com alúmen, a administração de LT e LTB resultou em anticorpos com especificidade a epítomos localizados nas alças EF, FG e folha F  $\beta$ -pregueada da proteína EDIII. Por meio deste ensaio foi possível demonstrar, por meio das sequências dos peptídeos randômicos reconhecidos com maior intensidade pelos anticorpos, a sequência SY-GVE, para os anticorpos gerados após administração de LT e, a sequência SY-G-E, para os anticorpos produzidos após imunização com LTB. Os resultados obtidos através dessa abordagem experimental também possibilitaram a identificação de um peptídeo compreendido entre os resíduos de aminoácidos 371 a 384, denominado de peptídeo 47, na sequência do EDIII. Esses resultados obtidos demonstram também que a atividade dos adjuvantes LT e LTB modulam o reconhecimento de epítomos alvos pelos anticorpos induzidos durante a imunizações.

A aplicação de peptídeos sintéticos em abordagens terapêuticas tem sido amplamente explorada no tratamento de doenças virais como hepatites, influenza e síndrome da imunodeficiência adquirida (SKALICKOVA et al., 2015). No entanto, poucos trabalhos demonstram os efeitos inibitórios conferidos por peptídeos no tratamento de doenças causada por arbovírus. Neste sentido, procuramos verificar se o peptídeo 47, identificado a partir de anticorpos produzidos durante imunização com os adjuvantes LT e LTB, apresentaria capacidade de inibir a infecção pelo DENV2. Nossos resultados demonstram que o peptídeo identificado apresenta a capacidade de inibir a infecção pelo DENV2 tão bem quanto a proteína EDIII em ensaios *in vitro*. Quando comparamos os resultados obtidos com o peptídeo 47 com os resultados obtidos com outros peptídeos inibidores para infecção por DENV descritos na literatura, particularmente aqueles direcionados para regiões hidrofóbicas ou alça FG da proteína E, constatamos que a quantidade requerida do peptídeo 47 para inibir a infecção pelo DENV2 é muito inferior àquelas encontradas com outros peptídeos descritos (SCHMIDT; YANG; HARRISON, 2010; ALHOOT et al., 2013; PANYA et al., 2014). Destaca-se ainda que

sequências encontradas no peptídeo 47 foram identificadas como epítomos para anticorpos monoclonais anti-DENV e anti-ZIKV isolados de indivíduos infectados pelo ZIKV (ROBBIANI et al., 2017). Estes resultados sugerem que a sequência definida pelo peptídeo 47 apresenta relevância na indução de respostas anticorpos protetores direcionados ao EDIII de DENV e outros *Flavivirus*. Assim, além de apresentar um efeito inibitório direto na interação viral com a células hospedeiras, o peptídeo 47 pode ser utilizado em imunizações para a geração de anticorpos específicos, permitindo sua utilização em abordagens profiláticas e terapêuticas contra DENV.

## 6 CONCLUSÕES

A identificação de epítomos reconhecidos por anticorpos com capacidade de neutralização de partículas virais, em especial o DENV, tem sido alvo de pesquisa por vários grupos de pesquisas no mundo, sobretudo por meio da geração de anticorpos monoclonais. Poucos trabalhos buscam compreender o potencial de geração de anticorpos neutralizantes por meio de respostas mediadas por anticorpos policlonais. Com esse intuito, o presente estudo empregou proteínas recombinantes correspondentes a domínios da proteína de envelope (EDI/II e EDIII) de DENV2 para a caracterização de epítomos envolvidos na produção de anticorpos policlonais neutralizantes, bem como, epítomos envolvidos na produção de anticorpos capazes de promover o fenômeno de ADE. Para essas análises, empregamos uma nova metodologia que envolve a definição das imunoassinaturas de anticorpos gerados após imunização com EDIII na presença dos adjuvantes LT ou LTB.

A prevenção de infecções causadas pelo DENV está relacionada ao desenvolvimento de formulações vacinais que proporcionem proteção aos 4 sorotipos de DENV. Neste contexto, a escolha de um adjuvante que module a especificidade de anticorpos a epítomos que permitam a neutralização viral sem os riscos associados ao fenômeno de ADE é uma meta importante. Nesse estudo verificamos que o uso de derivados de LT em conjunto com o uso de uma forma recombinante do EDIII permitiu a identificação de epítomo envolvidos na neutralização da infecção viral. A continuidade desses estudos deve buscar entender o papel desta sequência na interação do vírus com as células alvo assim como o potencial vacinal desta região na geração de anticorpos neutralizante desprovidos de efeito ADE.

## REFERÊNCIAS\*

- ALHOOT, M. A.; RATHINAM, A. K.; WANG, S. M.; MANIKAM, R.; SEKARAN, S. D. Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 6, p. 719–729, 2013.
- AMORIM, J. H.; PEREIRA BIZERRA, R. S.; DOS SANTOS ALVES, R. P.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LEVI, J. E.; CAPURRO, M. L.; DE SOUZA FERREIRA, L. C. A Genetic and Pathologic Study of a DENV2 Clinical Isolate Capable of Inducing Encephalitis and Hematological Disturbances in Immunocompetent Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–12, 2012.
- AMORIM, J. H.; PORCHIA, B. F. M. M.; BALAN, A.; CAVALCANTE, R. C. M.; DA COSTA, S. M.; DE BARCELOS ALVES, A. M.; DE SOUZA FERREIRA, L. C. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, v. 167, n. 2, p. 186–192, 2010.
- AZEVEDO, A. S.; YAMAMURA, A. M. Y.; FREIRE, M. S.; TRINDADE, G. F.; BONALDO, M.; GALLER, R.; ALVES, A. M. B. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e20528, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3136928&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- BATISTA, M. T.; FERREIRA, E. L.; PEREIRA, G. de S.; STAFFORD, P.; MAEDA, D. L. N. F.; RODRIGUES, J. F.; BRADY, L. J.; JOHNSTON, S. A.; FERREIRA, L. C. de S.; FERREIRA, R. de C. C. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1. **Vaccine**, v. 35, n. 52, p. 7273–7282, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.007>>.
- BHATT, S.; GETHING, P.; BRADY, O.; MESSINA, J.; FARLOW, A.; MOYES, C. The global distribution and burden of dengue. **NIH-PA Author Manuscript Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2012.
- BOURNAZOS, S.; RAVETCH, J. V. Diversification of IgG effector functions. **International Immunology**, v. 29, n. 7, p. 303–310, 2017a.
- BOURNAZOS, S.; RAVETCH, J. V. Fcγ Receptor Function and the Design of Vaccination Strategies. **Immunity**, v. 47, n. 2, p. 224–233, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.009>>.
- BRAGA, C. J. M.; RODRIGUES, J. F.; MEDINA-ARMENTEROS, Y.; FARINHA-ARCIERI, L. E. Parenteral adjuvant effects of an enterotoxigenic *Escherichia coli* natural heat-labile toxin variant. v. 4, n. January, p. 1–11, 2014.
- BRERETON, C. F.; SUTTON, C. E.; ROSS, P. J.; IWAKURA, Y.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; ED, C.; MILLS, K. H. G. *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Promotes Protective Th17 Responses against Infection by Driving Innate IL-1 and IL-23 Production. 2011.
- CARDOSA, M. J. Dengue vaccine design: issues and challenges. **Br Med Bull**, v. 54, n. 2, p.

\* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2003.

395–405, 1998.

CHAICHANA, P.; OKABAYASHI, T.; PUIPROM, O.; SASAYAMA, M.; SASAKI, T.; YAMASHITA, A.; RAMASOOTA, P.; KUROSU, T.; IKUTA, K. Low Levels of Antibody-Dependent Enhancement in Vitro Using Viruses and Plasma from Dengue Patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92173, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092173>>.

CHAN, K. R.; ONG, E. Z.; MOK, D. Z. L.; OOI, E. E. Fc receptors and their influence on efficacy of therapeutic antibodies for treatment of viral diseases. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 11, p. 1351–60, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26466016><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4673539>>.

CLEMENTS, J. D.; FREYTAG, L. C. Parenteral vaccination can be an effective means of inducing protective mucosal responses. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 6, p. 438–441, 2016.

COCKBURN, J. J. B.; NAVARRO SANCHEZ, M. E.; FRETES, N.; URVOAS, A.; STAROPOLI, I.; KIKUTI, C. M.; COFFEY, L. L.; ARENZANA SEISDEDOS, F.; BEDOUELLE, H.; REY, F. a. Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody. **Structure**, v. 20, n. 2, p. 303–314, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2012.01.001>>.

CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **Journal of Virology**, v. 75, n. 16, p. 7769–7773, 2001. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.75.16.7769-7773.2001>>.

CRUZ-OLIVEIRA, C.; FREIRE, J. M.; CONCEICAO, T. M.; HIGA, L. M.; CASTANHO, M. A. R. B.; DA POIAN, A. T. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 155–170, 2015a. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/femsre/fuu004>>.

CRUZ-OLIVEIRA, C.; FREIRE, J. M.; CONCEIÇÃO, T. M.; HIGA, L. M.; CASTANHO, M. A. R. B.; DA POIAN, A. T. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 155–170, 2015b.

DE ALWIS, R.; SMITH, S. a.; OLIVAREZ, N. P.; MESSER, W. B.; HUYNH, J. P.; WAHALA, W. M. P. B.; WHITE, L. J.; DIAMOND, M. S.; BARIC, R. S.; CROWE, J. E.; DE SILVA, a. M. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 19, p. 7439–7444, 2012.

DELAMARRE, L.; COUTURE, R.; MELLMAN, I.; TROMBETTA, E. S. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 9, p. 2049–2055, 2006. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20052442>>.

DONNELL, B. O.; MAURER, A.; PAPANDREOU-SUPPAPPOLA, A.; STAFFORD, P. Time-Frequency Analysis of Peptide Microarray Data: Application to Brain Cancer Immunosignatures. v. 14, p. 219–233, 2015.

EDELHOCH, H. Spectroscopic Determination of Tryptophan. 1967.

- EPITOPES, C.; CRILL, W. D.; CHANG, G. J. Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein. **Cell**, v. 78, n. 24, p. 13975–13986, 2004.
- FAN, E.; MERRITT, E. A.; VERLINDE, C. L. M. J.; HOL, W. G. J. AB 5 toxins : structures and inhibitor design. p. 680–686, 2000.
- FLIPSE, J.; SMIT, J. M. The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003749, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003749>>.
- FLIPSE, J.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. **Traffic**, v. 14, n. 1, p. 25–35, 2013.
- FRASER, S. A.; HAAN, L. De; HEARN, A. R.; BONE, H. K.; SALMOND, R. J.; RIVETT, A. J.; WILLIAMS, N. A.; HIRST, T. R.; AL, F. E. T.; MMUN, I. N. I. Mutant *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin B Subunit That Separates Toxoid-Mediated Signaling and Immunomodulatory Action from Trafficking and Delivery Functions. v. 71, n. 3, p. 1527–1537, 2003.
- FREYTAG, L. C.; CLEMENTS, J. D. Mucosal adjuvants. v. 23, p. 1804–1813, 2005.
- GAN, E. S.; TING, D. H. R.; CHAN, K. R. The mechanistic role of antibodies to dengue virus in protection and disease pathogenesis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 15, n. 2, p. 111–119, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1254550>>.
- GARCIA, M.; WEHBE, M.; LÉVÊQUE, N.; BODET, C. Skin innate immune response to flaviviral infection. **European Cytokine Network**, v. 28, n. 2, p. 41–51, 2017. Disponível em: <[http://www.jle.com/download/ecn-310188-skin\\_innate\\_immune\\_response\\_to\\_flaviviral\\_infection-institutpasteur-WaxkU38AAQEAAFNL8GcAAAAD-u.pdf%0Ahttp://www.jle.com/fr/revues/ecn/e-docs/skin\\_innate\\_immune\\_response\\_to\\_flaviviral\\_infection\\_310188/article.phtml](http://www.jle.com/download/ecn-310188-skin_innate_immune_response_to_flaviviral_infection-institutpasteur-WaxkU38AAQEAAFNL8GcAAAAD-u.pdf%0Ahttp://www.jle.com/fr/revues/ecn/e-docs/skin_innate_immune_response_to_flaviviral_infection_310188/article.phtml)>.
- GREEN, A. M.; BEATTY, P. R.; HADJILAOU, A.; HARRIS, E. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. v. 426, n. 6, p. 1148–1160, 2015.
- GULLIAMS, M.; BRUHNS, P.; SAEYS, Y.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. The function of Fc  $\gamma$  receptors in dendritic cells and macrophages. v. 14, n. February, 2014.
- GUZMAN, M. G.; GUBLER, D. J.; IZQUIERDO, A.; MARTINEZ, E.; HALSTEAD, S. B. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–26, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>>.
- GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: A Continuing Global Threat. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, dez. 2010.
- GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614605729>>.
- HAAN, L. D. E.; HOLTROP, M.; VERWEIJ, W. R.; AGSTERIBBE, E. Mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the recombinant A subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. p. 706–713, 1999.

