

LENNON RAMOS PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES VACINAIS CONTRA A
DENGUE BASEADAS NA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1)
ADMINISTRADA PELA VIA INTRADÉRMICA.**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

LENNON RAMOS PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES VACINAIS CONTRA
A DENGUE BASEADAS NA PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1
(NS1) ADMINISTRADA PELA VIA INTRADÉRMICA.**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão original

São Paulo
2016

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

© reprodução parcial

Pereira, Lennon Ramos.

Desenvolvimento de formulações vacinais contra a dengue baseadas na proteína não estrutural 1 (NS1) administrada pela via intradérmica / Lennon Ramos Pereira. -- São Paulo, 2016.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de estratégias vacinais contra o vírus da dengue.

Versão do título para o inglês: Development of vaccines formulations against dengue based on the nonstructural protein 1 (NS1) administered by the intradermal route.

1. Dengue 2. Vacina 3. NS1 4. DEC 5. DCIR2 6. Intradérmico I. Ferreira, Luís Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB081/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lennon Ramos Pereira.

Título da Desenvolvimento de formulações vacinais contra a dengue
baseadas na proteína não estrutural 1 (NS1) administrada
pela via intradérmica .

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

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **19** nas fls. **15** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luis Carlos de Souza Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento de uma formulação vacinal contra a dengue baseada na proteína não estrutural 1 (NS1) administrada pela via intradérmica*" do qual participam o(s) aluno(s) **Lennon Ramos Pereira, Rúbens Prince dos Santos Alves, Jaime Henrique Amorim**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **25.02.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 27 de fevereiro de 2014.

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

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

Dedico este trabalho

À minha família,

Por todo o amparo, amor, carinho e dedicação.

E a Deus,

Que me proporcionou diversas conquistas até aqui,

Amparando-me e fazendo acreditar que era possível,

Mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao prof^o Luís pela orientação, confiança, paciência, exemplo de conduta, dedicação e profissionalismo. Muito obrigado pelos ensinamentos nos campos da ciência e da vida.

À prof^a Dra. Sílvia Beatriz Boscardin por todo apoio, ensinamento, companheirismo e paciência. Boa parte deste trabalho não seria possível sem a sua ajuda. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Jaime Henrique Amorim por todo apoio e conhecimentos transmitidos ao longo desta caminhada. Muito obrigado.

À colaboração da prof^a Dra. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias e seus alunos, por toda a ajuda, disponibilidade e simplicidade.

À colaboração da prof^a Dra. Ana Maria Moura da Silva e sua aluna Luciana, pelo apoio e gentileza em disponibilizar seu laboratório para realizarmos alguns ensaios.

À colaboradora Dra. Francielle T. G. de Sousa Cardozo, pela simplicidade, gentileza e importante colaboração à realização deste trabalho.

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

À Elaine, Kelly, Bianca, Higor, Fernando e Raquel, equipe do Laboratório de Direcionamento de Antígenos para Células Dendríticas, pela ajuda, disponibilidade e amizade.

Aos meus queridos colegas e amigos do LDV, com os quais compartilhei conhecimento, trabalho, alegrias, conquistas e angústias. Galera muito obrigado por tudo. Não chegaria até aqui sem a ajuda de todos vocês!!!

Em especial aos amigos e famosos “cornos do LDV” Deni, Sara (Sarajane), Mônica, Mariana Cintra, Robert, Rúbens, Natiely, Ewerton e Jamile. Espero compartilhar dessa amizade além das fronteiras da USP.

À Hélic e Dalva pela amizade sincera, companheirismo e incentivo. A conclusão deste trabalho sem dúvida tem por base o apoio de vocês nos momentos felizes e também nos mais difíceis. Obrigado por serem minhas irmãs de coração!

Incondicionalmente aos meus pais Aurenice e Givaldo e irmãos Ismenio e Odirley... Vocês são minha base e meu tudo. Nada faria sentido sem vocês! Muito obrigado!

A toda a minha família pelo incentivo, apoio, amizade e amor.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Deus por me permitir chegar até aqui e me amparar em todos os momentos fazendo acreditar que era possível.

“Procure ser uma pessoa de valor,
em vez de procurar ser uma pessoa
de sucesso. O sucesso é
conseqüência.”

Albert Einstein

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 Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

PEREIRA, L. R. Desenvolvimento de formulações vacinais contra a dengue baseadas na proteína não estrutural 1 (NS1) administrada pela via intradérmica. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A dengue é uma doença que nos últimos anos tem alcançado taxas de incidência alarmantes no mundo. Esta enfermidade é causada pela infecção com o vírus da dengue (DENV) para o qual o principal método de controle, combate ao vetor, não é totalmente eficaz. Tal situação indica que a busca por vacinas seguras e eficazes seja uma prioridade mundial. Neste contexto o uso de proteínas não estruturais do vírus representa uma alternativa viável para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue. Assim, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e caracterizar estratégias vacinais contra o vírus da dengue, baseadas na proteína NS1, utilizando a via intradérmica (i.d.) de imunização. A primeira etapa do trabalho consistiu na obtenção dos antígenos NS1 e um fragmento derivado da mesma (Δ CNS1), cuja deleção na porção C-terminal (a.a 271-352) poderia resultar na atenuação de possíveis efeitos adversos em mamíferos, particularmente no ser humano. Diversas tentativas de obter a Δ CNS1 foram realizadas, mas a instabilidade da mesma inviabilizou sua utilização em tentativas de imunização. Por outro lado, foi possível obter uma proteína quimérica envolvendo a fusão genética da proteína NS1 de DENV2 com anticorpos monoclonais específicos para receptores de células dendríticas (DEC205 e DCIR2). A proteína NS1 recombinante, assim como as proteínas quiméricas, foram administradas pelas vias i.d. e i.p em camundongos Balb/c e as respostas imunológicas (anticorpos) específicas foram analisadas em relação a diferentes parâmetros. A imunização com as proteínas quiméricas resultou em modulação do perfil de subclasses de IgG sérico e aumento da afinidade dos anticorpos NS1-específicos frente ao antígeno alvo. Além disso, demonstramos a ausência de efeitos adversos associados às formulações vacinais, característica essencial em vacinas baseadas na NS1 de DENV. Desta forma, o conjunto de dados obtidos neste trabalho destaca, de forma inédita, a combinação da estratégia de direcionamento do antígeno para células dendríticas com o uso da via i.d., nunca antes testada para antígenos desta natureza. Os resultados lançam perspectivas promissoras para o desenvolvimento de vacinas de subunidade contra o vírus da dengue.

Palavras-chave: Dengue. Vacina. NS1. DEC. DCIR2. Intradérmico.

ABSTRACT

PEREIRA, L. R. Development of vaccines formulations against dengue based on the nonstructural protein 1 (NS1) administered by the intradermal route. [Masters thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Dengue is a disease that in recent years has reached alarming incidence rates in the world. This disease is caused by infection with the dengue virus (DENV) to which the main control method based on the vector control is not fully effective. This situation indicates that the search for safe and effective vaccines is a global priority. In this context the use of virus non-structural proteins is a viable alternative to the development of dengue vaccines. Thus, this study aimed to develop and characterize vaccine strategies against dengue virus based on the NS1 protein using the intradermal (i.d.) immunization route. The first step in this work consisted in obtaining the NS1 antigen and a fragment derived from it (Δ CNS1), in which a of the C-terminal part (aa 271-352) might result in the attenuation of possible side effects in mammals, particularly humans. Several attempts to obtain Δ CNS1 were performed, but the instability of the recombinant protein precluded its use in immunization experiments. Moreover, it was possible to obtain a chimeric protein based on the genetic fusion of the DENV2 NS1 protein with monoclonal antibodies specific for dendritic cell receptors (DCIR2 and DEC205). The recombinant NS1 protein, as well as the chimeric proteins, were administered by the routes i.d. and i.p. routes to Balb / c mice and various parameters of the specific immune responses (antibodies) were analyzed. Immunization with the chimeric proteins resulted in modulation of serum IgG subclass response and increased affinity of the NS1-specific antibodies to the target antigen. Furthermore, we demonstrated the absence of adverse effects associated with administration of the vaccine formulations, an essential characteristic of vaccines based on DENV NS1. Thus, the data set obtained in this study highlights, in an unprecedented manner, the combination of a dendritic cell antigen targeting approach and the i.d. administration route, a strategy not used before. The results raise promising perspectives with regard to the development of subunit vaccines against dengue virus.

Keywords: Dengue. Vaccine. NS1. DEC. DDR2. Intradermal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Participação da proteína NS1 na imunopatogênese de dengue..	27
Figura 2 - Teste de expressão das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 na linhagem <i>E. coli</i> BL21-(DE3)-RIL.....	48
Figura 3 - Purificação das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 por cromatografia de afinidade.....	49
Figura 4 - Teste de expressão da proteína Δ CNS1-JHA1 após indução na temperatura de 18 °C.....	51
Figura 5 - Teste de renaturação da proteína Δ CNS1-JHA1 em diferentes tampões.....	52
Figura 6 - Teste de renaturação da proteína Δ CNS1-JHA1 em gradiente decrescente de uréia.....	53
Figura 7 - Purificação da proteína Δ CNS1-JHA1 feita em condições desnaturantes....	54
Figura 8 - Tentativa de obtenção da proteína Δ CNS1-JHA1 de forma solúvel pelas técnicas de filtração tangencial e eletroeluição..	55
Figura 9 - Renaturação in vitro da proteína Δ CNS1-JHA1 na presença de diferentes concentrações de L-arginina, D-glicose e β -ciclodextrina.	57
Figura 10 - Purificação das proteínas Δ CNS1-JHA1 e NS1-JHA1 após renaturação utilizando técnica de alta pressão hidrostática.....	60
Figura 11 - Perfil de hidrofobicidade da proteína NS1-JHA1.....	61
Figura 12 - Clonagem e expressão das proteínas NS1 e Δ CNS1 cepa JHA1 fusionadas geneticamente ao anticorpo monoclonal anti-DEC205.....	63
Figura 13 - Caracterização dos antígenos utilizados nos ensaios de imunização.....	66
Figura 14 - Regimes vacinais empregados.....	67
Figura 15 - Determinação da resposta de IgG NS1-específica.....	68
Figura 16 - Avaliação da capacidade dos anticorpos NS1-específicos se ligarem preferencialmente a epítomos conformacionais.	70
Figura 17 - Determinação da afinidade dos anticorpos NS1-específicos induzidos pelas diferentes estratégias de imunização.....	72

Figura 18 - Análise do perfil de subclasses de anticorpos IgG NS1-específicos induzidos em animais submetidos aos diferentes agentes imunizantes.	73
Figura 19 - Avaliação da longevidade da resposta humoral sistêmica NS1-específica e indução de memória imunológica.....	75
Figura 20 - Capacidade de ligação dos anticorpos NS1-específicos a plaquetas humanas.....	76
Figura 21 - Avaliação da agregação plaquetária <i>in vitro</i> na presença de soros NS1-específicos.	78
Figura 22 - Avaliação da permeabilidade vascular <i>in vitro</i> na presença de soros NS1-específicos.	80
Figura 23 - Monitoramento da ocorrência de possíveis efeitos hepáticos induzidos pelas formulações vacinais.	81
Figura 24 - Influência das formulações vacinais sobre o número de plaquetas circulantes nos animais imunizados.....	83
Figura 25 - Avaliação do tempo de sangramento e protombina dos animais imunizados pela via i.d.	83
Figura 26 - Proteção à morbidade associada ao desafio com o vírus DENV2 (cepa NGC) em camundongos submetidos à imunização com as diferentes formulações testadas	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tampões utilizados nos testes de renaturação por diluição pulsada.	36
Tabela 2 - Tampões utilizados nos testes de renaturação das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 por alta pressão hidrostática.	38
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificação das sequências Δ CNS1-JHA1 e NS1-JHA1.	39
Tabela 4 - Análise hematológica dos animais imunizados com diferentes formulações vacinais.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (Citotoxicidade celular mediada por anticorpo)
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i> (adenosina difosfato)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de Variância simples)
ADE	<i>Antibody-Dependent Enhancement</i> (Aumento mediado de anticorpo)
a.a	Aminoácidos
CD's	Células Dendríticas
CD4 ⁺	<i>Cluster of differentiation 4⁺</i> (grupo de diferenciação)
CD8 ⁺	<i>Cluster of differentiation 8⁺</i> (grupo de diferenciação)
Cys	Aminoácido cisteína
DENV	<i>Dengue vírus</i> (vírus da dengue)
DHF	<i>Dengue haemorrhagic fever</i> (febre da dengue hemorrágica)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DSS	<i>Dengue shock syndrome</i> (síndrome do choque da dengue)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DO _{600nm}	Densidade óptica obtida em comprimento de 600nm
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
EIII	Domínio III da glicoproteína E do envelope do vírus da dengue
IL	Interleucina
i.d	Intradérmico
i.p	Intraperitoneal
INF γ	<i>Interferon gamma</i> (interferon gama)
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G