- HALPERIN, R. F.; STAFFORD, P.; EMERY, J. S.; NAVALKAR, K. A.; JOHNSTON, S. A. GuiTope : an application for mapping random- sequence peptides to protein sequences. v. 1, n. January, 2012.
- HALSTEAD, S. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 1, p. 201–217, 1977. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.146.1.201>>.
- HALSTEAD, S. B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. p. 1–18, 2014.
- HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301–4306, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11015568>>.
- JENSEN, S. M, NGUYEN, C. T, AND JEWETT, J. C. HHS Public Access. **J.Virol Methods**, v. 235, n. 4, p. 125–130, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4992633/>>.
- KAUFMANN, B.; ROSSMANN, M. G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457910002315>>.
- KLASSE, P. J.; SATTENTAU, Q. J. Occupancy and mechanism in anti body-mediated neutralization of animal viruses. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 2002, p. 2091–2108, 2002.
- KUHN, R. J.; DOWD, K. A.; BETH POST, C.; PIERSON, T. C. Shake, rattle, and roll: Impact of the dynamics of flavivirus particles on their interactions with the host. **Virology**, v. 479–480, p. 508–517, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.025>>.
- LASARO, M. A.; MATHIAS-SANTOS, C.; RODRIGUES, J. F.; FERREIRA, L. C. S. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 93–99, jan. 2009.
- LENCER, W. I.; SASLOWSKY, D. Raft trafficking of AB 5 subunit bacterial toxins. v. 1746, p. 314–321, 2005.
- LEWIS, D. J. M.; HUO, Z.; BARNETT, S.; KROMANN, I.; GIEMZA, R.; GALIZA, E.; WOODROW, M.; THIERRY-CARSTENSEN, B.; ANDERSEN, P.; NOVICKI, D.; DEL, G. Transient Facial Nerve Paralysis ( Bell ’ s Palsy ) following Intranasal Delivery of a Genetically Detoxified Mutant of *Escherichia coli* Heat Labile Toxin. v. 4, n. 9, p. 1–5, 2009.
- LOK, S.-M.; KOSTYUCHENKO, V.; NYBAKKEN, G. E.; HOLDAWAY, H. a; BATTISTI, A. J.; SUKUPOLVI-PETTY, S.; SEDLAK, D.; FREMONT, D. H.; CHIPMAN, P. R.; ROEHRIG, J. T.; DIAMOND, M. S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 3, p. 312–317, 2008.
- LU, X.; LI, X.; MO, Z.; JIN, F.; WANG, B.; ZHAO, H.; SHAN, X.; SHI, L. Rapid identification of chikungunya and dengue virus by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 5, p. 947–953, 2012.



- MAEDA, D. L. N. F.; BATISTA, M. T.; PEREIRA, L. R.; DE JESUS CINTRA, M.; AMORIM, J. H.; MATHIAS-SANTOS, C.; PEREIRA, S. A.; BOSCARDIN, S. B.; DOS RAMOS SILVA, S.; FAQUIM-MAURO, E. L.; SILVEIRA, V. B.; OLIVEIRA, D. B. L.; JOHNSTON, S. A.; DE SOUZA FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, J. F. Adjuvant-mediated epitope specificity and enhanced neutralizing activity of antibodies targeting dengue virus envelope protein. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 1–13, 2017.
- MALAVASI, N. V; FOGUEL, D.; BONAFE, C. F. S.; BRAGA, C. A. C. A.; CHURACHAMBI, R. M.; VIEIRA, J. M.; MORGANTI, L. Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 512–518, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.002>>.
- MALAVIGE, G. N.; OGG, G. S. T cell responses in dengue viral infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 4, p. 605–611, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.023>>.
- MALYALA, P.; SINGH, M. Endotoxin Limits in Formulations for Preclinical Research. v. 97, n. 6, p. 2041–2044, 2008.
- MATHEW, A.; TOWNSLEY, E.; ENNIS, F. A. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. **Future Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 411–425, 2014.
- MESSER, W. B.; ALWIS, R. De; YOUNT, B. L.; ROYAL, S. R.; HUYNH, J. P.; SMITH, S. a. Dengue virus envelope protein domain I / II hinge: a key target for dengue virus vaccine design? **Expert Reviews Vaccines**, v. 14, n. 1, p. 5–8, 2015.
- MONDOTTE, J. A.; LOZACH, P.-Y.; AMARA, A.; GAMARNIK, A. V. Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. **Journal of Virology**, v. 81, n. 13, p. 7136–7148, 2007. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00116-07>>.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.
- PANYA, A.; BANGPHOOMI, K.; CHOOWONGKOMON, K.; YENCHITSOMANUS, P. Peptide Inhibitors Against Dengue Virus Infection. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 84, n. 2, p. 148–157, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cbdd.12309>>.
- PASSOLD, J.; FERREIRA, S. I. A. C.; ZANETTI, C. R. Adjuvantes de vacinas : possibilidades de uso em seres humanos ou animais Vaccine adjuvants : possibilities for use in humans or animals. p. 116–124, 2004.
- PERERA, R.; KUHN, J. Stuctural Proteomics of Dengue Virus. **Curr Opin Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 369–377, 2008.
- PHYSIOL, A. J.; LIVER, G.; FEBRUARY, F.; BLOMME, B.; STEENKISTE, C. Van; GRASSI, P.; HASLAM, S. M.; CALLEWAERT, N.; VLIERBERGHE, H. Van; ZAUNER, G.; SELMAN, M. H. J.; BONDT, A.; ROMBOUTS, Y.; BLANK, D.; DEELDER, M.; WUHRER, M.; GENE, S.-; DEELDER, A. M.; HOKKE, C. H.; YAZDANBAKHSH, M.; WUHRER, M.; BLOMME, B.; STEENKISTE, C. Van; GRASSI, P.; HASLAM, S. M.; DELL, A.; CALLEWAERT, N.; VLIERBERGHE, H. Van. Alterations of serum protein N -glycosylation in two mouse models of chronic liver disease are hepatocyte and not B cell driven. n. February 2011, 2013.

- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 10, n. May, p. e12, 2008.
- PIERSON, T. C.; XU, Q.; NELSON, S.; OLIPHANT, T.; GRANT, E.; FREMONT, D. H.; DIAMOND, M. S. enhancement of West Nile virus infection. **Cell**, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2009a.
- PIERSON, T. C.; XU, Q.; NELSON, S.; OLIPHANT, T.; GRANT, E.; FREMONT, D. H.; DIAMOND, M. S. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. **Cell**, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2009b.
- POGGIANELLA, M.; CAMPOS, J. L. S.; CHAN, K. R.; TAN, H. C.; BESTAGNO, M.; OOI, E. E.; BURRONE, O. R. Dengue e protein domain iii-based dna immunisation induces strong antibody responses to all four viral serotypes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1–28, 2015. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84938562216&partnerID=40&md5=2aac9a6171719e02378fa689a69f8751>>.
- POKIDYSHEVA, E.; ZHANG, Y.; BATTISTI, A. J.; BATOR-KELLY, C. M.; CHIPMAN, P. R.; XIAO, C.; GREGORIO, G. G.; HENDRICKSON, W. A.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. Cryo-EM Reconstruction of Dengue Virus in Complex with the Carbohydrate Recognition Domain of DC-SIGN. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 485–493, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406000079>>.
- RIVINO, L. T cell immunity to dengue virus and implications for vaccine design. **Expert Review of Vaccines**, v. 15, n. 4, p. 443–453, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1586/14760584.2016.1116948>>.
- ROBBIANI, D. F.; BOZZACCO, L.; KEEFFE, J. R.; KHOURI, R.; OLSEN, P. C.; GAZUMYAN, A.; SCHAEFER-BABAJEW, D.; AVILA-RIOS, S.; NOGUEIRA, L.; PATEL, R.; AZZOPARDI, S. A.; UHL, L. F. K.; SAEED, M.; SEVILLA-REYES, E. E.; AGUDELO, M.; YAO, K. H.; GOLJANIN, J.; GRISTICK, H. B.; LEE, Y. E.; HURLEY, A.; CASKEY, M.; PAI, J.; OLIVEIRA, T.; WUNDER, E. A.; SACRAMENTO, G.; NERY, N.; ORGE, C.; COSTA, F.; REIS, M. G.; THOMAS, N. M.; EISENREICH, T.; WEINBERGER, D. M.; DE ALMEIDA, A. R. P.; WEST, A. P.; RICE, C. M.; BJORKMAN, P. J.; REYES-TERAN, G.; KO, A. I.; MACDONALD, M. R.; NUSSENZWEIG, M. C. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 597–609.e11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.024>>.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; VAN DER SCHAAR, H. M.; DA SILVA VOORHAM, J. M.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; LEI, H.-Y. Y.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Immature dengue virus: a veiled pathogen? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000718, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- 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*: Differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5222–5233, 2011.
- RYAN, E. J.; NEELA, E. M. C.; MURPHY, G. A.; STEWART, H.; HAGAN, D. O.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; MILLS, K. H. G. Mutants of *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin Act as

Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine : Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells. v. 67, n. 12, p. 6270–6280, 1999.

SCHEIBLHOFER, S.; LAIMER, J.; MACHADO, Y.; WEISS, R.; THALHAMER, J. Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 5, p. 479–489, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1306441>>.

SCHIEFFELIN, J. S.; COSTIN, J. M.; NICHOLSON, C. O.; ORGERON, N. M.; FONTAINE, K. a; ISERN, S.; MICHAEL, S. F.; ROBINSON, J. E. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. **Virology journal**, v. 7, n. M, p. 28, 2010.

SCHMIDT, A. G.; YANG, P. L.; HARRISON, S. C. Peptide Inhibitors of Dengue-Virus Entry Target a Late-Stage Fusion Intermediate. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000851, 2010. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000851>>.

SCREATON, G.; MONGKOLSAPAYA, J.; YACOUB, S.; ROBERTS, C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3916>>.

SKALICKOVA, S.; HEGER, Z.; KREJCOVA, L.; PEKARIK, V.; BASTL, K.; JANDA, J.; KOSTOLANSKY, F.; VARECKOVA, E.; ZITKA, O.; ADAM, V.; KIZEK, R. Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5428–5442, 2015.

SMIT, J. M.; MOESKER, B.; RODENHUIS-ZYBERT, I.; WILSCHUT, J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011.

SPROKHOLT, J.; HELGERS, L. C.; GEIJTENBEEK, T. B. H. Innate immune receptors drive dengue virus immune activation and disease. **Future Virology**, v. 13, n. 4, p. 287–305, 2018.

ST. JOHN, A. L.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 420–426, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3030>>.

STAFFORD, P.; CICHACZ, Z.; WOODBURY, N. W.; JOHNSTON, S. A. Immunosignature system for diagnosis of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 30, p. E3072–E3080, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1409432111>>.

STIASNY, K.; KIERMAYR, S.; HOLZMANN, H.; HEINZ, F. X. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. **Journal of virology**, v. 80, n. 19, p. 9557–9568, 2006.

SUKUPOLVI-PETTY, S.; AUSTIN, S. K.; PURTHA, W. E.; OLIPHANT, T.; NYBAKKEN, G. E.; SCHLESINGER, J. J.; ROEHRIG, J. T.; GROMOWSKI, G. D.; BARRETT, A. D.; FREMONT, D. H.; DIAMOND, M. S. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. **Journal of virology**, v. 81, n. 23, p. 12816–26, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2169112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

VAN DER SCHAAR, H. M.; WILSCHUT, J. C.; SMIT, J. M. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 613–629, 2009. Disponível em:

- <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298508001472>>.
- VANBLARGAN, L. A.; GOO, L.; PIERSON, T. C. Deconstructing the Antiviral Neutralizing-Antibody Response: Implications for Vaccine Development and Immunity. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 4, p. 989–1010, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27784796>>.
- VANUSA, P.; CONCEIC, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; DOOLAN, D. L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. v. 29, p. 1538–1544, 2011.
- WAGNER, D.; WITH, K. De; HUZLY, D.; HUFERT, F.; WEIDMANN, M.; BREISINGER, S.; EPPINGER, S. Nosocomial Acquisition of. v. 10, n. 10, 2004.
- WAHALA, W. M. P. B.; KRAUS, A. A.; HAYMORE, L. B.; ACCAVITTI-LOPER, M. A.; DE SILVA, A. M. Dengue virus neutralization by human immune sera: Role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, v. 392, n. 1, p. 103–113, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.06.037>>.
- WANG, Z.; LI, L.; PENNINGTON, J. G.; SHENG, J.; YAP, M. L.; PLEVKA, P.; MENG, G.; SUN, L.; JIANG, W.; ROSSMANN, M. G. Obstruction of dengue virus maturation by Fab fragments of the 2H2 antibody. **Journal of virology**, v. 87, n. 16, p. 8909–15, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3754034&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- WATTERSON, D.; ROBINSON, J.; CHAPPELL, K. J.; BUTLER, M. S.; EDWARDS, D. J.; FRY, S. R.; BERMINGHAM, I. M.; COOPER, M. A.; YOUNG, P. R. A generic screening platform for inhibitors of virus induced cell fusion using cellular electrical impedance. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep22791>>.
- WEISKOPF, D.; SETTE, A. T-cell immunity to infection with dengue virus in humans. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. MAR, p. 1–6, 2014.
- WEN, J.; SHRESTA, S. T Cell Immunity to Zika and Dengue Viral Infections. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 37, n. 11, p. 475–479, 2017. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2017.0106>>.
- WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518–528, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1690>>.
- WILLIAMS, K. L.; SUKUPOLVI-PETTY, S.; BELTRAMELLO, M.; JOHNSON, S.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; DIAMOND, M. S.; HARRIS, E. Therapeutic Efficacy of Antibodies Lacking FcγR against Lethal Dengue Virus Infection Is Due to Neutralizing Potency and Blocking of Enhancing Antibodies. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 2, 2013.
- XU, Y.; ZHANG, H.; XU, X. Enhancement of vaccine potency by fusing modified LTK63 into human papillomavirus type 16 chimeric virus-like particles. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 99–109, 2008.
- YAM-PUC, J. C.; CEDILLO-BARRÓN, L.; AGUILAR-MEDINA, E. M.; RAMOS-PAYÁN, R.; ESCOBAR-GUTIÉRREZ, A.; FLORES-ROMO, L. The cellular bases of antibody responses during dengue virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. JUN, p. 1–12, 2016.

YAUCH, L. E.; ZELLWEGER, R. M.; KOTTURI, M. F.; QUTUBUDDIN, A.; SIDNEY, J.; PETERS, B.; PRESTWOOD, T. R.; SETTE, A.; SHRESTA, S. A Protective Role for Dengue Virus-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells. **J Immunol.**, v. 182, n. 8, p. 4865–4873, 2010.

ZELLWEGER, R. M.; PRESTWOOD, T. R.; SHRESTA, S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 2, p. 128–139, 2010.

ZELLWEGER, R. M.; TANG, W. W.; EDDY, W. E.; KING, K.; SANCHEZ, M. C.; SHRESTA, S. CD8<sup>+</sup> T Cells Can Mediate Short-Term Protection against Heterotypic Dengue Virus Reinfection in Mice. **Journal of Virology**, v. 89, n. 12, p. 6494–6505, 2015. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00036-15>>.

ZHANG, C. Y.; BOOTH, J. W. Cell Biology: Divergent Intracellular Sorting of Fc  $\gamma$  RIIA and Fc  $\gamma$  RIIB2 Christine Y. Zhang and James W. Booth. p. 34250–34258, 2010.

ZHANG, X.; GE, P.; YU, X.; BRANNAN, J. M.; BI, G.; ZHANG, Q.; SCHEIN, S.; ZHOU, Z. H. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 105–110, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb.2463>>.



## APÊNDICE - A

# Adjuvant-Mediated Epitope Specificity and Enhanced Neutralizing Activity of Antibodies Targeting Dengue Virus Envelope Protein

Denicar Lina Nascimento Fabris Maeda<sup>1</sup>, Milene Tavares Batista<sup>1,2</sup>, Lennon Ramos Pereira<sup>1</sup>, Mariana de Jesus Cintra<sup>1</sup>, Jaime Henrique Amorim<sup>3</sup>, Camila Mathias-Santos<sup>1</sup>, Sara Araújo Pereira<sup>1</sup>, Silvia Beatriz Boscardin<sup>4</sup>, Sandriana dos Ramos Silva<sup>5</sup>, Eliana L. Faquim-Mauro<sup>6</sup>, Vanessa Barbosa Silveira<sup>7</sup>, Danielle Bruna Leal Oliveira<sup>7</sup>, Stephen Albert Johnston<sup>2</sup>, Luis Carlos de Souza Ferreira<sup>1\*</sup> and Juliana Falcão Rodrigues<sup>1</sup>

## OPEN ACCESS

## Edited by:

Laurent Rénia,  
Agency for Science, Technology and  
Research (A\*STAR), Singapore

## Reviewed by:

Katja Fink,  
Singapore Immunology Network  
(A\*STAR), Singapore  
Chiou-Feng Lin,  
Taipei Medical University, Taiwan

## \*Correspondence:

Luis Carlos de Souza Ferreira  
lcsf@usp.br

## Specialty section:

This article was submitted to  
Vaccines and Molecular  
Therapeutics,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 20 June 2017

Accepted: 05 September 2017

Published: 25 September 2017

## Citation:

Maeda DLNF, Batista MT, Pereira LR,  
de Jesus Cintra M, Amorim JH,  
Mathias-Santos C, Pereira SA,  
Boscardin SB, Silva SdR, Faquim-  
Mauro EL, Silveira VB, Oliveira DBL,  
Johnston SA, Ferreira LCdS and  
Rodrigues JF (2017) Adjuvant-  
Mediated Epitope Specificity and  
Enhanced Neutralizing Activity of  
Antibodies Targeting Dengue Virus  
Envelope Protein.  
*Front. Immunol.* 8:1175.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.01175

<sup>1</sup>Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Center for Innovation in Medicine, Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, AZ, United States, <sup>3</sup>Center of Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia, Bahia, Brazil, <sup>4</sup>Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>5</sup>Pasteur Institute, São Paulo, Brazil, <sup>6</sup>Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, <sup>7</sup>Clinical and Molecular Virology Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

The heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* display adjuvant effects to coadministered antigens, leading to enhanced production of serum antibodies. Despite extensive knowledge of the adjuvant properties of LT derivatives, including *in vitro*-generated non-toxic mutant forms, little is known about the capacity of these adjuvants to modulate the epitope specificity of antibodies directed against antigens. This study characterizes the role of LT and its non-toxic B subunit (LTB) in the modulation of antibody responses to a coadministered antigen, the dengue virus (DENV) envelope glycoprotein domain III (EDIII), which binds to surface receptors and mediates virus entry into host cells. In contrast to non-adjuvanted or alum-adjuvanted formulations, antibodies induced in mice immunized with LT or LTB showed enhanced virus-neutralization effects that were not ascribed to a subclass shift or antigen affinity. Nonetheless, immunosignature analyses revealed that purified LT-adjuvanted EDIII-specific antibodies display distinct epitope-binding patterns with regard to antibodies raised in mice immunized with EDIII or the alum-adjuvanted vaccine. Notably, the analyses led to the identification of a specific EDIII epitope located in the EF to FG loop, which is involved in the entry of DENV into eukaryotic cells. The present results demonstrate that LT and LTB modulate the epitope specificity of antibodies generated after immunization with coadministered antigens that, in the case of EDIII, was associated with the induction of neutralizing antibody responses. These results open perspectives for the more rational development of vaccines with enhanced protective effects against DENV infections.

**Keywords:** heat-labile toxins, labile toxins, adjuvants, dengue virus, envelope protein, vaccines, antibodies, immunosignature

## INTRODUCTION

Adjuvants are essential components of vaccines, particularly those composed of purified antigens, which naturally have lower immunogenicity than live attenuated microorganisms. Adjuvants are known for their ability to enhance the magnitude of adaptive immune responses, particularly antibody responses, to coadministered antigens; they may impact the longevity, antigen avidity, and modulation of isotype and IgG subclass switches (1, 2). To date, only a limited number of adjuvants have been incorporated into human vaccines, but several different substances, including bacterial toxins, are known for their strong and rather versatile adjuvant effects in various mammalian hosts (3, 4). We are investigating the changes in epitope recognition elicited by adjuvants.

Heat-labile toxins (LT) naturally produced by some enterotoxigenic *Escherichia coli* strains are enterotoxins endowed with potent adjuvant effects when coadministered with purified soluble or particulate antigens after delivery *via* different parenteral or mucosal routes (5–9). LTs, similarly to cholera toxin, are composed of one toxic A subunit with enzymatic ADP-ribosylation activity and a B subunit pentamer that binds to host cell receptors (10, 11). LT adjuvant effects, as well as those associated with *in vitro*-generated non-toxic LT derivatives, including purified B subunits and mutated LT forms, have primarily been ascribed to the activation of dendritic cells and B and T lymphocytes, leading to enhanced mucosal and serum antigen-specific antibody responses (6, 12–19). In addition, previous evidence indicated that LT derivative may modulate the epitope specificity of antibodies raised against coadministered antigen (12). Indeed, adjuvant-mediated modulation of epitope specificity of antibodies is still a poorly understood issue, particularly in situations involving the design of vaccines capable of inducing protective immunity to various infectious diseases.

Dengue fever is caused by an arbovirus transmitted by *Aedes aegypti* mosquitoes. Fifty to one hundred million people are affected by the disease in tropical and subtropical regions annually, and thousands are potentially at risk to develop more serious side effects, which may lead to death caused by the illness (20, 21). The dengue virus (DENV) has an envelope composed of a single protein (E) and encodes two other structural (prM and C proteins) and seven non-structural proteins (22–24). The glycoprotein E is composed of three structural and functional domains that mediate the initial steps of the DENV infectious cycle. Receptor binding is mainly triggered by domain III [envelope glycoprotein domain III (EDIII)], which leads to the subsequent entry and replication of virus into susceptible host cells (22, 24, 25). EDIII-specific antibodies can confer protection to DENV infection and have been considered protection correlates for anti-DENV vaccines (26–31). Nonetheless, depending on the specificity, concentration and affinity of antibodies targeting the E protein, antibodies may either block virus infection or promote enhancement of infection (the *antibody-dependent enhancement effect*—ADE) *via* cell entry mediated by Fc- $\gamma$  receptors (32–35).

Proteomics platforms such as microarrays have been exploited as promising high-throughput assays to measure humoral immune responses, assisting our understanding of the subtle characteristics of successful immunization, a key challenge in the rational

development of effective vaccines (36–38). The immunosignature technology is a microarray-based platform that uses unnatural randomized-sequence peptides, spotted in high density, as a universal and robust assay to identify antibody-binding patterns of natural or induced responses in both humans and mice. Due to its successful applicability for both infectious and non-infectious diseases, this platform can be used as a powerful tool for systematic studies of various vaccine approaches (39–46).

In this study, we compared the adjuvant effects of alum, LT and LTB in vaccine formulations containing a recombinant form of the DENV EDIII antigen. The results demonstrate that, in contrast to mice immunized with the alum-adjuvanted formulation, mice parenterally immunized with EDIII admixed with LT or LTB mounted a more efficient antibody response capable of inhibiting DENV infection. Immunosignature analysis of the humoral immune response elicited in vaccinated mice showed that LT differentially modulates the epitope specificity of the EDIII-specific IgG antibodies. In addition, the results led to the identification of an EDIII-derived peptide specifically involved in the infectivity of the virus into host cells. Together, this study emphasizes the role of adjuvants in the modulation of the epitope specificity of antibodies induced upon vaccination and, thus, may impact the development of anti-DENV and other subunit vaccines.

## MATERIALS AND METHODS

### Cloning of Adjuvant LTB

LTB was obtained after cloning the nucleotide sequence of the *eltB* gene (encoding the B subunit of the LT from H10407 strain) into the pET22b vector. The *eltB* sequence (450 bp) was amplified by PCR using the forward primer 5'-CAGAAGCGCGAATGACATATGAATAA-3' and reverse primer 5'-TTAAAAGCATGTCTCTCGAGAGAACC-3' (the underlined sequences indicate the *NdeI* and *XhoI* restriction sites, respectively). The insert generated by the PCR reaction was digested and ligated into the corresponding *NdeI* and *XhoI* restriction sites of the pET22b expression vector (Novagen-Merck Bioscience, MA, USA), generating the recombinant plasmid pET22bLTB, which was subsequently used to transform chemically competent *E. coli* DH5 $\alpha$ . Transformants were analyzed by digestion with the enzymes *NdeI* and *XhoI*. The recombinant DNA fragment was sequenced and compared to data reported for the LT sequence (GenBank database GI: 408994). A chemically competent *E. coli* BL21 (DE3) strain was transformed with the pET22bLTB plasmid and denominated as *E. coli* BL-LTB.

### Expression and Purification of Adjuvants

The LT and LTB adjuvants were obtained from *E. coli* strains harboring the plasmid pML19 (47, 48) or pET22bLTB, respectively. The purification of LT was based on a previously described method (47). The recombinant *E. coli* strains were cultivated in Luria-Bertani (LB) medium or Terrific Broth (TB) supplemented with 100  $\mu$ g/ml of ampicillin at 37°C in an orbital shaker (200 rpm). While LTB expression was obtained after 0.75 mM IPTG induction of the *E. coli* BL-LTB strain cultures for 6 h, LT production was achieved by constitutive expression of the *eltAB* gene in overnight

cultures of a pML19-harboring *E. coli* strain. The cell pellets were suspended, and the bacterial cells were disrupted by high pressure in a homogenizer (APLAB-10 model, ARTEPEÇAS, Brazil). The LT and LTB contained in the bacterial cell homogenates were purified by affinity chromatography on immobilized D-galactose columns (Pierce, Waltham, MA, USA) previously equilibrated with TEAN buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and 0.2 M NaCl, pH 7.4) in an Akta FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). The elution step was performed with TEAN supplemented with 0.3 M D-galactose. The proteins were monitored by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The concentrations of the purified proteins were determined by absorbance measurements in a spectrophotometer (Gene Quant spectrophotometer GE Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) as previously described (49).

### Cloning, Expression, and Purification of Antigen

The pE1D2 plasmid (50), harboring gene encoding the ectodomain of the envelope glycoprotein from the DENV2 New Guinea C (NGC) strain, was kindly provided by Dr. Ada Alves and used as template for PCR reactions. The sequences of the forward and reverse primers used in PCR reactions were 5'-ACATGCGAGGATCCG GAATGTCATACTCTAT-3' (the underlined sequence indicates the *Bam*HI restriction site) and 5'-GCCTTCTACTCGAGTTAC GATAGAAGTTCCTTTCTTA-3' (the underlined sequence indicates the *Xho*I restriction site), respectively. The PCR product was introduced into pET28a(+) expression vector (Novagen, Germany), generating the recombinant plasmid pDEDIII. The *E. coli* BL21 (DE3) strain harboring the plasmid pDEDIII was cultivated in LB medium containing 50 µg/ml kanamycin. The culture at an OD<sub>600nm</sub> of 0.5 was induced by IPTG to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 4 h. The bacterial pellet was suspended in buffer A (0.1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, pH 6.8) and lysed in the APLAB-10 homogenizer (ARTEPEÇAS, Brazil). The inclusion bodies were solubilized in buffer A supplemented with 8 M urea, and the recombinant protein was refolded in buffer A. The soluble protein was submitted to nickel affinity chromatography using a HisTrap™ HP column (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). The purified EDIII was evaluated by 15% SDS-PAGE and measured by spectrophotometry.

### Endotoxin Removal from Purified Protein Preparations

The endotoxin was removed using a Detoxi-gel Endotoxin Removing Gel (Pierce, Waltham, MA, USA), and any residual endotoxin was detected by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL 1000 kit (Lonza, Basel, Switzerland). Following treatment for LPS removal, the residual endotoxin contents in the LT, LTB, and EDIII samples were less than 0.1 EU/µg of protein, corresponding to the levels allowed for preclinical research (51).

### Biological Characterization of LT and LTB Adjuvants

The cytotoxic activity of the LT derivatives on the adrenal Y1 cells was evaluated as previously described (6). The Y1 cells

were seeded in 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and exposed to 1 µg of LT or LTB, or to phosphate-buffered saline (PBS) as negative control, diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Vitrocell Embriolife, Brazil) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS, Vitrocell Embriolife, Brazil). After 8 h of incubation, the cells were observed for the cytotoxic effect. The GM1-ELISA was performed as previously described (52) to evaluate LT binding to the cognate ganglioside GM1. Microtiter plates (Polysorp, Thermo Fisher-Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with GM1 ganglioside (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS (pH 7.4) and incubated overnight at room temperature in a humid chamber. Plates were blocked with PBS containing 0.1% BSA. Then, serially twofold diluted LT samples were applied in duplicate wells. To detect LT derivatives, the plates were sequentially incubated with anti-LT serum (titer equal to 10<sup>5</sup>) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Sigma-Aldrich) diluted to 1:1,000 and 1:3,000, respectively, in PBS containing 0.05% Tween-20 and 0.1% BSA. The chromogenic reactions developed with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were stopped with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and measured at A<sub>492nm</sub>.