IgG2	Subclasse tipo 2 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2a de imunoglobulina G
IgG2c	Subclasse tipo 2c de imunoglobulina G
IgG3	Subclasse tipo 3 de imunoglobulina G
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside</i> (isopropil β-D-1 tiogalactopiranosideo)
LB	Meio Luria-Bertani
MHC II	<i>Major histocompatibility complex class II</i> (complexo maior de histocompatibilidade tipo II)
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i> (Proteína 5 associada-Diferenciação Melanoma)
NK	<i>Cells natural killers</i> (células matadoras profissionais)
NS1	<i>Non structural protein 1</i> (proteína não-estrutural 1)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação de cadeia e polimerase)
PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SFB	Soro fetal bovino
Th1	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 1)
Th2	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 2)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (receptor do tipo toll)
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i> (receptor do tipo toll 3)
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i> (receptor do tipo toll 4)
TEER	<i>Trans-endothelial Electrical Resistance</i> (Resistência Elétrica Trans-endotelial)
TS	Tempo de sangramento

TP	Tempo de protombina
T.A	Temperatura ambiente
Tyr	Aminoácido tirosina
Trp	Aminoácido triptofano
UFP	Unidade formadora de placa
VVA	Vacinas vivas atenuadas

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
D.O	Densidade ótica
g	Força centrífuga relativa (RCF) ou força gravitacional
kDa	Kilodalton
h	Hora(s)
L	Litro
M	Molar
m/z	Massa/carga
mM	Milimolar
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama/mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
nM	Nanomolar
pH	Potencial de hidrogênio
pb	Pares de bases
psi	<i>Pound force per square inch</i> (libra força por polegada quadrada)
rpm	Rotação por minuto
μL	Microlitro
μg/μL	Micrograma/microlitro
μm	Micrometro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	A Dengue.....	23
1.2	Desenvolvimento de vacinas contra o vírus da dengue.	24
1.3	A NS1: patogênese x antígeno vacinal.	26
1.4	Direcionamento de antígenos para células dendríticas	29
1.5	Via intradérmica de imunização.	30
2	OBJETIVO	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Expressão e purificação da proteína recombinante NS1-JHA1	33
3.2	Expressão e purificação da proteína recombinante Δ CNS1-JHA1	34
3.3	Ensaio de Western blot	35
3.4	Otimização da renaturação <i>in vitro</i> da proteína Δ CNS1-JHA1 utilizando diferentes tampões.	36
3.5	Renaturação gradativa em coluna HisTrap HP.	36
3.6	Filtração tangencial e eletroeluição.	37
3.7	Avaliação da influência de diferentes aditivos anti-agregantes sobre a renaturação <i>in vitro</i> da proteína Δ CNS1-JHA1.	37
3.8	Renaturação protéica utilizando alta pressão hidrostática.	38
3.9	Análise computacional do perfil de hidrofobicidade da proteína NS1-JHA1. .	39
3.10	Clonagem das proteínas Δ CNS1 e NS1 (cepa JHA1 DENV2) fusionadas a anticorpo monoclonal anti-DEC205.	39
3.11	Expressão e purificação dos anticorpos α DEC e α DCIR2 controles e quiméricos.	40
3.12	Ensaio funcionalidade dos anticorpos.	41
3.13	Ensaio de Imunização.....	41

3.14	Ensaio de ELISA.	42
3.15	Análise da afinidade dos anticorpos NS1 específicos.	43
3.16	Avaliação da ligação dos soros vacinais à plaquetas humanas.	43
3.17	Ensaio de Inibição da agregação plaquetária.	44
3.18	Ensaio de alteração da permeabilidade vascular <i>in vitro</i>	44
3.19	Análises hematológicas.	45
3.20	Avaliação de danos hepáticos.	45
3.21	Ensaio de desafio.	45
3.22	Análises Estatísticas	46
4	RESULTADOS	47
4.1	BLOCO 1- Obtenção das proteínas recombinantes NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1.	47
4.1.1	Expressão e purificação da proteína recombinante NS1-JHA1.	47
4.1.2	Expressão da proteína Δ CNS1-JHA1 na linhagem E. coli BL21 (DE3) RIL.	50
4.1.3	Otimização da expressão da proteína Δ CNS1-JHA1.....	50
4.1.4	Otimização da renaturação <i>in vitro</i> da proteína Δ CNS1-JHA1.....	52
4.1.5	Efeito da adição de agentes químicos diversos na solubilização da proteína Δ CNS1-JHA1.	55
4.1.6	Utilização da técnica de renaturação de proteínas por pressão hidrostática.	58
4.1.7	Análise computacional do perfil de hidrofobicidade da proteína NS1-JHA1.	61
4.1.8	Clonagem e expressão das proteínas NS1 e Δ CNS1 (cepa JHA1) fusionadas geneticamente ao anticorpo anti-DEC205.	61
4.2	BLOCO 2 - Direcionamento da proteína NS1 DENV2 para células dendríticas após administração pela via i.d.	63

4.2.1	Expressão, purificação e análise dos anticorpos quiméricos e da proteína NS1 DENV2 NGC.....	64
4.2.2	Ensaio de imunização e análise quantitativa da resposta humoral NS1-específica desencadeada.....	66
4.2.3	Determinação do perfil de reconhecimento de epítomos conformacionais e lineares pelos anticorpos gerados.....	68
4.2.4	Determinação da afinidade dos anticorpos gerados frente ao antígeno NS1.....	71
4.2.5	Análise do perfil de subclasses de IgG no soro de animais imunizados...	72
4.2.6	Avaliação da longevidade da resposta humoral desenvolvida e memória imunológica.....	73
4.2.7	Ligação dos anticorpos NS1-específicos a plaquetas humanas e influência sobre a agregação plaquetária.....	75
4.2.8	Análise da influência dos soros NS1-específicos sobre a permeabilidade vascular in vitro.....	79
4.2.9	Avaliação da função hepática dos animais imunizados.....	80
4.2.10	Análise hematológica dos grupos vacinais.....	82
4.2.11	Determinação da capacidade protetora das formulações vacinais.....	84
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICES – Artigos de Periódicos	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Dengue

A dengue é uma doença que atinge mais de 100 países em todo mundo e nos últimos anos tem alcançado taxas de incidência alarmantes (1). Esta enfermidade é a principal arbovirose circulante em humanos, sendo causada pela infecção com o vírus da dengue (DENV), um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que se apresenta sob a forma de quatro sorotipos com capacidade de infectar humanos: DENV-1, 2, 3 e 4 (2). Estima-se que cerca de 390 milhões de infecções com o DENV ocorram por ano em nível global. A disseminação da doença entre continentes tem crescido consideravelmente e, sobretudo, a Ásia e as Américas foram caracterizadas como regiões de risco, com incidência na faixa de 13 a 67 milhões de infecções em 2010 (3). O surgimento global acelerado desta doença está relacionado com as alterações demográficas, sociais e climáticas evidenciadas nos últimos anos, incluindo o crescimento populacional, a maior circulação de pessoas entre cidades e países, a urbanização descontrolada, e a precária infra-estrutura dos programas públicos de saúde e controle de vetores (4). Assim, tomando em conta os impactos econômicos e de saúde que a dengue causa, a busca por novos métodos efetivos de controle do vírus, como o desenvolvimento de uma vacina, torna-se imprescindível.

A transmissão do DENV ao homem se faz pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente a espécie *Aedes aegypti*, durante o processo de hematofagia (5). Depois da picada do mosquito, o DENV infecta inicialmente células dendríticas, macrófagos e linfócitos (1), na qual o vírus pode ficar em um período de incubação de 3-14 dias (média de 4 a 7 dias), após o qual o indivíduo infectado pode apresentar um estado febril agudo, correlacionado com quadro de viremia. É principalmente neste período de viremia que os mosquitos, ao picarem uma pessoa infectada, podem adquirir o DENV, estando apto em cerca de 8-12 dias (período de incubação extrínseca) a transmitir o vírus a hospedeiros suscetíveis (6). O reconhecimento e a entrada da partícula viral na célula são mediados por interações com a proteína do envelope viral (proteína E), no qual o vírus entra na célula por processo de endocitose mediada por receptor (7). Após entrada, o endossomo sofre um processo de acidificação, fenômeno que propicia mudanças conformacionais na proteína E, com consequente fusão do envelope viral à membrana endossomal, liberando o capsídeo para o citoplasma celular.

Neste último compartimento, há dissociação do capsídeo e liberação do RNA viral, evento que torna o RNA disponível para replicação e tradução das proteínas virais. Com as proteínas sintetizadas e o material genético replicado, procede-se a morfogênese viral, com posterior liberação de partículas maduras infectantes (8).

O DENV consiste de um vírus envelopado, cujo material genético é constituído de uma fita simples de RNA com orientação positiva, de aproximadamente 10,1 kb. O genoma viral codifica para uma poliproteína, a qual após proteólise origina três proteínas estruturais (E, C e prM) que compõem a partícula viral, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), que estão envolvidas com a replicação viral no interior da célula e a interação com o sistema imunológico do hospedeiro (1). A infecção apresenta, em geral, curso de caráter agudo e autolimitado, sendo a forma mais banda da doença classificada como Dengue. Entretanto, em alguns indivíduos, por mecanismos ainda não totalmente conhecidos, há manifestação de formas mais graves da doença, sendo classificadas como Dengue com Sinais de Alarme ou Dengue Grave (4,9). A ocorrência destas duas formas graves correlaciona-se, dentre outros fatores, com elevada viremia e, especialmente, com infecções secundárias pelo vírus da dengue em indivíduos que possuem imunidade prévia contra sorotipos heterólogos. Sob este aspecto, a teoria da ADE, do inglês *antibody dependent enhancement*, proposta por Halstead em 1970, defende que a segunda infecção por um vírus de sorotipo diferente seria exacerbada pela ligação de anticorpos não neutralizantes, gerados durante a primeira infecção, às partículas virais do segundo sorotipo viral. Desta forma, haveria a facilitação da entrada de partículas virais em células alvo que expressam receptores do tipo Fc γ e, conseqüentemente, aumento da carga viral. Esta última ocorrência em geral resulta em danos teciduais e alteração do perfil inflamatório do indivíduo, sobretudo, pela estimulação exacerbada de células do sistema imune, que liberam grande quantidade de citocinas, fato que pode levar a diversas conseqüências danosas para o indivíduo, sendo este fenômeno uma das principais dificuldades ao desenvolvimento de vacinas contra a dengue (11,12).

1.2 Desenvolvimento de vacinas contra o vírus da dengue.

Diante de toda esta problemática, e levando em consideração que o método atual de combate ao vírus consiste no controle dos mosquitos vetores, que por sua vez não é totalmente eficaz, a Organização Mundial de Saúde (OMS) designou que o

desenvolvimento de uma vacina contra a dengue, com caráter tetravalente, é uma prioridade para uma abordagem mais custo-efetiva na prevenção da doença (6). Com este suporte da OMS, nos últimos anos as pesquisas de formulações vacinais contra o DENV têm avançado consideravelmente. As principais abordagens vacinais em desenvolvimento incluem a utilização de vírus vivos atenuados ou inativados, vacinas quiméricas recombinantes, vacinas de vetores virais ou DNA, além de vacinas baseadas em proteínas recombinantes (1). Dentre estas estratégias as vacinas baseadas em vírus atenuados e quiméricos recombinantes compõem os primeiros esforços no estudo de vacinas contra o DENV, os quais se encontram em estágios mais avançados de desenvolvimento.