### Analysis of the Biological Activity of Recombinant EDIII in Vero Cells

This assay was performed as previously described (53). African Green Monkey Kidney Epithelial Cells (Vero Line), which express receptors for E glycoprotein, were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% FBS and incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Cells were incubated with 100 µg/ml of EDIII protein in MEM at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 30 min. After washing with PBS with 2% FBS, Vero cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min, treated with anti-EDIII sera harvested from mice immunized with EDIII plus Freund's adjuvant for 60 min and subsequently with goat anti-mouse IgG conjugated to FITC (Invitrogen, Paisley, UK) for further 60 min. The FITC-stained Vero cells were detected by BD LSRFortessa flow cytometry (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), and the data were analyzed using the FlowJo v10 program.

### Animal Immunizations

All experiments involving mice were approved by the Committee on the Ethical Use of Laboratory Animals of the Institute of Biomedical Sciences (CEUA 198) at the University of São Paulo (USP), in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals adopted by the National Council of Animal Experimentation (CONCEA). The mice were obtained from the Isogenic Mouse Breeding Facility of Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences—USP. Female BALB/c mice (6–8 weeks old) were immunized *via* the subcutaneous (s.c.) route at days 0, 14, and 28 of the immunization protocol with the vaccine formulations. Groups of five BALB/c mice were treated with 100 µl of PBS alone as a negative control or PBS containing 10 µg of EDIII with or without one of the following adjuvants: 1.0 µg of LT, 3.2 µg of LTB, or 12.5 µg of Al(OH)<sub>3</sub> (Rehydrel, Reheis, NJ, USA). Serum samples were harvested 2 weeks after



cultures of a pML19-harboring *E. coli* strain. The cell pellets were suspended, and the bacterial cells were disrupted by high pressure in a homogenizer (APLAB-10 model, ARTEPEÇAS, Brazil). The LT and LTB contained in the bacterial cell homogenates were purified by affinity chromatography on immobilized D-galactose columns (Pierce, Waltham, MA, USA) previously equilibrated with TEAN buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, and 0.2 M NaCl, pH 7.4) in an Akta FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). The elution step was performed with TEAN supplemented with 0.3 M D-galactose. The proteins were monitored by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The concentrations of the purified proteins were determined by absorbance measurements in a spectrophotometer (Gene Quant spectrophotometer GE Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) as previously described (49).

### Cloning, Expression, and Purification of Antigen

The pE1D2 plasmid (50), harboring gene encoding the ectodomain of the envelope glycoprotein from the DENV2 New Guinea C (NGC) strain, was kindly provided by Dr. Ada Alves and used as template for PCR reactions. The sequences of the forward and reverse primers used in PCR reactions were 5'-ACATGCGAGGATCCGGAATGTCATACTCTAT-3' (the underlined sequence indicates the *Bam*HI restriction site) and 5'-GCCTTCTACTCGAGTTACGATAGAAGCTTCCTTTCTTA-3' (the underlined sequence indicates the *Xho*I restriction site), respectively. The PCR product was introduced into pET28a(+) expression vector (Novagen, Germany), generating the recombinant plasmid pDEDIII. The *E. coli* BL21 (DE3) strain harboring the plasmid pDEDIII was cultivated in LB medium containing 50 µg/ml kanamycin. The culture at an OD<sub>600nm</sub> of 0.5 was induced by IPTG to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 4 h. The bacterial pellet was suspended in buffer A (0.1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, pH 6.8) and lysed in the APLAB-10 homogenizer (ARTEPEÇAS, Brazil). The inclusion bodies were solubilized in buffer A supplemented with 8 M urea, and the recombinant protein was refolded in buffer A. The soluble protein was submitted to nickel affinity chromatography using a HisTrap™ HP column (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). The purified EDIII was evaluated by 15% SDS-PAGE and measured by spectrophotometry.

### Endotoxin Removal from Purified Protein Preparations

The endotoxin was removed using a Detoxi-gel Endotoxin Removing Gel (Pierce, Waltham, MA, USA), and any residual endotoxin was detected by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL 1000 kit (Lonza, Basel, Switzerland). Following treatment for LPS removal, the residual endotoxin contents in the LT, LTB, and EDIII samples were less than 0.1 EU/µg of protein, corresponding to the levels allowed for preclinical research (51).

### Biological Characterization of LT and LTB Adjuvants

The cytotoxic activity of the LT derivatives on the adrenal Y1 cells was evaluated as previously described (6). The Y1 cells

were seeded in 96-well plates (5 × 10<sup>4</sup> cells/well) and exposed to 1 µg of LT or LTB, or to phosphate-buffered saline (PBS) as negative control, diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Vitrocell Embriolife, Brazil) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS, Vitrocell Embriolife, Brazil). After 8 h of incubation, the cells were observed for the cytotoxic effect. The GM1-ELISA was performed as previously described (52) to evaluate LT binding to the cognate ganglioside GM1. Microtiter plates (Polysorp, Thermo Fisher-Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with GM1 ganglioside (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS (pH 7.4) and incubated overnight at room temperature in a humid chamber. Plates were blocked with PBS containing 0.1% BSA. Then, serially twofold diluted LT samples were applied in duplicate wells. To detect LT derivatives, the plates were sequentially incubated with anti-LT serum (titer equal to 10<sup>5</sup>) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Sigma-Aldrich) diluted to 1:1,000 and 1:3,000, respectively, in PBS containing 0.05% Tween-20 and 0.1% BSA. The chromogenic reactions developed with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were stopped with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and measured at A<sub>492nm</sub>.

### Analysis of the Biological Activity of Recombinant EDIII in Vero Cells

This assay was performed as previously described (53). African Green Monkey Kidney Epithelial Cells (Vero Line), which express receptors for E glycoprotein, were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% FBS and incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Cells were incubated with 100 µg/ml of EDIII protein in MEM at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 30 min. After washing with PBS with 2% FBS, Vero cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min, treated with anti-EDIII sera harvested from mice immunized with EDIII plus Freund's adjuvant for 60 min and subsequently with goat anti-mouse IgG conjugated to FITC (Invitrogen, Paisley, UK) for further 60 min. The FITC-stained Vero cells were detected by BD LSRFortessa flow cytometry (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), and the data were analyzed using the FlowJo v10 program.

### Animal Immunizations

All experiments involving mice were approved by the Committee on the Ethical Use of Laboratory Animals of the Institute of Biomedical Sciences (CEUA 198) at the University of São Paulo (USP), in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals adopted by the National Council of Animal Experimentation (CONCEA). The mice were obtained from the Isogenic Mouse Breeding Facility of Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences—USP. Female BALB/c mice (6–8 weeks old) were immunized *via* the subcutaneous (s.c.) route at days 0, 14, and 28 of the immunization protocol with the vaccine formulations. Groups of five BALB/c mice were treated with 100 µl of PBS alone as a negative control or PBS containing 10 µg of EDIII with or without one of the following adjuvants: 1.0 µg of LT, 3.2 µg of LTB, or 12.5 µg of Al(OH)<sub>3</sub> (Rehydragel, Reheis, NJ, USA). Serum samples were harvested 2 weeks after

cultures of a pML19-harboring *E. coli* strain. The cell pellets were suspended, and the bacterial cells were disrupted by high pressure in a homogenizer (APLAB-10 model, ARTEPEÇAS, Brazil). The LT and LTB contained in the bacterial cell homogenates were purified by affinity chromatography on immobilized D-galactose columns (Pierce, Waltham, MA, USA) previously equilibrated with TEAN buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and 0.2 M NaCl, pH 7.4) in an Akta FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). The elution step was performed with TEAN supplemented with 0.3 M D-galactose. The proteins were monitored by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The concentrations of the purified proteins were determined by absorbance measurements in a spectrophotometer (Gene Quant spectrophotometer GE Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) as previously described (49).

### Cloning, Expression, and Purification of Antigen

The pE1D2 plasmid (50), harboring gene encoding the ectodomain of the envelope glycoprotein from the DENV2 New Guinea C (NGC) strain, was kindly provided by Dr. Ada Alves and used as template for PCR reactions. The sequences of the forward and reverse primers used in PCR reactions were 5'-ACATGCGAGGATCCG GAATGTCATACTCTAT-3' (the underlined sequence indicates the *Bam*HI restriction site) and 5'-GCCTTCTACTCGAGTTAC GATAGAAGCTTCCTTTCTTA-3' (the underlined sequence indicates the *Xho*I restriction site), respectively. The PCR product was introduced into pET28a(+) expression vector (Novagen, Germany), generating the recombinant plasmid pDEDIII. The *E. coli* BL21 (DE3) strain harboring the plasmid pDEDIII was cultivated in LB medium containing 50 µg/ml kanamycin. The culture at an OD<sub>600nm</sub> of 0.5 was induced by IPTG to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 4 h. The bacterial pellet was suspended in buffer A (0.1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, pH 6.8) and lysed in the APLAB-10 homogenizer (ARTEPEÇAS, Brazil). The inclusion bodies were solubilized in buffer A supplemented with 8 M urea, and the recombinant protein was refolded in buffer A. The soluble protein was submitted to nickel affinity chromatography using a HisTrap™ HP column (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). The purified EDIII was evaluated by 15% SDS-PAGE and measured by spectrophotometry.

### Endotoxin Removal from Purified Protein Preparations

The endotoxin was removed using a Detoxi-gel Endotoxin Removing Gel (Pierce, Waltham, MA, USA), and any residual endotoxin was detected by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL 1000 kit (Lonza, Basel, Switzerland). Following treatment for LPS removal, the residual endotoxin contents in the LT, LTB, and EDIII samples were less than 0.1 EU/µg of protein, corresponding to the levels allowed for preclinical research (51).

### Biological Characterization of LT and LTB Adjuvants

The cytotoxic activity of the LT derivatives on the adrenal Y1 cells was evaluated as previously described (6). The Y1 cells

were seeded in 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and exposed to 1 µg of LT or LTB, or to phosphate-buffered saline (PBS) as negative control, diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Vitrocell Embriolife, Brazil) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS, Vitrocell Embriolife, Brazil). After 8 h of incubation, the cells were observed for the cytotoxic effect. The GM1-ELISA was performed as previously described (52) to evaluate LT binding to the cognate ganglioside GM1. Microtiter plates (Polysorp, Thermo Fisher-Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with GM1 ganglioside (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS (pH 7.4) and incubated overnight at room temperature in a humid chamber. Plates were blocked with PBS containing 0.1% BSA. Then, serially twofold diluted LT samples were applied in duplicate wells. To detect LT derivatives, the plates were sequentially incubated with anti-LT serum (titer equal to 10<sup>5</sup>) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Sigma-Aldrich) diluted to 1:1,000 and 1:3,000, respectively, in PBS containing 0.05% Tween-20 and 0.1% BSA. The chromogenic reactions developed with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were stopped with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and measured at A<sub>492nm</sub>.

### Analysis of the Biological Activity of Recombinant EDIII in Vero Cells

This assay was performed as previously described (53). African Green Monkey Kidney Epithelial Cells (Vero Line), which express receptors for E glycoprotein, were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% FBS and incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Cells were incubated with 100 µg/ml of EDIII protein in MEM at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 30 min. After washing with PBS with 2% FBS, Vero cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min, treated with anti-EDIII sera harvested from mice immunized with EDIII plus Freund's adjuvant for 60 min and subsequently with goat anti-mouse IgG conjugated to FITC (Invitrogen, Paisley, UK) for further 60 min. The FITC-stained Vero cells were detected by BD LSRFortessa flow cytometry (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), and the data were analyzed using the FlowJo v10 program.

### Animal Immunizations

All experiments involving mice were approved by the Committee on the Ethical Use of Laboratory Animals of the Institute of Biomedical Sciences (CEUA 198) at the University of São Paulo (USP), in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals adopted by the National Council of Animal Experimentation (CONCEA). The mice were obtained from the Isogenic Mouse Breeding Facility of Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences—USP. Female BALB/c mice (6–8 weeks old) were immunized *via* the subcutaneous (s.c.) route at days 0, 14, and 28 of the immunization protocol with the vaccine formulations. Groups of five BALB/c mice were treated with 100 µl of PBS alone as a negative control or PBS containing 10 µg of EDIII with or without one of the following adjuvants: 1.0 µg of LT, 3.2 µg of LTB, or 12.5 µg of Al(OH)<sub>3</sub> (Rehydragel, Reheis, NJ, USA). Serum samples were harvested 2 weeks after

cultures of a pML19-harboring *E. coli* strain. The cell pellets were suspended, and the bacterial cells were disrupted by high pressure in a homogenizer (APLAB-10 model, ARTEPEÇAS, Brazil). The LT and LTb contained in the bacterial cell homogenates were purified by affinity chromatography on immobilized D-galactose columns (Pierce, Waltham, MA, USA) previously equilibrated with TEAN buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and 0.2 M NaCl, pH 7.4) in an Akta FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). The elution step was performed with TEAN supplemented with 0.3 M D-galactose. The proteins were monitored by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The concentrations of the purified proteins were determined by absorbance measurements in a spectrophotometer (Gene Quant spectrophotometer GE Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) as previously described (49).

### Cloning, Expression, and Purification of Antigen

The pE1D2 plasmid (50), harboring gene encoding the ectodomain of the envelope glycoprotein from the DENV2 New Guinea C (NGC) strain, was kindly provided by Dr. Ada Alves and used as template for PCR reactions. The sequences of the forward and reverse primers used in PCR reactions were 5'-ACATGCGAGGATCCGGAATGTCATACTCTAT-3' (the underlined sequence indicates the *Bam*HI restriction site) and 5'-GCCTTCTACTCGAGTTACGATAGAACTTCCTTTCTTA-3' (the underlined sequence indicates the *Xho*I restriction site), respectively. The PCR product was introduced into pET28a(+) expression vector (Novagen, Germany), generating the recombinant plasmid pDEDIII. The *E. coli* BL21 (DE3) strain harboring the plasmid pDEDIII was cultivated in LB medium containing 50 µg/ml kanamycin. The culture at an OD<sub>600nm</sub> of 0.5 was induced by IPTG to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 4 h. The bacterial pellet was suspended in buffer A (0.1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, pH 6.8) and lysed in the APLAB-10 homogenizer (ARTEPEÇAS, Brazil). The inclusion bodies were solubilized in buffer A supplemented with 8 M urea, and the recombinant protein was refolded in buffer A. The soluble protein was submitted to nickel affinity chromatography using a HisTrap™ HP column (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). The purified EDIII was evaluated by 15% SDS-PAGE and measured by spectrophotometry.