As vacinas vivas atenuadas (VVA) tem como vantagem o mimetismo à infecção natural, em geral sendo capaz de induzir respostas humorais e celulares de longa duração. Embora o risco de reversão da atenuação seja alto, vacinas utilizando esta plataforma tiveram sucesso como, a da febre amarela (YFV) e da encefalite Japonesa (JEV), sendo que a candidata para dengue com maior avanço foi desenvolvida pela Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) and GlaxoSmithKline (GSK), com caráter tetravalente, tendo em sua composição isolados de DENV atenuados por passagem seriada em cultura de células. Ensaio clínico de fase I e II revelaram a boa imunogenicidade da vacina, entretanto, foram encontrados problemas de atenuação com alguns vírus vacinais (especialmente DENV1 e 4) (1,13). Com a evolução da biologia molecular conquistas foram realizadas, sobretudo no aperfeiçoamento dos métodos de atenuação e manipulação genética viral.

Neste sentido outro candidato que demonstrou expressivo avanço nos últimos anos foi desenvolvido pelo National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) e se encontra em teste clínico no Brasil junto ao Instituto Butantã. A atenuação dos vírus vacinais, obtida por genética reversa, foi resultante de deleções realizadas nas regiões não traduzidas (UTR's) de cepas de DENV. Ensaio clínico de fase I e II foram realizados, sendo demonstrado segurança e imunogenicidade extremamente promissoras, tendo recentemente evidenciado capacidade protetora em modelo de desafio humano (1,14–16). Além desta, outras estratégias de vírus recombinantes quiméricos estão em fase clínica de testes, como a DENVax desenvolvida pelo Center for Disease Control (CDC) (17,18).

A estratégia vacinal contra a dengue mais avançada até o momento foi desenvolvida pela Acambis, licenciada pela Sanofi Pasteur e denominada CYD-TDV (do inglês Chimeric Yellow Fever Virus–DENV Tetravalent Dengue Vaccine), e utiliza tecnologia de vírus atenuado quimérico, sendo recentemente registrada para uso no México e no Brasil. A CYD-TDV foi gerada tendo como base o vírus vacinal da febre amarela (YFV 17D), o qual teve os genes das proteínas estruturais, prM e E, substituídos pelos do DENV, gerando uma vacina tetravalente contendo quatro vírus quiméricos (um representativo de cada sorotipo). Embora esta vacina seja a única que tenha concluído ensaios clínicos de fase 3, a comunidade científica tem demonstrado preocupação com esta estratégia pois, apesar da segurança, tolerabilidade e imunogenicidade terem sido comprovadas junto a ensaios clínicos de fase I e II (19,20), foram observados nos ensaios de fase IIb e III proteção parcial não equilibrada entre os sorotipos de DENV, com a menor proteção contra o sorotipo 2 (21,22). Esses achados levantaram também questionamentos sobre a real fidelidade do correlato de proteção atual existente (anticorpos neutralizantes), uma vez que a robusta e tetravalente proteção observada em ensaios *in vitro* (PRNT) não tem se correlacionado com eficácia descrita nos ensaios clínicos (23). Além disso, o envolvimento de imunidade celular na proteção contra DENV, sobretudo contra proteínas não-estruturais, vem sendo estudadas e mostram-se importantes (24).

Associado a essa última observação, estratégias vacinais de subunidade tendo por base proteínas não estruturais do DENV representam uma alternativa atrativa, as quais não estão relacionadas ao fenômeno da ADE, sendo, portanto, seguras e promissoras.

1.3 A NS1: patogênese x antígeno vacinal.

A NS1 é uma glicoproteína de 46-55 kDa que, apesar de não ter função totalmente estabelecida, é possivelmente requerida na replicação viral, na síntese do RNA de orientação negativa e na evasão do vírus ao sistema imunológico do hospedeiro. Esta quando é produzida nas células infectadas pode se apresentar associada à membrana citoplasmática, ou ainda, de forma diferente das outras proteínas não estruturais do DENV, pode ser secretada para o meio extracelular, sendo altamente imunogênica e capaz de estimular a indução de resposta imunológica humoral e celular (25,26).

De acordo a alguns estudos, existe conhecimento da ocorrência de mimetismo molecular entre a proteína NS1 do DENV e proteínas humanas. Em consequência desta

similaridade, tem-se relatado a ocorrência de reatividade cruzada de anticorpos anti-NS1 com proteínas presentes na superfície de células do hospedeiro, sendo já descrita a ligação cruzada destes anticorpos às células endoteliais, plaquetas e alguns fatores da coagulação (27–32). Embora esses efeitos relatados não estejam bem esclarecidos, a ligação de anticorpos anti-NS1 cruzada com plaquetas podem resultar na depleção das mesmas ou inibir a sua agregação (Figura 1A), assim como ao se ligarem às células endoteliais (CE) poderão ocasionar danos às mesmas via ativação do sistema complemento, citotoxicidade celular mediada por anticorpo (ADCC) (Figura 1B) ou sua ativação direta com conseqüente indução de apoptose. Além disso, a proteína NS1 pode contribuir para um aumento da carga viral por perturbar o sistema complemento (inibindo a virólise mediada por complemento) (Figura 1C) ou ainda, ao interagir diretamente com as CE via TLR4, pode ativar as mesmas e contribuir para o aumento da permeabilidade vascular. (2,27,28,33–36).

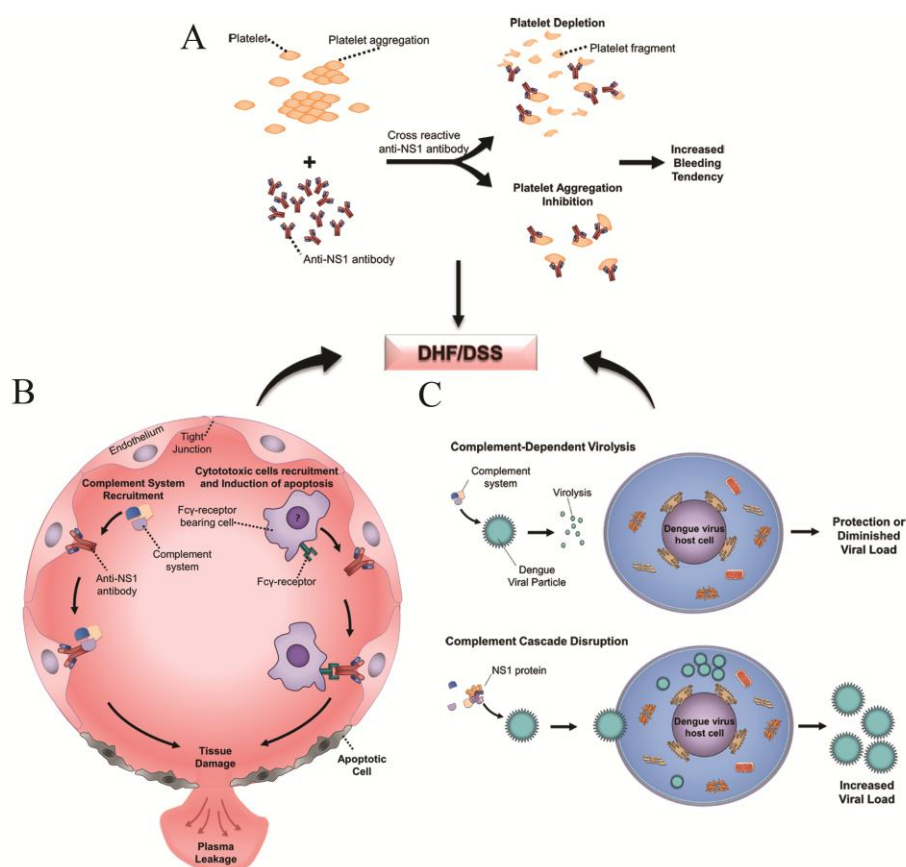


Figura 1 - Participação da proteína NS1 na imunopatogênese da dengue. Os anticorpos anti-NS1 podem se ligar às plaquetas induzindo sua depleção ou inibir a sua agregação (A) ou ainda ligarem às células endoteliais e induzir danos às mesmas por ativação do sistema complemento ou ADCC (B). Além disso, a NS1 contribui para um aumento da carga viral por perturbar o sistema do complemento, o que

conduz à proteção das partículas de DENV por inibição da virólise mediada por complemento (C). Juntos, estes mecanismos são acreditados para contribuir significativamente para o desenvolvimento de formas graves da dengue (DHF/DSS). Adaptado de Amorim et al., (2014).

Apesar destes achados a proteína NS1 mostra-se como um antígeno vacinal importante, a qual apresenta epítomos conservados entre os quatro sorotipos do vírus (37), fato que pode contribuir para uma imunidade cruzada importante para uma vacina tetravalente contra o DENV. Ao longo dos últimos 27 anos, diferentes abordagens vacinais baseadas na NS1, em associação com diferentes vias e adjuvantes, foram descritas (38–40), sendo que a imunização de camundongos com a NS1, na forma de proteína recombinante ou codificada por vacinas de DNA, tem demonstrado resultados promissores, na qual se observa níveis de proteção de até 100% (41–43). Resultados animadores também foram encontrados pelo nosso grupo de pesquisa (41), no qual ao testarmos uma formulação baseada na NS1 recombinante, em associação com adjuvantes, observamos uma taxa de proteção de 50% em modelo de desafio utilizando vírus DENV2. Em outro trabalho realizado também em associação com nosso grupo de pesquisa (44), ao produzir a proteína NS1 fusionada a dois anticorpos monoclonais direcionados para receptores de células dendríticas, foi possível observar a indução de respostas imunológicas celular e humoral capazes de conferir proteção aos animais imunizados frente ao desafio letal com DENV2 cepa NGC (New Guinea C).

Além disso, apesar dos efeitos deletérios da NS1 comentados anteriormente, em estudo realizado ao se testar uma forma recombinante e editada da proteína NS1, denominada Δ C-NS1 (que apresenta uma deleção aa 271-352 em sua região C-terminal), foi observado que a formação de anticorpos capazes de reagir cruzadamente com plaquetas *in vitro* foi abolida (45). Também já foi observado que a imunização passiva de camundongos com anticorpos direcionados para a Δ C-NS1 reduziu os efeitos deletérios observados em modelo de camundongo, como o tempo de sangramento e eventos hemorrágicos (46). Diante disso, a NS1 em sua forma editada, reduz seus possíveis efeitos danosos sobre o hospedeiro, sendo um antígeno atrativo ao se pensar em desenvolvimento de vacinas contra a dengue. Entretanto, o efeito protetor da Δ C-NS1 frente ao desafio com o vírus da dengue ainda não foi caracterizado, sendo, portanto, uma lacuna a ser preenchida de extrema relevância para o campo de vacinas contra o DENV e também para o entendimento do real papel da proteína NS1 na imunopatogênese da doença.

1.4 Direcionamento de antígenos para células dendríticas

Uma estratégia que tem demonstrado impacto no aumento da imunogenicidade de proteínas consiste no direcionamento destas para populações de células dendríticas (DC's). As DC's são células especializadas em apresentação de antígenos cujas principais funções incluem a iniciação e a regulação da resposta imunológica. Como possuem capacidade migratória, estas células permitem uma interação entre a imunidade inata e adaptativa, captando antígenos em diversos tecidos e apresentando-os de forma eficiente, após processamento, aos linfócitos T em órgãos linfóides, podendo gerar a indução de respostas imunes antígeno específicas (47,48).