### Endotoxin Removal from Purified Protein Preparations

The endotoxin was removed using a Detoxi-gel Endotoxin Removing Gel (Pierce, Waltham, MA, USA), and any residual endotoxin was detected by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL 1000 kit (Lonza, Basel, Switzerland). Following treatment for LPS removal, the residual endotoxin contents in the LT, LTb, and EDIII samples were less than 0.1 EU/µg of protein, corresponding to the levels allowed for preclinical research (51).

### Biological Characterization of LT and LTb Adjuvants

The cytotoxic activity of the LT derivatives on the adrenal Y1 cells was evaluated as previously described (6). The Y1 cells

were seeded in 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and exposed to 1 µg of LT or LTb, or to phosphate-buffered saline (PBS) as negative control, diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Vitrocell Embriolife, Brazil) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS, Vitrocell Embriolife, Brazil). After 8 h of incubation, the cells were observed for the cytotoxic effect. The GM1-ELISA was performed as previously described (52) to evaluate LT binding to the cognate ganglioside GM1. Microtiter plates (Polysorp, Thermo Fisher-Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with GM1 ganglioside (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS (pH 7.4) and incubated overnight at room temperature in a humid chamber. Plates were blocked with PBS containing 0.1% BSA. Then, serially twofold diluted LT samples were applied in duplicate wells. To detect LT derivatives, the plates were sequentially incubated with anti-LT serum (titer equal to 10<sup>5</sup>) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Sigma-Aldrich) diluted to 1:1,000 and 1:3,000, respectively, in PBS containing 0.05% Tween-20 and 0.1% BSA. The chromogenic reactions developed with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were stopped with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and measured at A<sub>492nm</sub>.

### Analysis of the Biological Activity of Recombinant EDIII in Vero Cells

This assay was performed as previously described (53). African Green Monkey Kidney Epithelial Cells (Vero Line), which express receptors for E glycoprotein, were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% FBS and incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Cells were incubated with 100 µg/ml of EDIII protein in MEM at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 30 min. After washing with PBS with 2% FBS, Vero cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min, treated with anti-EDIII sera harvested from mice immunized with EDIII plus Freund's adjuvant for 60 min and subsequently with goat anti-mouse IgG conjugated to FITC (Invitrogen, Paisley, UK) for further 60 min. The FITC-stained Vero cells were detected by BD LSRFortessa flow cytometry (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), and the data were analyzed using the FlowJo v10 program.

### Animal Immunizations

All experiments involving mice were approved by the Committee on the Ethical Use of Laboratory Animals of the Institute of Biomedical Sciences (CEUA 198) at the University of São Paulo (USP), in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals adopted by the National Council of Animal Experimentation (CONCEA). The mice were obtained from the Isogenic Mouse Breeding Facility of Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences—USP. Female BALB/c mice (6–8 weeks old) were immunized *via* the subcutaneous (s.c.) route at days 0, 14, and 28 of the immunization protocol with the vaccine formulations. Groups of five BALB/c mice were treated with 100 µl of PBS alone as a negative control or PBS containing 10 µg of EDIII with or without one of the following adjuvants: 1.0 µg of LT, 3.2 µg of LTb, or 12.5 µg of Al(OH)<sub>3</sub> (Rehydragel, Reheis, NJ, USA). Serum samples were harvested 2 weeks after

cultures of a pML19-harboring *E. coli* strain. The cell pellets were suspended, and the bacterial cells were disrupted by high pressure in a homogenizer (APLAB-10 model, ARTEPEÇAS, Brazil). The LT and LTB contained in the bacterial cell homogenates were purified by affinity chromatography on immobilized D-galactose columns (Pierce, Waltham, MA, USA) previously equilibrated with TEAN buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, and 0.2 M NaCl, pH 7.4) in an Akta FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). The elution step was performed with TEAN supplemented with 0.3 M D-galactose. The proteins were monitored by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The concentrations of the purified proteins were determined by absorbance measurements in a spectrophotometer (Gene Quant spectrophotometer GE Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) as previously described (49).

### Cloning, Expression, and Purification of Antigen

The pE1D2 plasmid (50), harboring gene encoding the ectodomain of the envelope glycoprotein from the DENV2 New Guinea C (NGC) strain, was kindly provided by Dr. Ada Alves and used as template for PCR reactions. The sequences of the forward and reverse primers used in PCR reactions were 5'-ACATGCGAGGATCCG GAATGTCATACTCTAT-3' (the underlined sequence indicates the *Bam*HI restriction site) and 5'-GCCTTCTACTCGAGTTAC GATAGAAGCTTCCTTTCTTA-3' (the underlined sequence indicates the *Xho*I restriction site), respectively. The PCR product was introduced into pET28a(+) expression vector (Novagen, Germany), generating the recombinant plasmid pDEDIII. The *E. coli* BL21 (DE3) strain harboring the plasmid pDEDIII was cultivated in LB medium containing 50 µg/ml kanamycin. The culture at an OD<sub>600nm</sub> of 0.5 was induced by IPTG to a final concentration of 0.5 mM and incubated for 4 h. The bacterial pellet was suspended in buffer A (0.1 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 M NaCl, pH 6.8) and lysed in the APLAB-10 homogenizer (ARTEPEÇAS, Brazil). The inclusion bodies were solubilized in buffer A supplemented with 8 M urea, and the recombinant protein was refolded in buffer A. The soluble protein was submitted to nickel affinity chromatography using a HisTrap™ HP column (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). The purified EDIII was evaluated by 15% SDS-PAGE and measured by spectrophotometry.

### Endotoxin Removal from Purified Protein Preparations

The endotoxin was removed using a Detoxi-gel Endotoxin Removing Gel (Pierce, Waltham, MA, USA), and any residual endotoxin was detected by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL 1000 kit (Lonza, Basel, Switzerland). Following treatment for LPS removal, the residual endotoxin contents in the LT, LTB, and EDIII samples were less than 0.1 EU/µg of protein, corresponding to the levels allowed for preclinical research (51).

### Biological Characterization of LT and LTB Adjuvants

The cytotoxic activity of the LT derivatives on the adrenal Y1 cells was evaluated as previously described (6). The Y1 cells

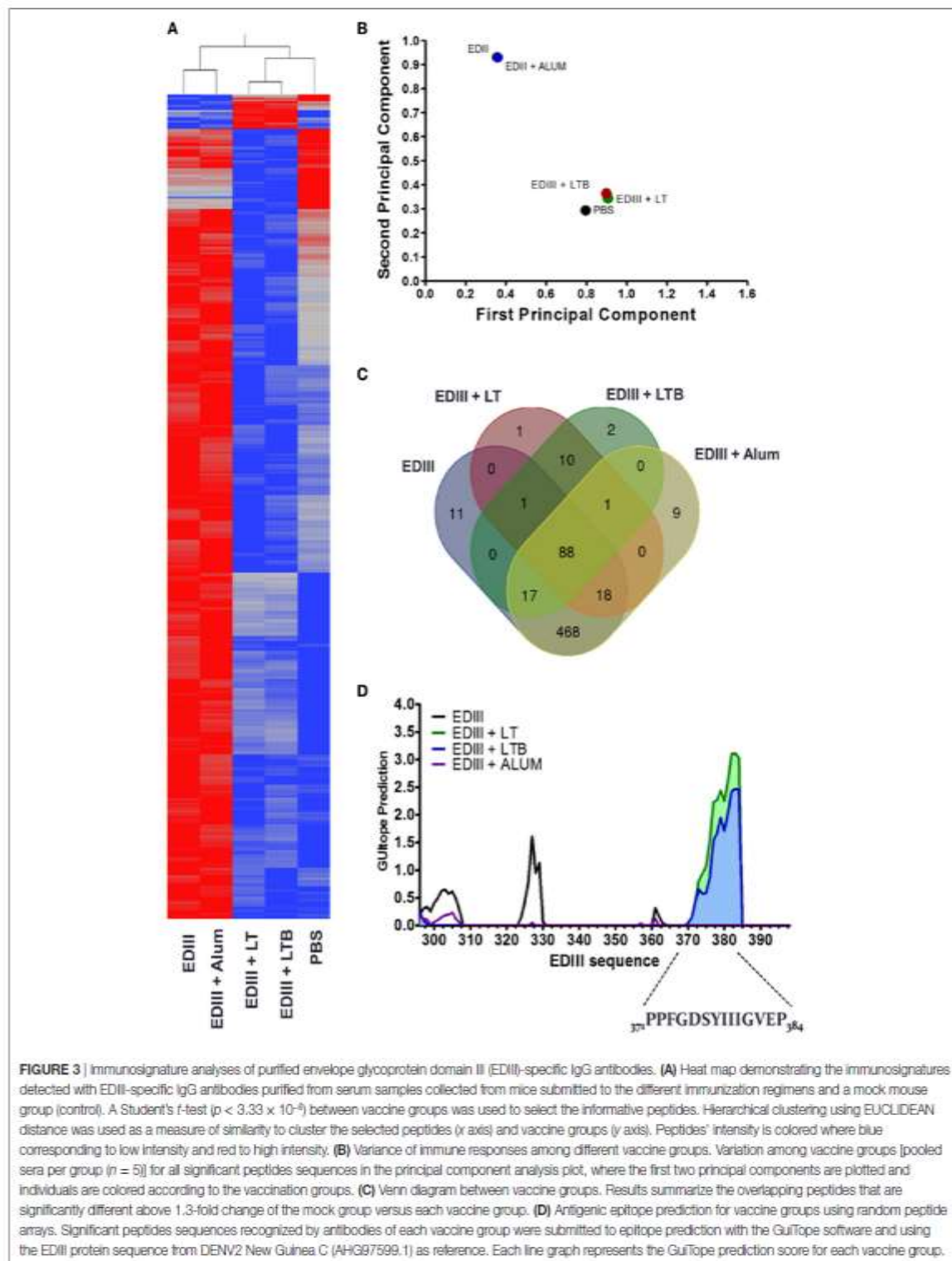
were seeded in 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and exposed to 1 µg of LT or LTB, or to phosphate-buffered saline (PBS) as negative control, diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Vitrocell Embriolife, Brazil) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS, Vitrocell Embriolife, Brazil). After 8 h of incubation, the cells were observed for the cytotoxic effect. The GM1-ELISA was performed as previously described (52) to evaluate LT binding to the cognate ganglioside GM1. Microtiter plates (Polysorp, Thermo Fisher-Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with GM1 ganglioside (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluted in PBS (pH 7.4) and incubated overnight at room temperature in a humid chamber. Plates were blocked with PBS containing 0.1% BSA. Then, serially twofold diluted LT samples were applied in duplicate wells. To detect LT derivatives, the plates were sequentially incubated with anti-LT serum (titer equal to 10<sup>5</sup>) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Sigma-Aldrich) diluted to 1:1,000 and 1:3,000, respectively, in PBS containing 0.05% Tween-20 and 0.1% BSA. The chromogenic reactions developed with ortho-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were stopped with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and measured at A<sub>492nm</sub>.

### Analysis of the Biological Activity of Recombinant EDIII in Vero Cells

This assay was performed as previously described (53). African Green Monkey Kidney Epithelial Cells (Vero Line), which express receptors for E glycoprotein, were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% FBS and incubated at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. Cells were incubated with 100 µg/ml of EDIII protein in MEM at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 30 min. After washing with PBS with 2% FBS, Vero cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min, treated with anti-EDIII sera harvested from mice immunized with EDIII plus Freund's adjuvant for 60 min and subsequently with goat anti-mouse IgG conjugated to FITC (Invitrogen, Paisley, UK) for further 60 min. The FITC-stained Vero cells were detected by BD LSRFortessa flow cytometry (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), and the data were analyzed using the FlowJo v10 program.

### Animal Immunizations

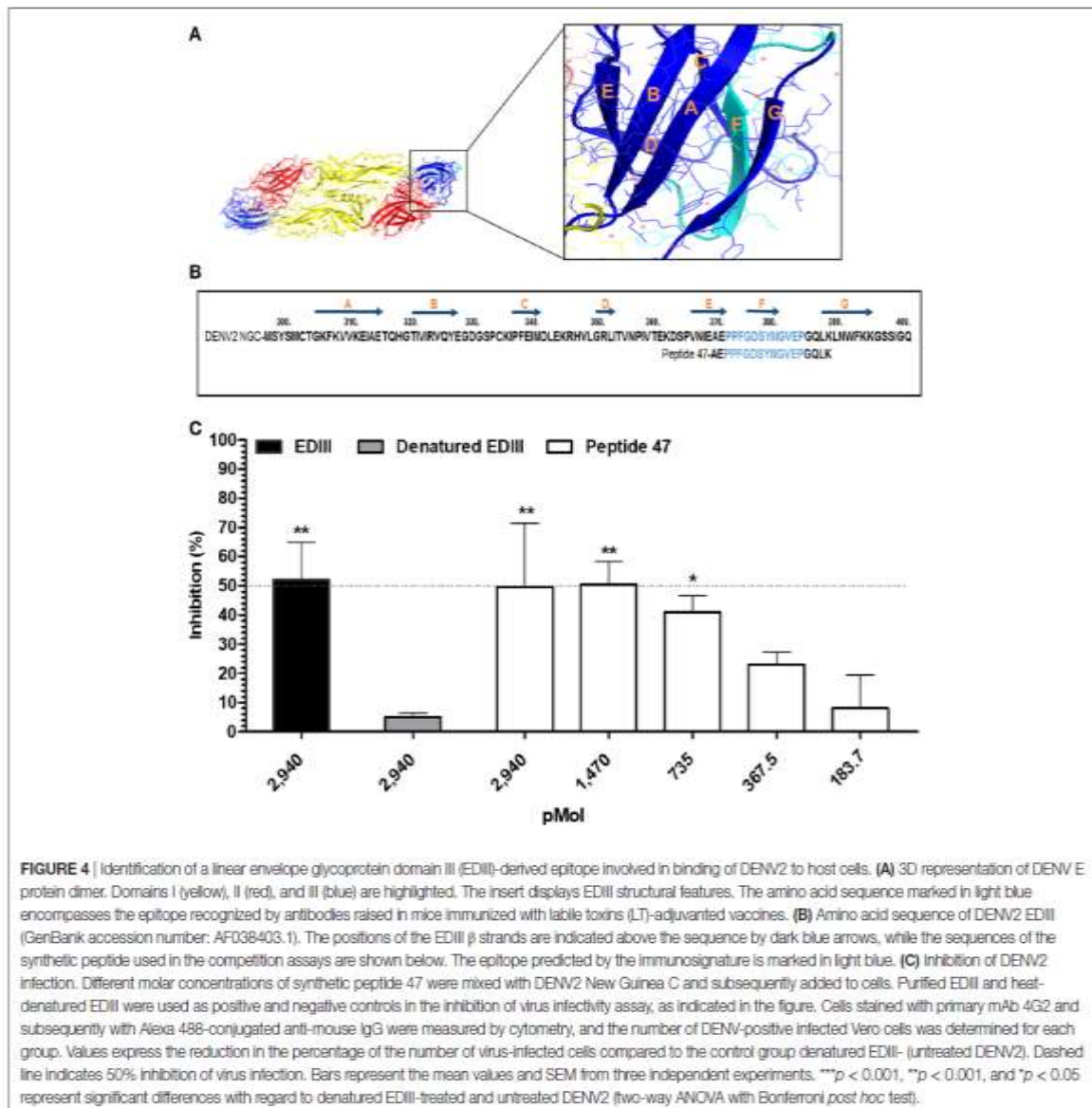
All experiments involving mice were approved by the Committee on the Ethical Use of Laboratory Animals of the Institute of Biomedical Sciences (CEUA 198) at the University of São Paulo (USP), in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals adopted by the National Council of Animal Experimentation (CONCEA). The mice were obtained from the Isogenic Mouse Breeding Facility of Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences—USP. Female BALB/c mice (6–8 weeks old) were immunized *via* the subcutaneous (s.c.) route at days 0, 14, and 28 of the immunization protocol with the vaccine formulations. Groups of five BALB/c mice were treated with 100 µl of PBS alone as a negative control or PBS containing 10 µg of EDIII with or without one of the following adjuvants: 1.0 µg of LT, 3.2 µg of LTB, or 12.5 µg of Al(OH)<sub>3</sub> (Rehydralgel, Reheis, NJ, USA). Serum samples were harvested 2 weeks after



strain in Vero cells. A similar inhibition of DENV infectious activity was achieved with the purified EDIII antigen, whereas the heat-denatured antigen lost the virus-infection inhibitory effect.

## DISCUSSION

A considerable amount of information regarding the use of bacterial toxins such as LT as vaccine adjuvants has accumulated



during the last four decades. Nonetheless, perspectives on the clinical use of non-toxic LT derivatives have been overshadowed by the induction of undesirable side effects (transient facial paralysis) observed in patients submitted to intranasal immunization trials (59). However, recent observations describing the successful use of LT derivatives as parenterally administered adjuvants rekindled interest in these adjuvants under both experimental and clinical conditions (8, 9, 60–62). In this study, we evaluated the adjuvant properties of LT and a non-toxic derivative composed of the B subunit pentamer as parenterally delivered adjuvants admixed with a recombinant form of the DENV2 EDIII. Our results demonstrated that, unlike alum, LT and LTB enhanced antibody responses to EDIII and induced the generation of antibodies with increased capacity to neutralize DENV2 particles. In addition, we demonstrated that both LT

and LTB drastically changed the epitope-binding profiles of EDIII-specific IgG antibodies. Immunosignature analyses performed with peptide microarrays led us to identify an epitope located between the EDIII EF and FG loops, which is specifically recognized by antibodies raised in mice immunized with LT or LTB but not by antibodies raised in mice immunized with alum-adjuvanted EDIII or non-adjuvanted antigen. Remarkably, a synthetic peptide encompassing the epitope identified by the immunosignature analyses interfered with the infectivity of DENV2 in mammalian cells, opening perspectives for therapeutic and preventive interventions. Collectively, this study demonstrated that LT derivatives can modulate the epitope specificity of antibodies after parenteral immunization with purified proteins and thus may contribute to the rational design of subunit vaccines for DENV and other infectious agents.

The evidence presented here demonstrates that LT used as a parenteral adjuvant promotes strong neutralizing antibody responses to DENV infection. Antibody neutralization titers achieved in mice immunized with EDIII and LT or LTB were significantly higher than those elicited in mice immunized with alum. In accordance with these findings, the EDIII-specific IgG fraction purified from mice immunized with LT or LTB showed greater virus-neutralizing activity than antibodies purified from mice immunized with alum. Furthermore, purified IgG collected from mice immunized with LT or LTB revealed a strong virus-neutralizing effect compared to the previously described anti-EDIII mAbs, such as 2H12, 9D12, and 1A1D-2 that block DENV infection under *in vitro* conditions with different intensity (26, 32, 63, 64). The results emphasize the fact that parenterally administered LT represents a promising adjuvant alternative comparable to the most potent adjuvants presently in use under both experimental and clinical conditions. In addition, the observation that purified LT B subunits exert similar adjuvant effects as LT indicated that the local inflammatory reactions induced by the enzymatically active toxin can be abrogated without reducing the immunomodulatory effects to coadministered antigens.

Our results obtained with purified IgGs demonstrated that the specificity, and not the magnitude, of the antibody response is critical in virus neutralization. In fact, antibody-mediated virus-neutralization activity has been strongly correlated with antibody/antigen interaction force and/or epitope recognition patterns (12, 26, 47). In our case, the distinct neutralization effects of the EDIII-specific polyclonal antibodies were not associated with antigen affinity. In accordance with these results, several studies have reported that the virus-neutralizing activity of anti-EDIII mAbs or sera does not necessarily correlate with antigen affinity (33, 35, 64–67). However, epitope recognition patterns of EDIII-specific mAbs showed a positive correlation with virus-infection blockage activity (26, 32–34, 65). In this context, we demonstrated that the immunosignature patterns of antibodies raised in mice immunized with LT derivatives differed drastically from those raised in mice immunized with non-adjuvanted EDIII or alum-adjuvanted antigen. More importantly, such differences correlated with an enhanced virus-neutralizing activity of the IgG antibodies induced by LT forms. Although corroborative evidence remains to be gathered, this study clearly demonstrated that adjuvant-mediated modulation of epitope recognition patterns by the antibodies raised is a critical aspect of vaccine-induced immune responses, particularly with regard to the induction of immunity to DENV.

In this report, the immunosignature analyses of EDIII-specific polyclonal antibodies disclosed that, in contrast to alum, incorporation of LT or LTB to vaccine formulation resulted in antibodies with increased specificity to the epitopes located at the EDIII EF and FG loops in addition to the F  $\beta$ -strand. In support of this concept, our study demonstrated that a synthetic peptide comprising the predicted epitope interfered with the *in vitro* infectivity of DENV, as measured with Vero cells. In addition, the lateral FG loop has been implicated in DENV infectivity both in mosquito and mammalian cells (57, 68, 69). More importantly, part of the EDIII epitope unveiled by the immunosignature analyses, comprising the F  $\beta$ -strand

and FG loops, has also been identified as a target epitope for anti-DENV and anti-ZIKV mAbs isolated from high responders in clinical studies with ZIKV-infected individuals (70). Together, these findings emphasize the relevance of the EDIII lateral ridge region as a target for antibodies capable of conferring protection from flaviviruses.

The role of LT derivatives, in the context of active immunization practices, on the modulation of epitope recognition profiles of antibodies has been scarcely investigated. Here, and in previous reports, we have demonstrated that LT derivatives shape the epitope recognition profile of antibodies to different pathogens [(12), unpublished data]. Previous studies have demonstrated that LT derivatives improve the expression of co-stimulatory molecules on B lymphocytes and dendritic cells and, consequently, on prime CD4<sup>+</sup> T cells, leading to modulation of Th1/Th2/Th17 cytokine production patterns (12, 17, 19, 71–73). Although future studies will have to be performed, the capacity to program B cells using cognate T helper lymphocytes, concomitant with direct activation effects, may represent possible alternatives to explain the action of LT derivatives on the modulation of the epitope recognition pattern of antibodies.

Synthetic peptides have been largely exploited in therapeutic approaches against viral diseases such as hepatitis, acquired immunodeficiency syndrome and influenza (74). However, little effort has investigated the use of peptides for treatment of arboviruses. Anti-dengue peptides under pre-clinical evaluation were designed after *in silico* analyses and target the stem region, hydrophobic pocket or FG loop of the E glycoprotein (57, 69, 75, 76). These peptides showed half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) for virus infection or binding to host cells at micromolar levels (57, 75, 76). Here, based on a different experimental approach, we report the identification of a peptide that affects DENV infectivity with an IC<sub>50</sub> in nanomolar concentration range. In contrast to previous approaches, our results demonstrate that, besides having a direct effect on the host cell/virus interaction, such peptides may be amenable to generated protective antibody responses and therefore find both prophylactic and therapeutic applications.

Epitope mapping based on linear peptides has been a routine technique for the characterization of both monoclonal and specific polyclonal antibodies. The antibody immunosignature approach relies on the use of random peptides microarrays that broader the epitope screening inasmuch not specific to a pathogen or a vaccine, resulting in reduced cost and time. In addition, random peptides can be reactive with antibodies directed against conformational epitopes, which are not possible with conventional peptide microarray (40, 76). In fact, our data showed that even without the specific EDIII sequences on the array it was possible to detect DENV neutralizing peptide demonstrating the applicability of this technique.

In conclusion, our results demonstrated that LT and LTB enhance both the magnitude and the specificity of the antibody responses elicited in mice immunized with an anti-DENV subunit vaccine, promoting changes to the epitope-binding profiles that, in turn, lead to enhanced virus-neutralization effects with regard to alum. Such findings bring relevant insights into the design of vaccine formulations based on purified proteins and the

induction of antibodies capable of preventing infections associated with different pathogens.

## ETHICS STATEMENT

All experiments involving mice were approved by the Committee on the Ethical Use of Laboratory Animals of the Institute of Biomedical Sciences (CEUA 198) at the University of São Paulo (USP), in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals adopted by the National Council of Animal Experimentation (CONCEA). The mice were obtained from the Isogenic Mouse Breeding Facility of Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences—USP.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: DM, CM-S, SS, LF, and JR. Performed the experiments: DM, MB, LP, MJ, SP, SS, VS, and DO. Analyzed the data: DM, MB, JA, SJ, LF, and JR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JA, SB, EM, SJ, LF, and JR. Wrote the paper: DM, MB, LF, and JR. All the authors reviewed the manuscript.

## REFERENCES

- Pasquale A, Preiss S, Silva F, Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel)* (2015) 3:320–43. doi:10.3390/vaccines3020320
- Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* (2010) 33:492–503. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002
- O'Hagan DT, De Gregorio E. The path to a successful vaccine adjuvant – “The long and winding road”. *Drug Discov Today* (2009) 14:541–51. doi:10.1016/j.drudis.2009.02.009
- Savelkoul HFJ, Ferro VA, Strioga MM, Schijns VEJC. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. *Vaccines (Basel)* (2015) 3:148–71. doi:10.3390/vaccines3010148
- da Hora VP, Conceição FR, Dellagostin OA, Doolan DL. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. *Vaccine* (2011) 29:1538–44. doi:10.1016/j.vaccine.2010.11.091
- Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Sbrogio-Almeida ME, Amorim JH, Cabrera-Crespo J, Balan A, et al. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*: differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) AND LT4 (pLT). *J Biol Chem* (2011) 286:5222–33. doi:10.1074/jbc.M110.173682
- Luiz WB, Rodrigues JF, Crabb JH, Savarino SJ, Ferreira LCS. Maternal vaccination with a fimbrial tip adhesin and passive protection of neonatal mice against lethal human enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge. *Infect Immun* (2015) 83:4555–64. doi:10.1128/IAI.00858-15
- Braga CJM, Rodrigues JF, Medina-Armenteros Y, Farinha-Arcieri LE, Ventura AM, Boscardin SB, et al. Parenteral adjuvant effects of an enterotoxigenic *Escherichia coli* natural heat-labile toxin variant. *Front Immunol* (2014) 4:487. doi:10.3389/fimmu.2013.00487
- Hu JC, Mathias-Santos C, Greene CJ, King-Lyons ND, Rodrigues JF, Hajishengallis G, et al. Intradermal administration of the type II heat-labile enterotoxins LT-IIb and LT-IIc of enterotoxigenic *Escherichia coli* enhances humoral and CD8+ T cell immunity to a co-administered antigen. *PLoS One* (2014) 9:e113978. doi:10.1371/journal.pone.0113978
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* (1998) 11:142–201.
- Lencer WI, Hirst TR, Holmes RK. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1450:177–90. doi:10.1016/S0167-4889(99)00070-1

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants to LCSF: 2012/51204-2, 2014/17595-0), the Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grants to JR and EF-M, respectively: 485546/2012-4 and 309392/2015-2), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES grant: 88887.116618/2016-01–AUXPE 0448/2016). At ASU by a grant from the Department of Homeland Security to SJ and the CIM Peptide Array Core (HSHQDC-15-C-B0008). The authors thank Dr. Phillip Stafford for his invaluable assistance, and the authors acknowledge the helpful technical assistance of E. G. Martins, C. Bertelli, Pattie Madjidi, and Penny Gwynne.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01175/full#supplementary-material>.