Uma característica importante das DC's consiste na presença de receptores endocíticos em sua superfície, os quais permitem a captação por endocitose de seus ligantes e consequente processamento dos mesmos por estas células. Aproveitando-se desta propriedade um método eficiente desenvolvido para direcionar antígenos proteicos para as DC's consiste na fusão genética dos mesmos a anticorpos monoclonais (mAb), sendo estes capazes de se ligarem especificamente a receptores endocíticos. Assim, o antígeno associado ao mAb é direcionado para populações específicas de DC's quando administrados *in vivo*, sendo que a captação e processamento do complexo antígeno-anticorpo leva, em condições adequadas de inflamação, à apresentação antigênica e geração de resposta imune celular e humoral direcionada ao antígeno alvo (44,49). Os receptores endocíticos DEC205/CD205 e DCIR2 são alguns dos principais alvos desta estratégia, ambos pertencentes à família de lectinas do Tipo C (I e II, respectivamente).

Os mAbs α DEC205 e α DCIR2 (também conhecido como 33D1) tem como alvos principais as subpopulações de DC's $CD8^+DEC205^+$ e $CD8^-DCIR2^+$, respectivamente. Estudos comparativos mostraram diferenças na indução de resposta antígeno-específica tendo por base estes dois mAbs, na presença de Poly (I:C), sendo observado que o direcionamento para DCIR2 mostrou-se mais eficiente na apresentação de antígenos para linfócitos T $CD4^+$, cuja população $CD8^-DCIR2^+$ é mais eficiente na apresentação de antígeno via MHC-II, enquanto que o direcionamento para DEC205 foi superior na indução de resposta mediada por linfócitos T $CD8^+$, uma vez que a população $CD8^+DEC205^+$ apresenta conhecida capacidade de realizar apresentação cruzada de antígenos (47,50).

Apesar destes achados, a utilização destes anticorpos, contendo antígenos fusionados, mostrou-se capaz de estimular e aumentar a geração de resposta de células tanto TCD4⁺ quanto TCD8⁺ antígeno-específicas, bem como estimular potente resposta humoral quando na presença de moléculas estimuladoras para ativação e maturação de células dendríticas, principalmente o Poly (I:C) e α CD40 (44,51–55). Em virtude dos resultados promissores obtidos até o momento, essas estratégias tornaram-se atrativas e promissoras ao campo de vacinologia, tendo inclusive evoluído para testes clínicos.

Além do exposto, um aspecto importante quando se utiliza a estratégia de direcionamento antigênico aqui descrita é a necessidade de utilizar moléculas com capacidade ativadora sobre DC's, como agonistas de receptores do tipo toll (TLRs), caso contrário, ocorre à indução de tolerância ao antígeno utilizado. Sob este aspecto, o adjuvante Poly (I:C), constituído de sequências sintéticas de dsRNA e, portanto, agonista de TLR3 e MDA5, demonstrou ser efetivo para o direcionamento de antígenos para DC's via mAbs α DEC205 e α DCIR2, sendo aceito para uso em humanos (44,48,56). Ao interagir com o TLR3 ou MDA5 o Poly (I:C) pode induzir a produção de interferons tipo I que, além de diversas propriedades antivirais, podem também contribuir para maturação de células dendríticas e na polarização da resposta imunológica para um perfil Th1 (Longhi et al., 2009). Assim, as características descritas tornam Poly (I:C) um promissor adjuvante para combinação da estratégia de direcionamento de antígeno para DC's em associação com uma via de imunização rica em células dendríticas, como a intradérmica.

1.5 Via intradérmica de imunização.

Além da escolha de um antígeno promissor, no desenvolvimento de vacinas, especialmente quando se utiliza estratégias baseadas em proteínas purificadas, a indução de respostas imunológicas eficazes depende também da escolha de vias de administrações adequadas. Atrelado a isso, estudos têm mostrado que a imunogenicidade de proteínas pode ser melhorada quando estas são processadas e apresentadas por células dendríticas, sendo consenso que imunizações utilizando a via intradérmica (i.d) podem ser eficientes devido à elevada proporção de células dendríticas nas camadas dérmicas da pele, induzindo respostas imunológicas específicas, com elevada produção de IFN- γ (57).

Trabalhos têm destacado o potencial de utilização da via i.d. para estratégias vacinais contra dengue, sendo observado que ao realizar imunizações com partículas do DENV-2, utilizando a via i.d, observou-se um aumento do número de células dendríticas (células de Langerhans) no sítio de inoculação, bem como maiores títulos de anticorpos neutralizantes, que persistiram por mais tempo, em comparação com imunizações pela via intramuscular (58). Além disso, um estudo de fase clínica, utilizando uma estratégia vacinal tetravalente (DENVax) contra o DENV baseada em vírus atenuado recombinante, demonstrou que a utilização da via i.d é segura, sendo passível de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (17,18,59). Desta forma, estudos com abordagens vacinais contra o DENV, pela via i.d., demonstram-se atuais e prósperos.

Apesar destes achados, ainda não existem na literatura estudos de formulações vacinais contra o vírus da dengue, baseadas na proteína NS1, utilizando direcionamento deste antígeno para DC's em associação com a via de inoculação i.d. Deste modo, a realização do presente projeto teve por expectativa contribuir para geração de dados que auxiliem no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o vírus da dengue, na qual combinando a proteína NS1 com adjuvante, e administrando esta formulação pela via i.d., espera-se obter respostas imunológicas celulares e humorais efetivas contra o DENV.

2 OBJETIVO

O presente projeto teve por principal objetivo desenvolver formulações vacinais de subunidade contra a dengue, baseada na proteína não estrutural 1 (NS1) ou sua forma editada (Δ CNS1), a ser administrada pela via i.d. Sendo assim, as principais etapas traçadas para atingir este objetivo foram:

1. Expressar as proteínas recombinantes NS1 e Δ CNS1 DENV 2 utilizando sistema de expressão baseado em *Escherichia coli* seguido por purificação das proteínas por técnica de cromatografia de afinidade, obtendo-as na forma solúvel e com imunogenicidade preservada;

2. Expressar as proteínas recombinantes NS1 e Δ CNS1 DENV 2 em fusão com os anticorpos DEC205 e DCIR2 seguido de purificação, obtendo-as na forma solúvel e com imunogenicidade preservada;

3. Caracterizar as respostas imunológicas humorais induzidas após imunização, pela via i.d. e i.p., de camundongos BALB/C, utilizando a proteína fusionada ou não os anticorpos DEC205 e DECIR2, combinadas com o adjuvante Poly (I:C);

4. Avaliar a capacidade protetora das formulações vacinais em ensaios de desafio intracraniano com cepa de vírus DENV2;

5. Verificar possíveis respostas autoimunes induzidas pelas formulações vacinais em estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão e purificação da proteína recombinante NS1-JHA1

A linhagem de *Escherichia coli* BL21-(DE3)-RIL transformada com o plasmídeo pNS1-JHA1 utilizada nos experimentos já estava disponível em nosso laboratório. A sequência utilizada nesta construção teve por base a NS1 do DENV2 cepa JHA1, um isolado clínico neurovirulento utilizado em modelo de infecção padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (60). Estoque dessa linhagem foi descongelado e cultivado em 50 ml de meio Luria-Bertani (LB) contendo canamicina (50 µg/ml) e cloranfenicol (30 µg/ml) à 37 °C sob agitação (200 rpm) em agitador orbital por 18 h. Esta cultura foi utilizada como pré-inóculo, sendo cultivada na proporção de 1/100 em 4 litros de meio LB e mantida nas mesmas condições de crescimento descritas anteriormente até atingir fase de crescimento exponencial média ($DO_{600nm} = 0,5-0,6$). Nessa etapa a expressão da proteína recombinante iniciou-se pela adição do indutor Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside - IPTG (SIGMA) na concentração final de 0,5 mM e a cultura foi mantida sob as condições descritas anteriormente por mais 4 h. Alíquotas da cultura com quantidades equivalentes de células foram coletadas antes (T₀) e após (T₄) indução. Ao fim do período de indução, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 30 min a 4 °C, suspensas em 400 ml de tampão A (0,1 M Tris; 0,25 M NaCl; 20% glicerol; 1 mM PMSF; pH 8,2) e submetidas a um processo de lise celular por homogeneização à alta pressão (600 psi) por 10 min. O lisado resultante foi centrifugado (10.000 x g por 1 h a 4 °C), sendo as frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado) separadas e coletadas. À fração insolúvel foi adicionado tampão B (8 M uréia; 0,1 M Tris; 0,25 M NaCl; pH 8.2) na proporção 10 ml tampão/litro de cultura induzida. A solubilização foi realizada por 18 h a 4°C, sendo posteriormente a solução centrifugada (10.000 x g por 1 h a 4 °C) e utilizada para procedimento de renaturação e purificação. Amostras antes (T₀) e após (T₄) indução, bem como alíquotas das frações solúveis (Fs) e insolúveis (Fi), foram desnaturadas a 100 °C por 5 min e em seguida submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e ensaios de *Western blot* utilizando anticorpos monoclonais com reconhecimento específico para a cauda de histidina ou para a proteína NS1 DENV2 (item 3.3).

Uma amostra da fração insolúvel solubilizada (10 ml) foi submetida a processo de renaturação *in vitro* por método de diluição pulsada com auxílio de bomba peristáltica (fluxo de 250 μ l/min) em 2 L de tampão A, sob agitação constante de 60 rpm. Após renaturação, a amostra foi novamente centrifugada e filtrada em membrana de 0,22 μ m (Millipore). A purificação da proteína NS1-JHA1 foi realizada em aparelho AKTA – Avant (GE Healthcare Life Sciences), no qual toda a amostra de NS1-JHA1 renaturada (2 L) foi então aplicada em coluna HisTrap HP 5 ml (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrada com tampão A. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna (VC) de tampão A, sendo em seguida a proteína eluída pela aplicação de gradiente linear (0 a 1 M) de Imidazol utilizando mistura do tampão A com tampão C (0,1M Tris; 0,25 M NaCl; 1M Imidazol; 20% glicerol; pH 8.2). Alíquotas das frações protéicas eluídas (15 μ l) foram desnaturadas a 100 °C por 5 min, e em seguida submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). As frações eluídas restantes, correspondentes ao pico da proteína, foram reunidas, transferidas para membrana de diálise (Thermo Scientific, #88244) e submetidas à diálise overnight em 2 L de tampão A para retirada de Imidazol.

3.2 Expressão e purificação da proteína recombinante Δ CNS1-JHA1

A expressão, renaturação e purificação da proteína Δ CNS1-JHA1, utilizando linhagem de *Escherichia coli* BL21-(DE3)-RIL capaz de expressar a proteína Δ CNS1-JHA1 disponível em nosso laboratório, foram realizadas de acordo as condições descritas no item 3.1. Os tampões utilizados nas etapas de lise celular e purificação, para esta proteína, foram: A (0,1M Fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; 20% glicerol; 1mM PMSF; pH 7,0), B (8M Uréia; 0,1M Fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; pH 7,0) e C (1M Imidazol; 0,1M Fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; 20% glicerol; pH 7,0).

Tendo por objetivo a expressão da proteína Δ CNS1-JHA1 na fração solúvel do extrato bacteriano, a indução da expressão desta proteína também foi testada na temperatura de 18 °C por um período de 18 h, sendo o processamento da cultura após indução realizado de acordo ao descrito anteriormente. Para estes testes, as culturas celulares foram feitas em menor escala (50 ml), sendo a indução da expressão da proteína Δ CNS1-JHA1 iniciada pela adição de IPTG (0,5 mM) na fase de crescimento exponencial correspondente a $DO_{600nm} = 1,0$. Além disso, a lise das culturas celulares (após indução) foi testada em dois tampões: I (fosfato de sódio 0,1M; NaCl 0,5M; 20%

glicerol; 1mM PMSF; pH 7,0) ou II (Tris 0,1M; NaCl 0,25M; 20% glicerol; 1mM PMSF; pH 7,0). Alíquotas das frações solúveis e insolúveis foram coletas, desnaturadas à 100 °C por 5 min e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e ensaios de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal primário anti- NS1.

Além da purificação da proteína Δ CNS1-JHA1 a partir do produto de renaturação realizado por método de diluição pulsada (de acordo ao item 3.1), a purificação desta proteína em condições desnaturantes foi também testada. Para isso, 10 ml do extrato protéico contendo a proteína Δ CNS1-JHA1 solubilizado em tampão desnaturante (8M Uréia; 0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; pH 7,0) foi aplicado em coluna HisTrap HP (5 ml) com auxílio do aparelho AKTA – FPLC (GE Healthcare Life Sciences). Após lavagem da coluna com o mesmo tampão desnaturante, a proteína foi eluída mediante aplicação de gradiente linear de tampão contendo imidazol (1M Imidazol; 8M Uréia; 0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; pH 7,0). Alíquotas (10 μ L) das frações eluídas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%), sendo as frações reunidas para utilização nos testes de renaturação por filtração tangencial e eletroeluição (item 3.6).

3.3 Ensaios de Western blot

Para realização dos ensaios de Western blot as amostras protéicas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE15%) e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences). O bloqueio da membrana foi realizado em solução de PBS-Tween 0,05% com 5% de leite por 2 h, a temperatura ambiente. A marcação primária foi realizada por incubação (1 h) com anticorpos monoclonais que reconhecem a cauda de histidina (Sigma), ou reconhecem especificamente a proteína NS1 Dengue 2, nas diluições de 1:5.000 ou 1:6.000, respectivamente, utilizando tampão de bloqueio. Anticorpos anti-IgG de camundongos produzidos em cabra conjugados com a enzima peroxidase (Sigma) (diluição 1:10.000) foram usados como anticorpos secundários. As bandas reativas de proteínas foram identificadas pela exposição das membranas à solução de luminol-peróxido de hidrogênio, de acordo com as indicações do fabricante (SIGMA). Como controles positivos e negativos dos ensaios foram utilizadas, respectivamente, 1 μ g das proteínas recombinantes NS1DENGUE 2 (~47 kDa) (61) e 1 μ g da proteína EDIII DENGUE2 (~15 kDa) (62).

3.4 Otimização da renaturação *in vitro* da proteína Δ CNS1-JHA1 utilizando diferentes tampões.

A fração insolúvel da proteína Δ CNS1-JHA1 foi obtida após indução à 37 °C de acordo ao item 3.1 e solubilizada em tampão desnaturante (8M Uréia; 0,1M Fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; pH 7,0). O extrato protéico total solubilizado foi quantificado por espectrofotometria (63) utilizando coeficiente de extinção da proteína Δ CNS1-JHA1. Três miligramas de proteína foram utilizados para realização de processo de renaturação *in vitro* por diluição pulsada com auxílio de bomba peristáltica (fluxo 250 μ l/min.) em 250 mL de diferentes tampões, como descritos na tabela 1. O produto da renaturação foi centrifugado (10.000 x g, 40 min.) e o sobrenadante utilizado para quantificação protéica. Alíquotas de 15 μ l do produto de renaturação foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. O rendimento da renaturação foi calculado tendo como base a quantidade inicial (QPi) e final (QPf) de proteína: $(Q_f \times 100) / Q_i$.

Tabela 1 - Tampões utilizados nos testes de renaturação por diluição pulsada.

I	0,1 M fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; 10% glicerol; pH 7,0.
II	0,1 M Tris; 0,25 M NaCl; 10% glicerol; pH 7,0.
III	0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; 10% glicerol; pH 7,0.

3.5 Renaturação gradativa em coluna HisTrap HP.

O extrato protéico (70 mg) contendo a proteína Δ CNS1-JHA1 solubilizada em tampão desnaturante B (8 M uréia; 0,1 M Fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; pH 7,0) foi aplicado na coluna HisTrap HP (5 ml) previamente equilibrada (com tampão B) utilizando aparelho AKTA – FPLC (GE Healthcare Life Sciences). Após lavagem da coluna com 10 VC de tampão de equilíbrio (para retirar proteínas não ligadas), procedeu-se a renaturação protéica pela retirada gradativa de uréia, realizada pela aplicação de um gradiente (0-100%) de tampão sem agente desnaturante (0,1 M Fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; 20% glicerol; pH 7,0). Após renaturação, a proteína Δ CNS1-JHA1 foi eluída mediante a aplicação de novo gradiente (0-100%) utilizando tampão contendo imidazol (1M Imidazol; 0,1 M Fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; 20% glicerol; pH 7,0). Alíquotas das frações protéicas eluídas (15 μ l) foram desnaturadas a 100 °C por 5 min. e em seguida submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

3.6 Filtração tangencial e eletroeluição.

A proteína Δ CNS1-JHA1 purificada em condições desnaturantes (vide item 3.2) por cromatografia de afinidade ao níquel foi submetida ao procedimento de renaturação de forma gradual utilizando tampões (Fosfato de Sódio 0,1 M; 0,5 M NaCl; pH 7,0; 20% glicerol) com concentrações decrescentes de uréia (6 M, 4 M, 2 M, 1 M e 0 M). O procedimento de renaturação foi realizado utilizando sistema de filtração tangencial (Millipore LavScale TFF System) com membrana Pellicon (Millipore) de 10 kDa de acordo ao descrito por Porchia et al. (2011). O produto final foi centrifugado (10.000 x g, 40 min.) e uma alíquota do sobrenadante (15 μ l) submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

A proteína Δ CNS1-JHA1, purificada em condições desnaturantes, foi também utilizada para ensaio de eletroeluição. Para isto, 260 μ g de proteína foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%), sendo as bandas correspondentes à proteína Δ CNS1-JHA1 (~35 kDa) excisadas do gel, submersas em 4 mL de tampão (25 mM Tris; 2,5 M glicina; 0,1% SDS) em saco de diálise (3,5 kDa) e submetida a eletroforese com 20 mA por 18 h. Após eletroeluição, o produto foi centrifugado (10.000 x g, 40 min.) e o sobrenadante (15 μ l) submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

3.7 Avaliação da influência de diferentes aditivos anti-agregantes sobre a renaturação *in vitro* da proteína Δ CNS1-JHA1.

O extrato da proteína Δ CNS1-JHA1 solubilizado em tampão desnaturante foi quantificado, ajustado para uma concentração final de 2 mg/ml (V/V) e utilizado para os testes de renaturação. A renaturação protéica foi realizada por método de diluição direta (65), de modo a se obter uma concentração final de 0,2 mg/ml em tampão de renaturação (0,1 M Fosfato de Sódio; 0,5 M NaCl; 1 mM PMSF; pH 7,0) contendo os aditivos L-Arginina (0 M, 0,25 M ou 0,5 M), D-glicose (0 M, 0,5 M ou 1 M) ou β -ciclodextrina (0 M, 20 mM ou 40 mM). A mistura referente a cada aditivo foi mantida sob baixa agitação por até 120 min. a 4 °C, sendo a intensidade de agregação protéica mensurada por espectrofotometria (transmitância a 600 nm). O produto de renaturação foi centrifugado (10.000 x g, 40 min.) e o sobrenadante (proteína solubilizada) utilizado para quantificação protéica e eletroforese em gel de poliacrilamida a (SDS-PAGE 15%).

O cálculo do rendimento de renaturação foi realizado com base na quantidade inicial (Q_i) e final (Q_f) de proteína utilizada no procedimento: $(Q_f \times 100)/Q_i$.

3.8 Renaturação protéica utilizando alta pressão hidrostática.

Corpúsculos de inclusão (CI) das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 expressas em *E. coli* foram obtidos após lise celular por homogeneização sob pressão (600 psi) por 10 min. e centrifugação (10.000 x g, 1 h). Os corpúsculos de inclusão de cada proteína (precipitado resultante após centrifugação) foram suspensos separadamente em tampão de lavagem A1 (NS1-JHA1) ou A2 (Δ CNS1-JHA1) (Tabela 2), sonicados (15 seg. ON; 10 seg. OFF; 35% amplitude por 1,5 min.) e centrifugados (10.000 x g, 10 min.). Esta etapa de lavagem foi repetida mais uma vez, sendo que ao final os CI foram ressuspensos nos tampões B1 (NS1-JHA1) ou B2 (Δ CNS1-JHA1) e submetidos à lavagem por mais 2 vezes, como descrito anteriormente. Ao final os CI lavados foram ressuspensos em 10 ml dos tampões B1 (NS1-JHA1) ou B2 (Δ CNS1-JHA1), sendo armazenados a -20 °C para posterior etapa de renaturação.

Tabela 2 - Tampões utilizados nos testes de renaturação das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 por alta pressão hidrostática.

A1	0,1 M Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% de deoxicolato de sódio; pH 8,5.
A2	0,1 M Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% de deoxicolato de sódio; pH 7,0.
B1	0,1 M Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8,5.
B2	0,1 M Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 7,0.
R1	50 mM Tris-HCl; 0,5 M L-Arginina; 1M guanidina; pH 8,5
R2	50 mM Tris-HCl; 0,5 M L-Arginina; 1M guanidina; pH 7,0
C1	50 mM Tris-HCl; pH 8,5
C2	50 mM Tris-HCl; pH 7,0

Para submeter os CI à renaturação sob pressão hidrostática, os mesmos foram diluídos para uma $D.O._{(350nm)} = 1$ em tampão de renaturação (R1 para proteína NS1-JHA1 e R2 para proteína Δ CNS1-JHA1). As amostras foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos, que foram posteriormente selados. As amostras foram então submetidas ao tratamento de renaturação em vaso de pressão R4-6-40/PS-50 (High Pressure Equipment Company) por 16 h a uma pressão de 2,4 kbar. Após descompressão, as amostras foram centrifugadas (10.000 x g, 1 h), dialisadas em tampão C1 (NS1-JHA1) ou C2 (Δ CNS1-JHA1) e centrifugadas novamente para remoção de proteínas precipitadas. Os sobrenadantes foram utilizados separadamente

para purificação das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 por cromatografia de afinidade ao níquel, de acordo ao descrito nos itens 3.1 e 3.2. Os ensaios de renaturação por pressão foram realizados em colaboração com a Prof^a Dra. Lígia E. M. Ferreira Dias (IPEN-USP).

3.9 Análise computacional do perfil de hidrofobicidade da proteína NS1-JHA1.

A determinação do perfil de hidrofobicidade da proteína NS1 DENV2 cepa JHA1 foi realizada por análise computacional seguindo algoritmo descrito previamente (66). A análise foi realizada utilizando o software web IEDB Analysis Resource com base na predição de epítomos lineares para células B seguida de predição de hidrofobicidade de Parker.

3.10 Clonagem das proteínas Δ CNS1 e NS1 (cepa JHA1 DENV2) fusionadas a anticorpo monoclonal anti-DEC205.

As sequências codificadoras para a proteína NS1 e Δ CNS1, ambas da cepa JHA1 de DENV2 (60), foram obtidas por amplificação, tendo o plasmídeo pNS1-JHA1 (pET28a) como molde. A amplificação dos genes de interesse foi realizada utilizando a enzima Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), de acordo as instruções do fabricante, sendo os iniciadores utilizados nas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), contendo os sítios de restrição para as enzimas *NotI* e *XhoI*, descritos no tabela 3. As sequências de DNA codificadoras (NS1 e Δ CNS1) amplificadas foram clonadas e propagadas inicialmente utilizando o kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific), de acordo as instruções do fabricante. Em seguida, as sequências NS1 e Δ CNS1 foram subclonadas em fusão com a sequência codificadora para região carboxi-terminal da cadeia pesada do anticorpo monoclonal anti-DEC205 de camundongo (clone NLDC145), fornecido gentilmente pela professora Dra. Sílvia Beatriz Boscardin (Laboratório de Direcionamento de Antígenos para células dendríticas/ICB-USP).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificação das sequências Δ CNS1-JHA1 e NS1-JHA1.