- Batista MT, Souza RD, Ferreira EL, Robinette R, Crowley PJ, Rodrigues JF, et al. Immunogenicity and in vitro and in vivo protective effects of antibodies targeting a recombinant form of the *Streptococcus mutans* P1 surface protein. *Infect Immun* (2014) 82:4978–88. doi:10.1128/IAI.02074-14
- Luo Q, Vickers TJ, Fleckenstein JM. Immunogenicity and protective efficacy against enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization following intradermal, sublingual, or oral vaccination with EtpA adhesin. *Clin Vaccine Immunol* (2016) 23:628–37. doi:10.1128/CVI.00248-16
- Giuliani MM, Del Giudice G, Giannelli V, Dougan G, Douce G, Rappuoli R, et al. Mucosal adjuvant activity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. *J Exp Med* (1998) 187:1123–32. doi:10.1084/jem.187.7.1123
- de Haan L, Verweij W, Agsteribbe E, Wilschut J. The role of ADP-ribosylation and GM1-binding activity in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and *Vibrio cholerae* cholera toxin. *Immunol Cell Biol* (1998) 76:270–9. doi:10.1046/j.1440-1711.1998.00745.x
- Summerton NA, Welch RW, Bondoc L, Yang H-H, Pleune B, Ramachandran N, et al. Toward the development of a stable, freeze-dried formulation of *Helicobacter pylori* killed whole cell vaccine adjuvanted with a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Vaccine* (2010) 28:1404–11. doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.147
- Ryan EJ, McNeela E, Pizza M, Rappuoli R, O'Neill L, Mills KH. 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 Immunol* (2000) 165:5750–9. doi:10.4049/jimmunol.165.10.5750
- Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. *J Dent Res* (2005) 84:1104–16. doi:10.1177/154405910508401205
- Brereton CF, Sutton CE, Ross PJ, Iwakura Y, Pizza M, Rappuoli R, et al. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against infection by driving innate IL-1 and IL-23 production. *J Immunol* (2011) 186:5896–906. doi:10.4049/jimmunol.1003789
- Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis* (2016) 16:712–23. doi:10.1016/S1473-3099(16)00026-8



21. WHO. *Dengue Vaccine: WHO Position Paper*. (2016). Available from: <http://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf>
22. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* (2002) 108:717–25. doi:10.1016/S0092-8674(02)00660-8
23. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol* (2012) 55:289–95. doi:10.1016/j.jcv.2012.08.024
24. Kaufmann B, Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect* (2011) 13:1–9. doi:10.1016/j.micinf.2010.09.005
25. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* (2005) 3:13–22. doi:10.1038/nrmicro1067
26. Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Purtha WE, Oliphant T, Nybakken GE, Schlesinger JJ, et al. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol* (2007) 81:12816–26. doi:10.1128/JVI.00432-07
27. Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, Macagno A, Simonelli L, Quyen NTH, et al. The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* (2010) 8:271–83. doi:10.1016/j.chom.2010.08.007
28. Chiang C-Y, Hsieh C-H, Chen M-Y, Tsai J-P, Liu H-H, Liu S-J, et al. Recombinant lipidated dengue-4 envelope protein domain III elicits protective immunity. *Vaccine* (2014) 32:1346–53. doi:10.1016/j.vaccine.2014.01.041
29. Chiang C-Y, Huang M-H, Hsieh C-H, Chen M-Y, Liu H-H, Tsai J-P, et al. Dengue-1 envelope protein domain III along with PELC and CpG oligodeoxynucleotides synergistically enhances immune responses. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6:e1645. doi:10.1371/journal.pntd.0001645
30. Etemad B, Batra G, Raut R, Dahiya S, Khanam S, Swaminathan S, et al. An envelope domain III-based chimeric antigen produced in *Pichia pastoris* elicits neutralizing antibodies against all four dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hyg* (2008) 79:353–63.
31. Bernardo L, Pavan A, Hermida L, Gil L, Valdes I, Cabezas S, et al. The two component adjuvant IC31 potentiates the protective immunity induced by a dengue 2 recombinant fusion protein in mice. *Vaccine* (2011) 29:4256–63. doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.040
32. Lok S-M, Kostyuchenko V, Nybakken GE, Holdaway HA, Battisti AJ, Sukupolvi-Petty S, et al. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. *Nat Struct Mol Biol* (2008) 15:312–7. doi:10.1038/nsmb.1382
33. Cockburn JJB, Navarro Sanchez ME, Fretes N, Urvoas A, Staropoli I, Kikuti CM, et al. Mechanism of dengue virus broad cross-neutralization by a monoclonal antibody. *Structure* (2012) 20:303–14. doi:10.1016/j.str.2012.01.001
34. Li X-Q, Qiu L-W, Chen Y, Wen K, Cai J-P, Chen J, et al. Dengue virus envelope domain III immunization elicits predominantly cross-reactive, poorly neutralizing antibodies localized to the AB loop: implications for dengue vaccine design. *J Gen Virol* (2013) 94:2191–201. doi:10.1099/vir.0.055178-0
35. Poggianella M, Slon Campos JL, Chan KR, Tan HC, Bestagno M, Ooi EE, et al. Dengue E protein domain III-based DNA immunisation induces strong antibody responses to all four viral serotypes. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) 9:e0003947. doi:10.1371/journal.pntd.0003947
36. Price JV, Jarrell JA, Furman D, Kattah NH, Newell E, Dekker CL, et al. Characterization of influenza vaccine immunogenicity using influenza antigen microarrays. *PLoS One* (2013) 8:e64555. doi:10.1371/journal.pone.0064555
37. Valentini D, Rao M, Rane L, Rahman S, Axelsson-Robertson R, Heuchel R, et al. Peptide microarray-based characterization of antibody responses to host proteins after bacille Calmette–Guérin vaccination. *Int J Infect Dis* (2017) 56:140–54. doi:10.1016/j.ijid.2017.01.027
38. Wumkes ML, van der Velden AMT, de Bruin E, Meerveld-Eggink A, Koopmans MPG, Rimmelzwaan GF, et al. Microarray profile of the humoral immune response to influenza vaccination in breast cancer patients treated with chemotherapy. *Vaccine* (2017) 35:1299–305. doi:10.1016/j.vaccine.2017.01.039
39. Stafford P, Cichacz Z, Woodbury NW, Johnston SA. Immunofingerprinting system for diagnosis of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:E3072–80. doi:10.1073/pnas.1409432111
40. O'Donnell B, Maurer A, Papandreou-Suppappola A, Stafford P. Time-frequency analysis of peptide microarray data: application to brain cancer immunofingerprints. *Cancer Inform* (2015) 14:219–33. doi:10.4137/Cln.s17285
41. Legutki JB, Johnston SA. Immunofingerprints can predict vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:18614–9. doi:10.1073/pnas.1309390110
42. Legutki JB, Magee DM, Stafford P, Johnston SA. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine* (2010) 28:4529–37. doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.061
43. Hughes AK, Cichacz Z, Scheck A, Coons SW, Johnston SA, Stafford P. Immunofingerprinting can detect products from molecular markers in brain cancer. *PLoS One* (2012) 7:e40201. doi:10.1371/journal.pone.0040201
44. Sykes KF, Legutki JB, Stafford P. Immunofingerprinting: a critical review. *Trends Biotechnol* (2013) 31:45–51. doi:10.1016/j.tibtech.2012.10.012
45. Singh S, Stafford P, Schlauch KA, Tillett RR, Gollery M, Johnston SA, et al. Humoral immunity profiling of subjects with myalgic encephalomyelitis using a random peptide microarray differentiates cases from controls with high specificity and sensitivity. *Mol Neurobiol* (2016). doi:10.1007/s12035-016-0334-0
46. Johnston SA, Thamm DH, Legutki JB. The immunofingerprint of canine lymphoma: characterization and diagnostic application. *BMC Cancer* (2014) 14:657. doi:10.1186/1471-2407-14-657
47. Lasaro MA, Mathias-Santos C, Rodrigues JF, Ferreira LCS. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *FEMS Immunol Med Microbiol* (2009) 55:93–9. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00506.x
48. Lasaro MA, Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Guth BEC, Balan A, Sbrógio-Almeida ME, et al. Genetic diversity of heat-labile toxin expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Bacteriol* (2008) 190:2400–10. doi:10.1128/JB.00988-07
49. Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* (1967) 6:1948–54. doi:10.1021/bi00859a010
50. Azevedo AS, Yamamura AMY, Freire MS, Trindade GF, Bonaldo M, Galler R, et al. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PLoS One* (2011) 6:e20528. doi:10.1371/journal.pone.0020528
51. Malyala P, Singh M. Endotoxin limits in formulations for preclinical research. *J Pharm Sci* (2008) 97:2041–4. doi:10.1002/jps.21152
52. Lasaro MAS, Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Guth BEC, Régua-Mangia A, Piantino Ferreira AJ, et al. Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2006) 48:123–31. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00134.x
53. Amorim JH, Diniz MO, Cariri FAMO, Rodrigues JF, Bizerra RSP, Gonçalves AJS, et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine* (2012) 30:837–45. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.034
54. Kostner GM, Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G, Quinci GB. Determination of high-density lipoproteins: screening methods compared. *Clin Chem* (1979) 25:939–42.
55. Halperin RE, Stafford P, Emery JS, Navalkar KA, Johnston SA. GuiTope: an application for mapping random-sequence peptides to protein sequences. *BMC Bioinformatics* (2012) 13:1. doi:10.1186/1471-2105-13-1
56. Chen L, Liu Y, Wang S, Sun J, Wang P, Xin Q, et al. Antiviral activity of peptide inhibitors derived from the protein E stem against Japanese encephalitis and Zika viruses. *Antiviral Res* (2017) 141:140–9. doi:10.1016/j.antiviral.2017.02.009
57. Alhoot MA, Rathinam AK, Wang SM, Manikam R, Sekaran SD. Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. *Int J Med Sci* (2013) 10:719–29. doi:10.7150/ijms.5037
58. Wagner D, de With K, Huzly D, Hufert F, Weidmann M, Breisinger S, et al. Nosocomial acquisition of dengue. *Emerg Infect Dis* (2004) 10:1872–3. doi:10.3201/eid1010.031037
59. Lewis DJM, Huo Z, Barnett S, Kromann I, Giemza R, Galiza E, et al. Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of *Escherichia coli* heat labile toxin. *PLoS One* (2009) 4:e6999. doi:10.1371/journal.pone.0006999
60. Mathias-Santos C, Rodrigues JF, Sbrógio-Almeida ME, Connell TD, Ferreira LCS. Distinctive immunomodulatory and inflammatory properties of the *Escherichia coli* type II heat-labile enterotoxin LT-IIa and its B pentamer following intradermal administration. *Clin Vaccine Immunol* (2011) 18:1243–51. doi:10.1128/CLVI.00012-11