FwNS1	5'-GCTCGAGGAGTTCGGTAGGTTTCGATAGTGGTTGCGTTGTGAG-3',
RvNS1	5'-GGCGGCCGCTCAGGCTGTGACCAAGGAGTTG-3'
Rv Δ CNS1	5'-CATTGCGGCCGCTCATAGATGCCAAGGTCCTGC-3'

A confirmação dos plasmídeos recombinantes obtidos foi realizada por análise de restrição com as endonucleases *NotI* e *XhoI* e sequenciamento dos genes Δ CNS1-JHA1 e NS1-JHA1 pela técnica de interrupção de síntese com dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos. Neste último utilizou-se o sequenciador automático (ABI 377, Perkin-Elmer Applied Biosystems) disponível no departamento de Bioquímica/FCF da USP e reagentes do kit comercial “Big Dye terminator DNA sequencing” (Applied Biosystem). Para análise dos resultados do sequenciamento foi utilizado o software SeqMan (LaserGene package, DNASTAR).

Os plasmídeos contendo a cadeia pesada do mAb anti-DEC205 (pDEC-NS1-JHA1 e pDEC- Δ CNS1-JHA1) e sua respectiva cadeia leve (pDEC kappa) foram utilizados para transformar linhagem de *E. coli* DH5 α . Clones únicos contendo cada plasmídeo foram crescidos separadamente em 100 ml de meio LB contendo 100 μ g/ml de ampicilina por 16-18 h (200 rpm/ 37 °C). O DNA plasmidial foi purificado separadamente a partir das culturas utilizando Kit Midi Prep (Invitrogen) de acordo as instruções do fabricante.

3.11 Expressão e purificação dos anticorpos α DEC e α DCIR2 controles e quiméricos.

Para ensaio de expressão dos anticorpos recombinantes construídos células embrionárias de rim humano (HEK) 293T (ATCC N° CRL-11268) foram cultivadas de acordo a protocolo descrito previamente (44) até atingirem a confluência de 70–80%. Neste momento, as células foram lavadas com meio DMEM sem SFB, sendo em seguida adicionado às mesmas 20 mL DMEM (suplementado com 1% Nutridoma-SP (Roche), 1 x de l-glutamine e 1 x de solução antibiótico/antifúngico) e em seguida utilizadas para procedimento de transfecção mediada por polietilenoimina (PEI) com quantidades equivalente dos plasmídeos codificando para as cadeias leves e pesadas. Dez microgramas de cada plasmídeo foram adicionados para o volume final de 1 ml em solução de NaCl (150mM) contendo 4,5 μ g de PEI por μ g de DNA. Estas misturas foram homogeneizadas (10 seg.), incubadas por 5 min. (T.A) e distribuídas sobre as placas uniformemente. O sobrenadante referente a 5 placas (teste de expressão dos anticorpos construídos) ou 25 placas (produção dos anticorpos em larga escala) foi recolhido 5-6 dias após transfecção, clarificado a 1.000 x g (30 min.) e filtrado em membrana de 0,22 μ m (Corning). Os anticorpos recombinantes contidos no

sobrenadante de cultura foram purificados com esferas contendo Proteína G (GE Healthcare) também de acordo ao descrito por Henriques et al. (2013).

Os anticorpos quiméricos purificados resultantes foram submetidos a ensaio de western blot de acordo ao item 3.3, sendo que anticorpo monoclonal anti-NS1 (1:5000) foi empregado como marcação primária e a proteína A-HRP-peroxidase (1:1000) como marcação secundária.

3.12 Ensaio funcionalidade dos anticorpos.

A funcionalidade dos anticorpos controles (α DEC e α DCIR2) e quiméricos (α DEC-NS1 e α DCIR2-NS1) foi analisada mediante teste de ligação dos mesmos em seus respectivos receptores de acordo a protocolo descrito previamente (44). Para isso células CHO que expressam de forma estável os receptores DEC205 ou o DCIR2 foram incubadas com os anticorpos diluídos para uma concentração final de 10, 1 ou 0.1 mg/ml em gelo durante 45 min. Após incubação as células foram lavagens duas vezes com PBS 1 x acrescido de SFB a 2% (FBS, Life Technologies), sendo em seguida incubadas com anticorpo anti-IgG1 de camundongo conjugado a ficoeritrina (PE) (1:2000) durante 30 min. em gelo. Após duas lavagens adicionais, 20.000 eventos foram adquiridos usando citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences).

3.13 Ensaio de Imunização.

Os experimentos com camundongos foram conduzidos de acordo aos Princípios Éticos da Experimentação Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Camundongos da linhagem Balb/C machos (6-8 semanas) foram inoculados por via i.d. ou i.p de acordo aos seguintes grupos de imunização: 1) animais que receberam o anticorpo α DEC (2,5 μ g/animal); 2) anticorpo α DCIR2 (2,5 μ g/animal); 3) anticorpo α DEC-NS1 (2,5 μ g/animal); 4) anticorpo α DCIR2-NS1 (2,5 μ g/animal); 5) animais que receberam 1 μ g da proteína recombinante NS1 DENV2 (cepa NGC). Todas as formulações vacinais foram adjuvantadas com Poly (I:C) na quantidade de 50 μ g/animal, sendo utilizado como veículo soro fisiológico. Cada grupo de animais (n=5) receberam duas doses das formulações vacinais ou controle, sendo adotado um intervalo de 2 semanas entre as doses. Para o experimento de avaliação da indução de memória imunológica, transcorridos 146 dias após a administração da

segunda dose vacinal os animais foram re-estimulados com a inoculação de 1 µg/animal da proteína NS1.

Para o monitoramento de resposta de anticorpos específicos contra o antígeno vacinal, amostras de sangue dos animais foram obtidas por punção do plexo submandibular e processadas (coagulação a 37 °C por 15 min. e retração do coágulo a 4 °C por 30 min., seguida de centrifugação à 3000 x g por 30 min., 4 °C) para obtenção de soro. As amostras obtidas foram estocadas em *freezers* a – 20 °C para posteriores análises. As coletas de sangue foram realizadas 14 dias após a administração de cada dose do protocolo vacinal. Para acompanhamento da longevidade da resposta humoral coletas adicionais foram realizadas nos dias 45, 90 e 160 do protocolo vacinal. Para a avaliação de indução de memória imunológica coletas de sangue foram realizadas também 7 e 15 dias após re-estímulo com a administração do antígeno NS1.

3.14 Ensaios de ELISA.

Microplacas de poliestireno Costar (Corning) foram sensibilizadas por 18 h a temperatura ambiente (T.A) com a proteína rec. NS1 purificada (200 ng/poço em 50 µl). As placas foram lavadas três vezes com solução PBS 1 x contendo 0,02% de Tween-20 (PBS-T). Após a lavagem, o bloqueio foi realizado mediante adição 200 µl/poço de solução de leite 5% acrescida de albumina de soro bovino (BSA) a 1% em PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente (T.A). Após novo ciclo de lavagem (3 x), 100 µl dos soros diluídos em solução diluente (leite 5% + BSA 0,25% em PBS-T) individuais foram adicionados aos poços e incubados a temperatura ambiente por 2 h. Depois de um novo ciclo de lavagem (3 x), foram adicionados aos poços, na diluição 1/2000, 50µl do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase. Para os determinação das subclasses de IgG, anticorpos anti-subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram empregados. Após incubação de 2 h (T.A), as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e a revelação foi realizada com adição de 100 µL/poço da solução reveladora (10 mg de OPD (Sigma) dissolvidos em 10 mL de solução contendo fosfato de sódio (Synth) 0,2 M e ácido cítrico (Synth) 0,2 M (pH 4,7) acrescido de 10µL de H₂O₂ 30%) por 15 min, à temperatura ambiente sob abrigo da luz, e interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 1 M. A leitura da densidade óptica foi realizada a 490 nm em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems). Considerou-se como valor de título o primeiro valor de diluição em que a DO_{490nm} fosse igual ou superior 0,1.

Para o ensaio de avaliação da ligação dos anticorpos a epitopos conformacionais e lineares a sensibilização das placas foi realizada com a proteína intacta ou previamente desnatura por calor (aquecimento a 100 °C por 10 min seguido de resfriamento a 0 °C). Todos os demais procedimentos descritos anteriormente foram mantidos.

3.15 Análise da afinidade dos anticorpos NS1 específicos.

Para este ensaio misturas dos soros correspondentes a cada grupo de animais imunizados foram avaliadas previamente para a determinação do título de IgG total anti-NS1 por ensaio de ELISA e foram normalizados para uma D.O. de 1,0. O ensaio de afinidade seguiu os procedimentos descritos para ELISA (item 3.14) sendo a este acrescida uma etapa de dissociação dos anticorpos anti-NS1 por incubação com várias concentrações de tiocianato de amônio diluído em PBS (0.0 M, 0.125 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.5 M, 1 M, 2 M, 4 M ou 8 M) por 15 min a temperatura ambiente. A percentagem de ligação anticorpo-antígeno correspondente a cada concentração de tiocianato de amônio testada foi determinada da seguinte forma: D.O. (490 nm) em presença de tiocianato de amônio X 100/D.O. (490 nm) em ausência de tiocianato de amônio. A concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% da ligação do anticorpo ao antígeno foi determinada por cálculo empregando método de regressão linear (67).

3.16 Avaliação da ligação dos soros vacinais à plaquetas humanas.

Sangue total humano anticoagulado (citrato de sódio) foi obtido por punção venosa e centrifugado a 100 x g por 20 min à temperatura ambiente para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi centrifugado a 1.000 x g durante 10 min à T.A, sendo o sobrenadante separado (plasma pobre em plaquetas, PPP) e o pellet resultante ressuspenso em tampão de lavagem (PBS 1 x+EDTA 1 mM) e, em seguida, centrifugado novamente (1.000 x g durante 10 min à T.A). Após duas lavagens, as plaquetas foram ressuspensas em solução de fixação (PBS 1 x + 1% formaldeído) e incubadas por 10 min., T.A. Após fixação, as células foram lavadas com PBS 1 x e contadas com auxílio de câmara de Neubauer. As células (total de 10⁶) foram então incubadas com os soros de animais imunizados (a uma concentração de IgG NS1-específico final de 2,5 µg/ml, em 100 µl) ou anticorpo IgG de camundongo comercial (SouthernBiotech) em igual concentração, diluídos em PPP, por 30 min. à T.A. Após incubação, as células foram lavadas 2 x com PBS e, em seguida, marcadas com anticorpo anti-IgG de camundongo

conjugado (Alexa Fluor-488, BD Biosciences) por 30min à T.A. A ligação a plaquetas foi analisada por meio de citometria de fluxo (BD Biosciences).

3.17 Ensaio de Inibição da agregação plaquetária.

Amostras de sangue anticoaguladas com citrato de sódio a 3,8% (9:1 vol/vol, Sangue/Citrato) foram coletadas de voluntários adultos humanos saudáveis que não tinham histórico de tratamento com qualquer medicação nas últimas duas semanas que antecederam a coleta. O sangue citrado foi centrifugado por 10 min a 120 x g (25 °C), sendo o sobrenadante coletado para obtenção de PRP. Para preparação do PPP 1 ml de PRP foi centrifugada a 850 x g por 30 min, sendo o sobrenadante coletado (PPP). Para análise da agregação plaquetária 400 µl de PRP foi incubado separadamente com os soros dos animais imunizados (a uma concentração de IgG NS1-específico final de 2,5 µg/ml, em 400 µl), anticorpo IgG de camundongo comercial (SouthernBiotech) em igual concentração ou PBS. Para mensuração da agregação plaquetária as amostras foram analisadas em aparelho agregômetro (CHRONO-LOG Corporation/490 2D) por 3 min, sendo em seguida adicionado ADP (20 µM) à solução como indutor da agregação e as amostras foram monitoradas por mais 3 min. O aparelho agregômetro foi calibrado previamente tendo o PPP como 0% agregação. A extensão da agregação foi calculada como o aumento da transmissão da luz, durante 3 min após a adição de ADP. (68).

3.18 Ensaio de alteração da permeabilidade vascular *in vitro*.

Células de endotélio de veia umbilical humana (HUVEC, do inglês *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) semeadas em insertos Transwell® (Corning, cód 3392) recobertos com uma solução de gelatina a 0.2% (Sigma) foram mantidas em estufa de 5% de CO₂ a 37 °C por 24 h para alcançar a confluência. Em seguida, o meio foi trocado e as células tratadas com 10% de misturas de soro dos camundongos imunizados pelas vias i.d. ou i.p. Após os tratamentos, as culturas foram novamente incubadas a 37 °C e a TEER (resistência elétrica transendotelial, do inglês *transendothelial electrical resistance*) avaliada 6, 10 e 24 h pós-tratamento utilizando-se o voltímetro EVOM² com o eletrodo STX100c. Para os cálculos, os valores de TEER em ohms (Ω) dos controles negativos (insertos sem células) foram subtraídos dos valores obtidos em cada inserto com células. Finalmente, os valores foram multiplicados pela área dos insertos resultando na TEER corrigida em Ω × cm².

3.19 Análises hematológicas.

Para as análises hematológicas amostras de sangue total dos animais imunizados foram coletadas (sete dias após a segunda dose vacinal) em tubos contendo citrato de sódio (7,8%) e utilizadas para confecção de hemogramas com auxílio de aparelho de hematologia (Auto Hematology Analyzer – BC2800vet - MINDRAY). Partes das amostras de sangue coletadas foram também utilizadas para mensuração do tempo de protombina utilizando kit analítico de acordo com as instruções do fabricante (Soluplastin, Wiener lab.).

O tempo de sangramento dos animais imunizados foi determinado (4 dias após a administração da 2 dose vacinal) mediante uma transecção de 3 mm realizada na ponta da cauda do animal. Gotas de sangue foram gentilmente coletadas com auxílio de papel filtro a cada 30 segundos, sendo o tempo de sangramento contabilizado até as manchas de sangue recuperadas apresentaram aproximadamente 0,1 mm de diâmetro (45).

3.20 Avaliação de danos hepáticos.

Amostras de soro dos animais imunizados, obtidos sete dias após a administração da segunda dose vacinal, foram utilizadas para avaliação de parâmetros bioquímicos incluindo, determinação das atividades da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), e da enzima lactato desidrogenase (LDH). Para estes ensaios foram utilizados kits analíticos seguindo as instruções do fabricante (Bioclin, Brasil).

3.21 Ensaio de desafio.

Duas semanas após a segunda dose vacinal, os camundongos dos grupos controle ou vacinados serão desafiados com o DENV-2 (cepa NGC). Para isto os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina-xilazina (100 µL/animal) e inoculados por via intracerebral com 30 µL de meio L-15 contendo 50 x DL50 (total de 5×10^5 UFP) da cepa de DENV citada. Os camundongos foram separados em grupos (9-10 animais/grupo) para cada teste, sendo avaliados por 21 dias quanto ao aparecimento de sinais de morbidade (fraqueza muscular, paralisia de membros, arqueamento da coluna, paralisia total) e mortalidade. Para fins de cálculo de morbidade a positividade para este

parâmetro foi considerada positiva quando os animais apresentaram paralisia em uma das patas.

3.22 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5 utilizando análise de variância (Anova) com subsequente teste de comparação múltipla de Bonferroni. Para os dados de sobrevivência e morbidade foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox). A significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$, $p < 0.01$ ou $p < 0.001$.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram divididos em dois grandes blocos para melhor organização e compreensão do conteúdo apresentado. O primeiro bloco foi dedicado à descrição das tentativas de obtenção das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1, sendo o segundo bloco dedicado à descrição dos ensaios de imunização explorando a via i.d.

4.1 BLOCO 1- Obtenção das proteínas recombinantes NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1.

4.1.1 Expressão e purificação da proteína recombinante NS1-JHA1.

A expressão da proteína NS1-JHA1 foi testada na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) RIL após indução com IPTG por 4 h a 37 °C. Como é possível observar na figura 2A, a proteína foi expressa somente após indução e apresentou massa molecular esperada (~43 kDa). Na condição de cultura testada, a proteína se concentrou somente na fração insolúvel do extrato protéico, sendo esta observação confirmada por ensaio de *western blot* utilizando anticorpos monoclonais dirigidos para proteína NS1 de DENV2 e para a cauda de histidina (presente apenas na proteína de interesse) (Figura 2A).

Em geral, a superexpressão de proteínas recombinantes em *E. coli* apresenta a desvantagem de deposição das mesmas em corpúsculos de inclusão insolúveis, sendo necessário empregar técnicas para obtenção da proteína de interesse de forma solúvel, com estrutura e função preservadas (69,70). Assim, neste trabalho adotamos o método de renaturação por diluição pulsada seguida de purificação por cromatografia de afinidade ao níquel (CAN). Como é possível observar na figura 3 (A e B), a proteína NS1 foi purificada, apresentando banda característica de aproximadamente 43 kDa. As frações eluídas da proteína foram reunidas e dialisadas para retirada do imizadol, apresentando rendimento ao final do processo de 5,5 mg/litro de cultura, sendo satisfatório e equiparável ao encontrado na literatura (61,71,72).

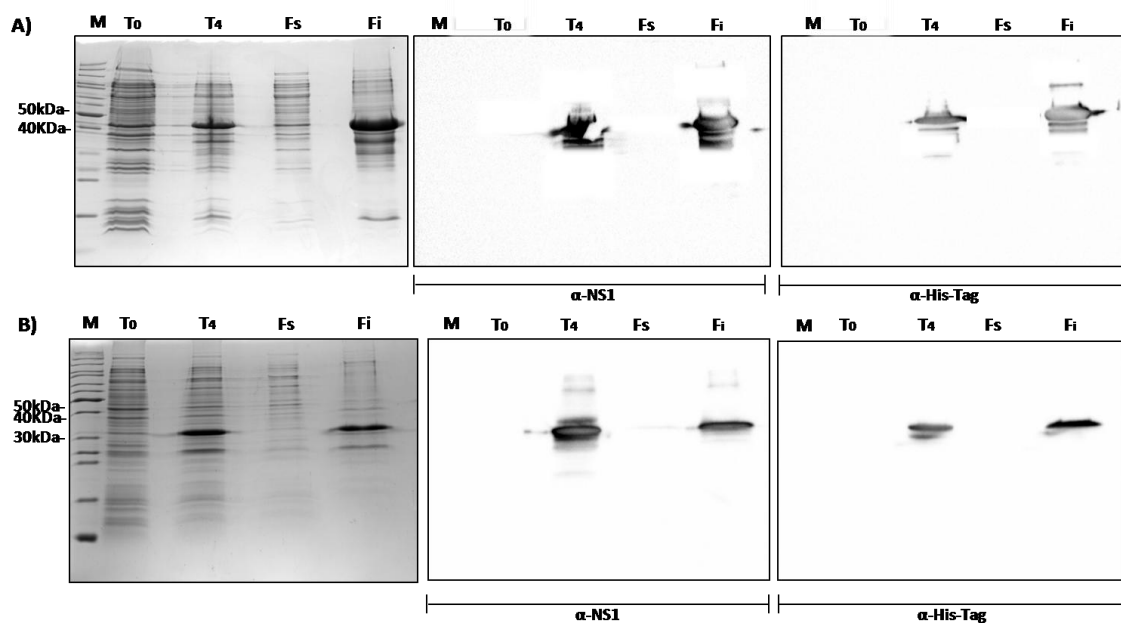


Figura 2 - Teste de expressão das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 na linhagem *E. coli* BL21-(DE3)-RIL. Culturas das linhagens *E. coli* BL21-(DE3)-RIL capazes de expressar as proteínas Δ CNS1-JHA1 e NS1-JHA1 foram induzidas à 37 °C por 4 h. Amostras antes e após indução das proteínas NS1-JHA1 (A) e Δ CNS1-JHA1 (B) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e ensaio de western blot utilizando anticorpos anti-NS1 e anti-HisTag, conforme indicado na figura. Descrição: canaleta M corresponde ao marcador de massa molecular; canaleta T0, ao extrato celular total sem indução; canaleta T4, extrato celular total após 4 h de indução; canaletas Fs, fração celular protéica solúvel após indução; canaletas Fi, fração celular proteica insolúvel após indução, solubilizada em tampão desnaturante contendo 8 M de uréia.

A NS1 quando produzida em sua forma nativa na célula infectada pode se apresentar de três formas: monomérica (intracelular), dimérica (associada às membranas do retículo endoplasmático e citoplasmática) ou hexamérica (secretada para o meio extracelular) (73–75). Alíquotas da proteína purificada foram submetidas à eletroforese em gel não desnaturante para verificar a formação de estruturas que sugerem formas quaternárias (dímeros e/ou hexâmeros). Como é possível observar na Figura 3-C, a proteína NS1 preservou a capacidade de formação de dímeros, sendo evidenciadas no gel duas bandas (~43 kDa e ~86 kDa) na ausência de desnaturação protéica, sendo que quando a proteína foi aquecida a 100 °C por 5 min, apenas monômeros, com massa molecular de ~43 kDa, foram visualizados (Figura 3-D). Estes dados servem como indicativo da qualidade da proteína obtida, sendo necessários testes adicionais para melhor caracterização da estrutura dimérica observada.