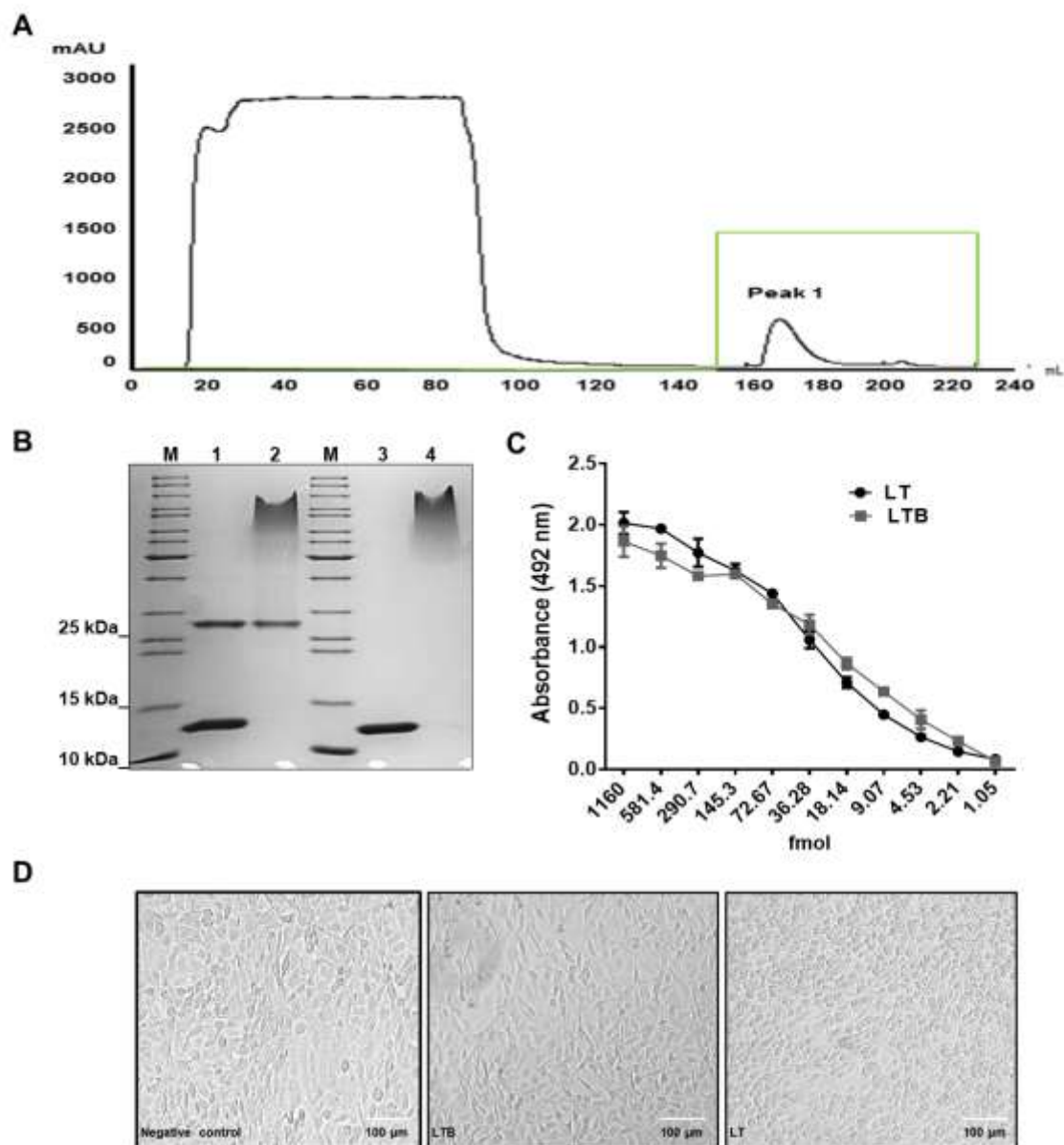
61. Diaz-Montero CM, Chiappori A, Aurisicchio L, Bagchi A, Clark J, Dubey S, et al. Phase 1 studies of the safety and immunogenicity of electroporated HER2/CEA DNA vaccine followed by adenoviral boost immunization in patients with solid tumors. *J Transl Med* (2013) 11:62. doi:10.1186/1479-5876-11-62
62. Clements JD, Freytag LC. Parenteral vaccination can be an effective means of inducing protective mucosal responses. *Clin Vaccine Immunol* (2016) 23:438–41. doi:10.1128/CVI.00214-16
63. Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to vero cells. *J Virol* (2001) 75:7769–73. doi:10.1128/JVI.75.16.7769-7773.2001
64. Midgley CM, Flanagan A, Tran HB, Dejnirattisai W, Chawansuntati K, Jumnainsong A, et al. Structural analysis of a dengue cross-reactive antibody complexed with envelope domain III reveals the molecular basis of cross-reactivity. *J Immunol* (2012) 188:4971–9. doi:10.4049/jimmunol.1200227
65. Wahala WMPB, Donaldson EF, De Alwis R, Accavitti-Loper MA, Baric RS, De Silva AM. Natural strain variation and antibody neutralization of dengue serotype 3 viruses. *PLoS Pathog* (2010) 6:e1000821. doi:10.1371/journal.ppat.1000821
66. Costin JM, Zaitseva E, Kahle KM, Nicholson CO, Rowe DK, Graham AS, et al. Mechanistic study of broadly neutralizing human monoclonal antibodies against dengue virus that target the fusion loop. *J Virol* (2013) 87:52–66. doi:10.1128/JVI.02273-12
67. Rodenhuis-Zybert IA, da Silva Voorham JM, Torres S, van de Pol D, Smit JM. Antibodies against immature virions are not a discriminating factor for dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) 9:e0003564. doi:10.1371/journal.pntd.0003564
68. Erb SM, Butrapet S, Moss KJ, Luy BE, Childers T, Calvert AE, et al. Domain-III FG loop of the dengue virus type 2 envelope protein is important for infection of mammalian cells and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology* (2010) 406:328–35. doi:10.1016/j.virol.2010.07.024
69. Hung J-J, Hsieh M-T, Young M-J, Kao C-L, King C-C, Chang W. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* (2004) 78:378–88. doi:10.1128/JVI.78.1.378-388.2004
70. Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, et al. Recurrent potent human neutralizing antibodies to Zika virus in Brazil and Mexico. *Cell* (2017) 169:597–609.e11. doi:10.1016/j.cell.2017.04.024
71. Tritto E, Muzzi A, Pesce I, Monaci E, Nuti S, Galli G, et al. The acquired immune response to the mucosal adjuvant LTK63 imprints the mouse lung with a protective signature. *J Immunol* (2007) 179:5346–57. doi:10.4049/jimmunol.179.8.5346
72. Olafsdottir TA, Hannesdottir SG, Giudice GD, Trannoy E, Jonsdottir I. Effects of LT-K63 and CpG2006 on phenotype and function of murine neonatal lymphoid cells. *Scand J Immunol* (2007) 66:426–34. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01970.x
73. Ji J, Griffiths KL, Milburn PJ, Hirst TR, O'Neill HC. The B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin alters the development and antigen-presenting capacity of dendritic cells. *J Cell Mol Med* (2015) 19:2019–31. doi:10.1111/jcmm.12599
74. Skalickova S, Heger Z, Krejcová L, Pekarik V, Bastl K, Janda J, et al. Perspective of use of antiviral peptides against influenza virus. *Viruses* (2015) 7:5428–42. doi:10.3390/v7102883
75. Panya A, Bangphoomi K, Choowongkamon K, Yenichsomanus P. Peptide inhibitors against dengue virus infection. *Chem Biol Drug Des* (2014) 84:148–57. doi:10.1111/cbdd.12309
76. Schmidt AG, Yang PL, Harrison SC. Peptide inhibitors of dengue-virus entry target a late-stage fusion intermediate. *PLoS Pathog* (2010) 6:e1000851. doi:10.1371/journal.ppat.1000851

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

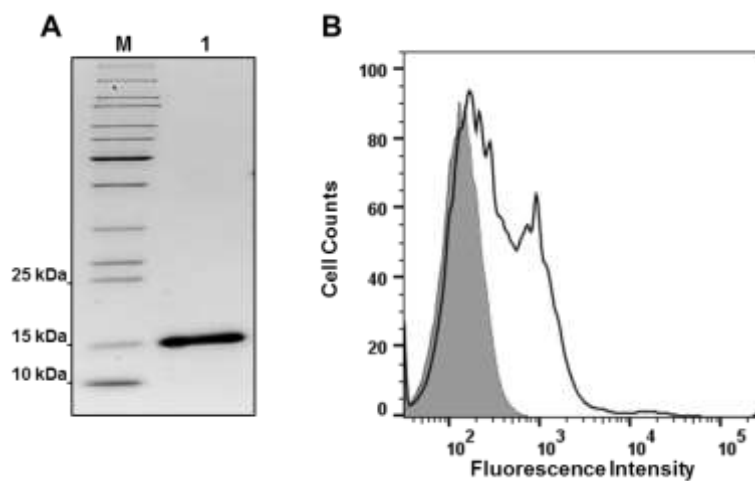
The reviewer, KF, and handling editor declared their shared affiliation.

Copyright © 2017 Maeda, Batista, Pereira, de Jesus Cintra, Amorim, Mathias-Santos, Pereira, Boscardin, Silva, Faquim-Mauro, Silveira, Oliveira, Johnston, Ferreira and Rodrigues. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

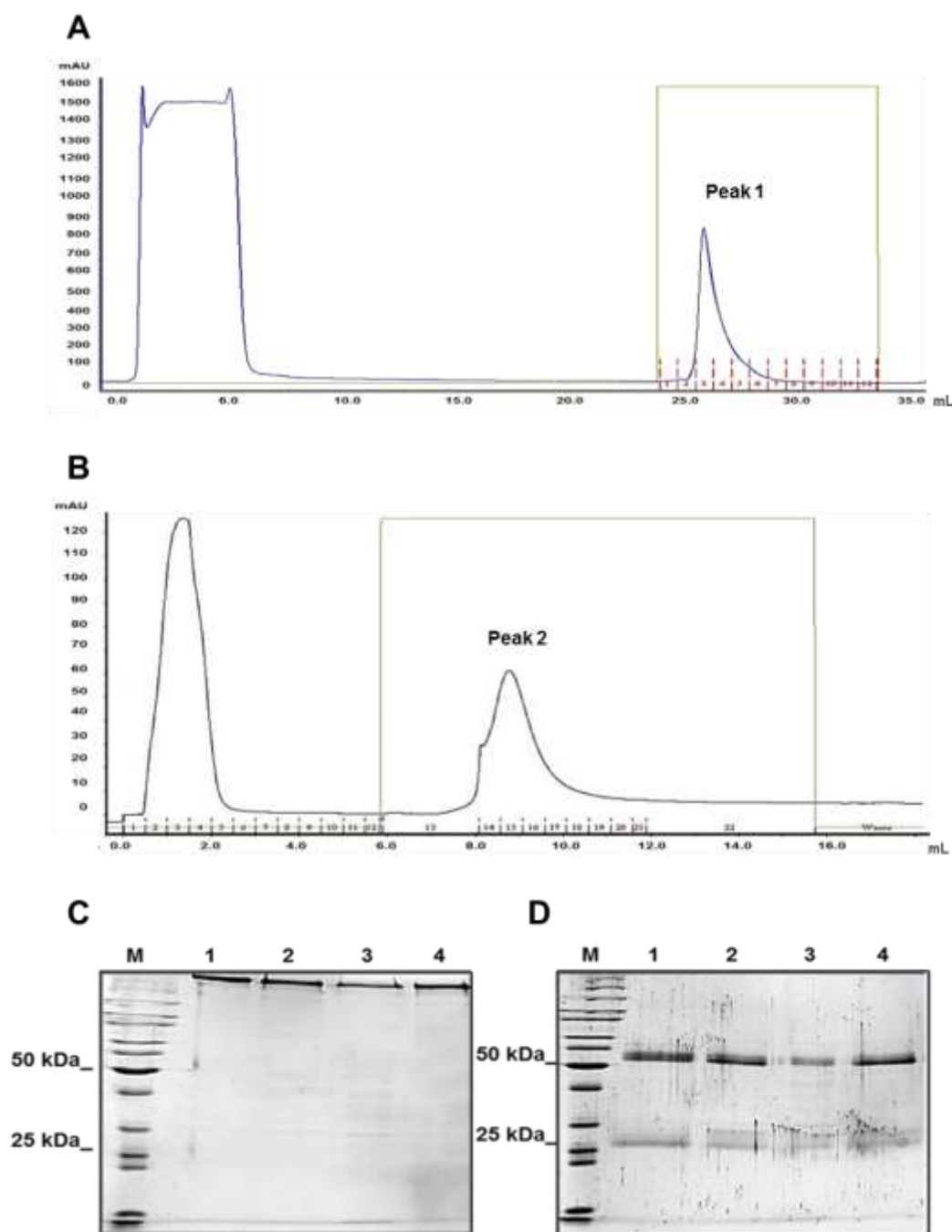
## Supplementary Material



**Figure S1. Purification and biological analysis of LT, LTB and EDIII.** (A) Chromatogram of the LTB protein purified by affinity chromatography to D-galactose. The peak 1 corresponds to eluted LTB. (B) SDS-PAGE of the proteins purified by affinity chromatography to D-galactose and heated (lanes 1 and 3) or not (lanes 2 and 4) to 100 °C prior to loading the gel. M, PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas); lanes 1 and 2, LT (3.0  $\mu$ g); lanes 3 and 4, LTB (3.0  $\mu$ g). (C) GM1 binding assay of recombinant proteins LT and LTB by ELISA. Equimolar amounts of purified LT (●) and LTB (■) were used. Data are representative of two independent experiments. Values are indicated as means  $\pm$  standard deviations. (D) Y1 cell assay incubated with the LT derivatives showing absence (LTB) and presence (LT) of the cytotoxic effect. Negative control represents the cells not treated with LTs.



**Figure S2. Purification and biological analysis of EDIII.** (A) SDS-PAGE of EDIII protein purified by nickel affinity chromatography. Lane 1, EDIII (3.0  $\mu$ g) submitted to the heat treatment. (B) Binding assay of EDIII to the Vero cells measured by flow cytometry. EDIII was marked with mouse anti-EDIII serum and subsequently with anti-mouse IgG antibody conjugated to FITC. Cells incubated with intact (black line histogram) or denatured (filled gray histogram) EDIII.



**Figure S3. Purification of the serum EDIII-specific IgG antibodies.** Purified EDIII-specific IgG antibodies were prepared from sera harvested from mice immunized. **(A)** Chromatogram of antigen-specific antibodies purified by affinity to the EDIII immobilized on nickel-coupled resin. **(B)** Chromatogram of EDIII-specific IgG purified by affinity to the protein G. Peaks 1 and 2 correspond to the anti-EDIII antibodies and the anti-EDIII IgG antibodies, respectively, obtained after the elution step with glycine buffer. **(C and D)** Coomassie blue-stained polyacrylamide gel of EDIII-specific IgG antibodies under non-denaturing **(C)** or denaturing **(D)** conditions. EDIII-specific IgG antibodies were purified from sera of different immunization groups: EDIII alone (lane 1) or EDIII in combination with adjuvant LT (lane 2), LTB (lane 3) or Alum (lane 4). M, PageRuler Unstained Protein Ladder (Invitrogen).

	<b>Anti-EDIII IgG Titer</b>	<b>PRNT<sub>50</sub> Titer*</b>	<b>Virus Neutralization Ratio‡</b>
<b>EDIII</b>	6,548.5 ± 0.087	20	3.05 ± 0.237
<b>EDIII+LT</b>	17,561.7 ± 0.053	160	9.11 ± 0.067 <sup>‡#</sup>
<b>EDIII+LTB</b>	15,468.7 ± 0.049	320	20.69 ± 0.09 <sup>‡</sup>
<b>EDIII+Alum</b>	8,190.2 ± 0.025	20	2.44 ± 0.18

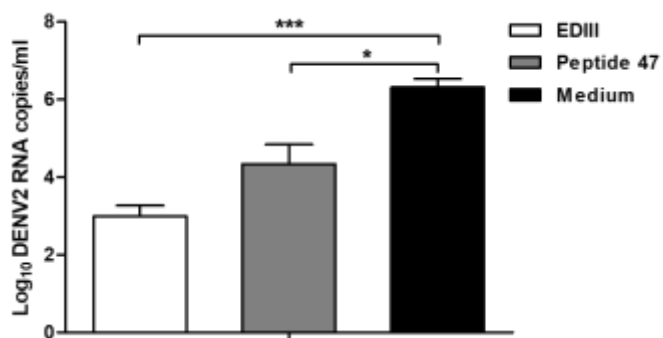
**Table S1. Neutralizing activity of serum EDIII-specific antibodies.**

\*Represents the highest serum dilution that reduces 50% of the plaque forming units in PRNT.

‡Values are expressed as serum anti-EDIII IgG titer/PRNT<sub>50</sub> titer for each immunization group. Results are means ± SD of two independent experiments.

<sup>‡</sup> p < 0.01, significant difference with regard to mice immunized with EDIII alone or mixed to Alum (ANOVA with Tukey's as post hoc test).

<sup>#</sup> p < 0.05, significant difference with regard to mice immunized with EDIII co-administered to LTB (ANOVA with Tukey's as post hoc test).



**Figure S4. Inhibition of DENV2 infection.** Vero cells were exposure to DENV2 (MOI = 1) previously incubated or not with EDIII protein or synthetic peptide 47 (2,940 pMol). The DENV2 genome RNA was measured using RT-PCR at 24 h post-infection.