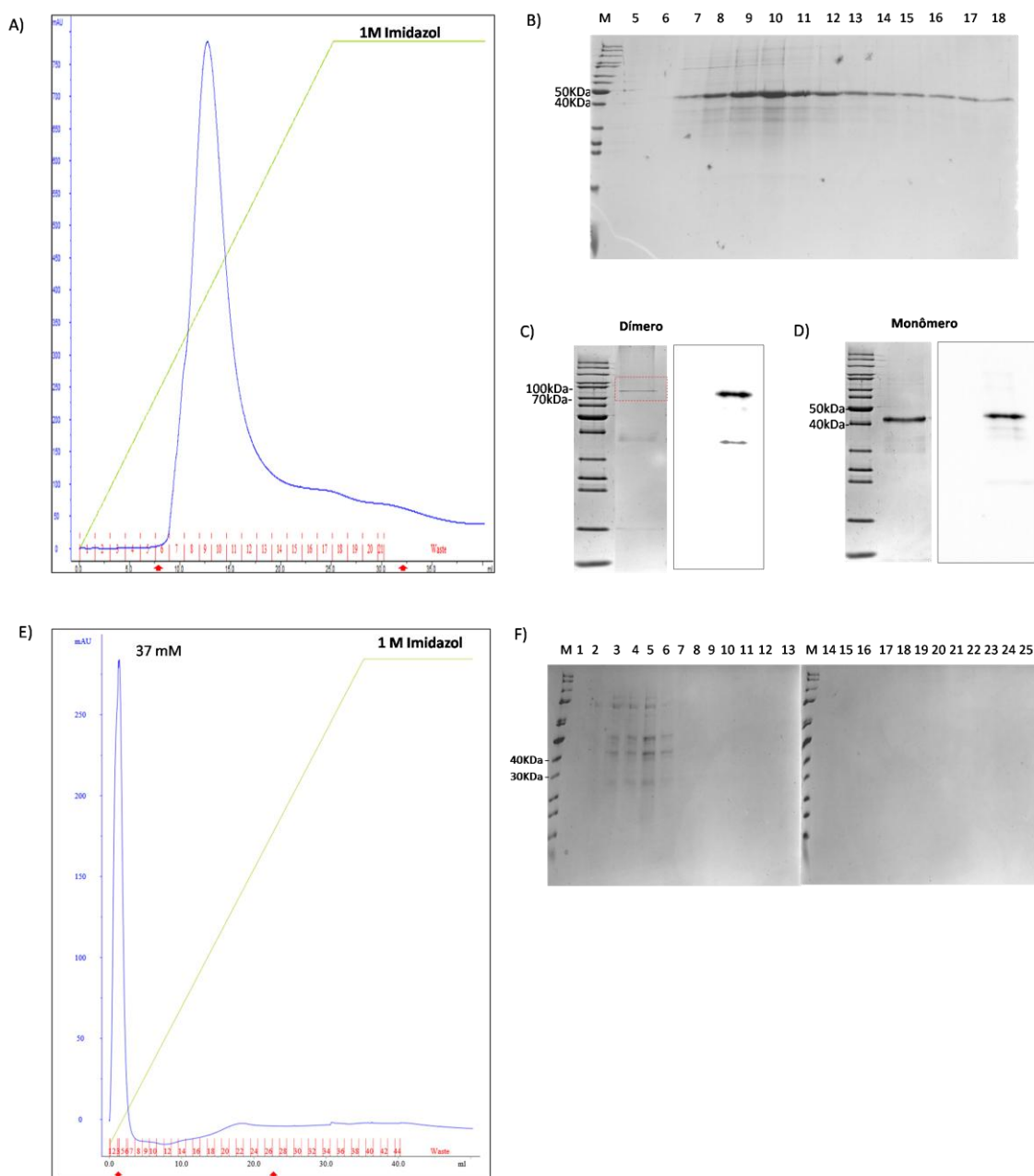


Figura 3 - Purificação das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 por cromatografia de afinidade. As frações insolúveis do extrato bacteriano das linhagens de *E. coli* contendo as proteínas NS1-JHA1 ou Δ CNS1-JHA1, solubilizadas em tampão desnaturante, foram utilizadas para renaturação por diluição pulsada e posterior purificação por método de cromatografia de afinidade ao níquel. A e E) Cromatogramas de eluição das proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1, respectivamente, utilizando gradiente de Imidazol variando de 0 a 1 Molar. Amostras da proteína NS1-JHA1 purificada foram submetidas à eletroforese em condições desnaturantes (D) ou não (C), as quais foram também empregadas em ensaio de western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-NS1. Amostras das frações eluídas da purificação das proteínas NS1-JHA1 ~43 kDa (B) e Δ CNS1-JHA1 ~35 kDa (F) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). Descrição: canaleta M correspondem ao marcador molecular; demais canaletas correspondem às frações dos picos de eluição das proteínas Δ CNS1-JHA1 (1-25) ou NS1-JHA1 (5-18), destacadas nos cromatogramas com setas em vermelho.

4.1.2 Expressão da proteína Δ CNS1-JHA1 na linhagem *E. coli* BL21 (DE3) RIL.

A proteína Δ CNS1-JHA1 também foi expressa na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) RIL nas condições testadas. Como é possível observar na figura 2-B, a proteína expressa apresentou perfil eletroforético com massa molecular esperada (~35 kDa), concentrando-se também na fração insolúvel do extrato bacteriano. Como esperado, esta proteína foi reconhecida por anticorpos direcionados para a cauda de histidina (presente em sua porção N-terminal) e para proteína NS1 DENGUE2 (Figura 2-B).

Uma vez que a proteína Δ CNS1-JHA1 concentrou-se também na fração insolúvel (CI), testamos o método de renaturação *in vitro* por diluição pulsada e o produto obtido foi submetido à purificação por cromatografia de afinidade ao níquel. Como pode ser observado na Figura 3-E, apenas um pico de eluição, com concentração reduzida de imidazol (37mM), foi recuperado, sendo o mesmo constituído de apenas contaminantes (Figura 3-F). Durante o processo de renaturação, a proteína de interesse precipitou, apresentando-se totalmente instável, fato que justifica a ausência de rendimento protéico nas condições testadas. Diante destes dados, outras estratégias de renaturação e obtenção da proteína Δ CNS1-JHA1 a partir da fração solúvel do extrato bacteriano foram testadas, sendo descritas mais adiante.

4.1.3 Otimização da expressão da proteína Δ CNS1-JHA1.

Em geral, um dos motivos que levam proteínas heterólogas expressas em linhagens de *E. coli* se concentrarem em CI é a intensa expressão protéica promovida por promotores fortes, como o promotor T7 presente em alguns vetores comerciais. A superexpressão protéica, em geral, não é acompanhada pelo dobramento intracelular correto (que, na maioria das vezes, necessita de chaperonas), tendo como consequência o acúmulo das mesmas em CI. Em vista disto, uma das estratégias utilizadas para minimizar este efeito foi promover a indução da expressão protéica em temperatura reduzida. Este método tem como vantagens a redução das taxas de transcrição e tradução, permitindo maior tempo para ação de chaperonas e redução das interações hidrofóbicas que contribuem para o dobramento incorreto das proteínas expressas (76,77). Assim, na tentativa de obter a proteína Δ CNS1-JHA1 na fração solúvel, a indução foi testada em temperatura mais baixa (18 °C) por um período de 18 h. Além disso, para a lise da cultura bacteriana foram testados também dois tampões (vide item 3.2).

Como pode ser observado na figura 4, mesmo após a indução da expressão protéica em temperatura reduzida, a proteína Δ CNS1-JHA1 se concentrou na fração insolúvel do extrato bacteriano. O emprego de diferentes tampões de lise também não influenciou na solubilidade da proteína, sendo que aparentemente sua expressão foi reduzida nas condições testadas, mesmo na fração insolúvel. Assim, à luz destes resultados, foi necessário aperfeiçoar a obtenção da proteína Δ CNS1-JHA1 a partir do extrato celular insolúvel, por técnicas de renaturação *in vitro*.

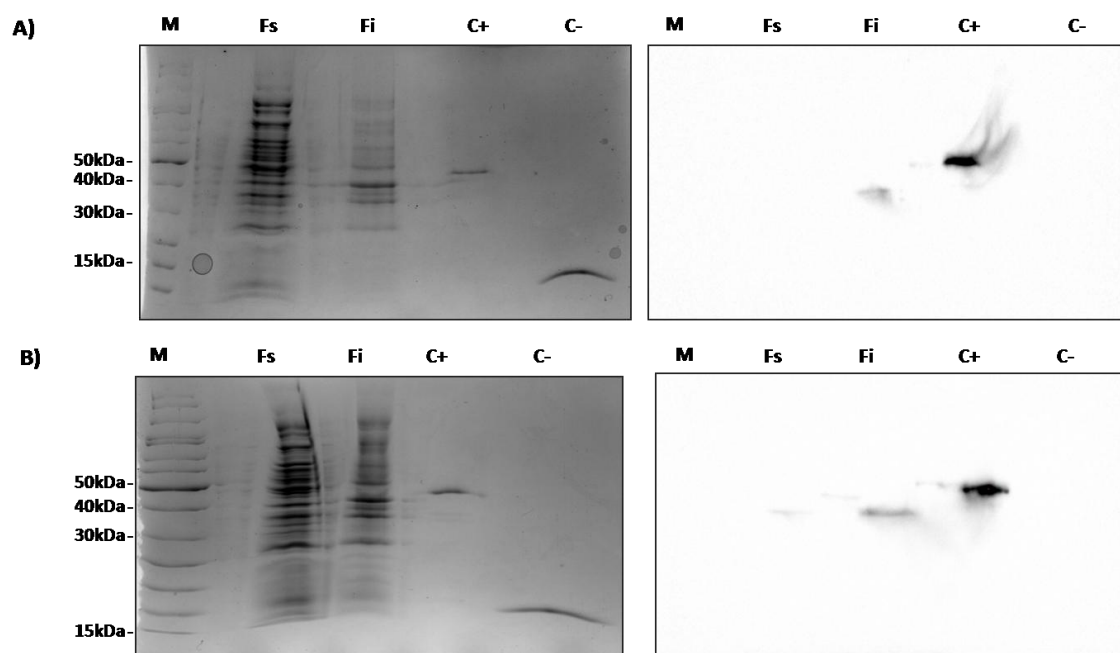


Figura 4 - Teste de expressão da proteína Δ CNS1-JHA1 após indução na temperatura de 18 °C. A expressão da proteína Δ CNS1 em linhagem de *E. coli* foi induzida a 18 °C por 18 h. A lise das células foi realizada em tampões de composição distinta. A) Amostras da cultura lisada com tampão I submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e ensaio de western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-NS1. B) Amostras da cultura lisada com tampão II. Descrição: canaletas M corresponde ao marcador de massa molecular; canaletas Fs, fração celular protéica solúvel após indução; canaletas Fi, fração celular protéica insolúvel após indução, solubilizada em tampão desnaturante contendo 8 M uréia; canaletas C+, 1 μ g da proteína NS1 DENV2; canaletas C-, 1 μ g da EDIII DENV2. Tampões: I (Fosfato de sódio 0,1 M; NaCl 0,5 M; 20% glicerol; 1 mM PMSF; pH 7,0); II (Tris 0,1 M; NaCl 0,25 M; 20% glicerol; 1 mM PMSF; pH 7,0).

4.1.4 Otimização da renaturação *in vitro* da proteína Δ CNS1-JHA1.

Na tentativa de obter a proteína Δ CNS1-JHA1 solubilizada em tampão desnaturante, várias técnicas de renaturação *in vitro* foram empregadas. A primeira delas consistiu na otimização do processo de renaturação por diluição pulsada empregando diferentes tampões não desnaturantes (sem uréia). Como descrito no item 4.1.2, a renaturação por diluição pulsada seguida de purificação por cromatografia de afinidade não teve sucesso. Sendo assim, a mesma técnica foi utilizada implementando-se tampões com diferentes composições na tentativa de melhorar a estabilidade da proteína Δ CNS1-JHA1 e, conseqüentemente, o rendimento. Entretanto, como é possível observar na figura 5, o emprego dos tampões I, II e III não melhorou o rendimento, sendo que a proteína apresentou-se instável, precipitando logo no início do processo.

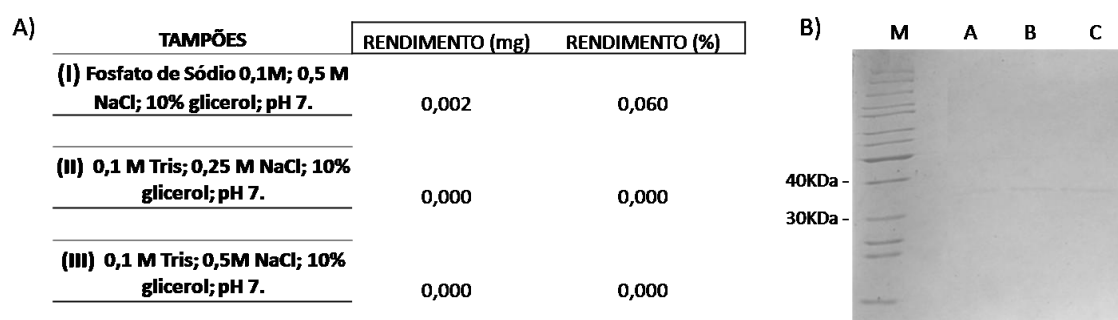


Figura 5 - Teste de renaturação da proteína Δ CNS1-JHA1 em diferentes tampões. Alíquotas de 3 mg de extrato total de proteína Δ CNS1-JHA1, solubilizada em tampão contendo uréia a 8M, foram utilizadas para realização de processo de renaturação *in vitro* por diluição pulsada com distintos tampões. A) Rendimentos protéicos ao final do processo de renaturação para cada tampão. B) Alíquotas da solução protéica após procedimento de renaturação, submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 15%). Amostras: canaleta M corresponde ao marcador de peso molecular; canaleta A – produto de renaturação utilizando tampão II; canaleta B – produto de refolding utilizando tampão III; canaleta C – produto de renaturação utilizando tampão I.

Embora muito utilizados, uma desvantagem ao adotar os métodos de renaturação por diluição consiste na retirada rápida do agente desnaturante associado à proteína, fato que muitas vezes leva à agregação protéica. Este fenômeno se deve ao fato, principalmente, do coeficiente de difusão do agente desnaturante ser maior que o da proteína (69). Sob este aspecto, uma alternativa ao método de diluição consiste na renaturação por retirada gradual do agente desnaturante, fato que torna o processo menos agressivo para a proteína. Em vista disso, a renaturação da proteína Δ CNS1-JHA1 foi testada de forma gradual em coluna cromatográfica de níquel, empregando gradiente

linear de tampão não desnaturante, seguido de eluição com tampão contendo imidazol. No entanto, mesmo com esta técnica, a proteína permaneceu instável e precipitou dentro da coluna, não sendo detectado rendimento significativo ao final do processo, como demonstrado no cromatograma apresentado na figura 6.

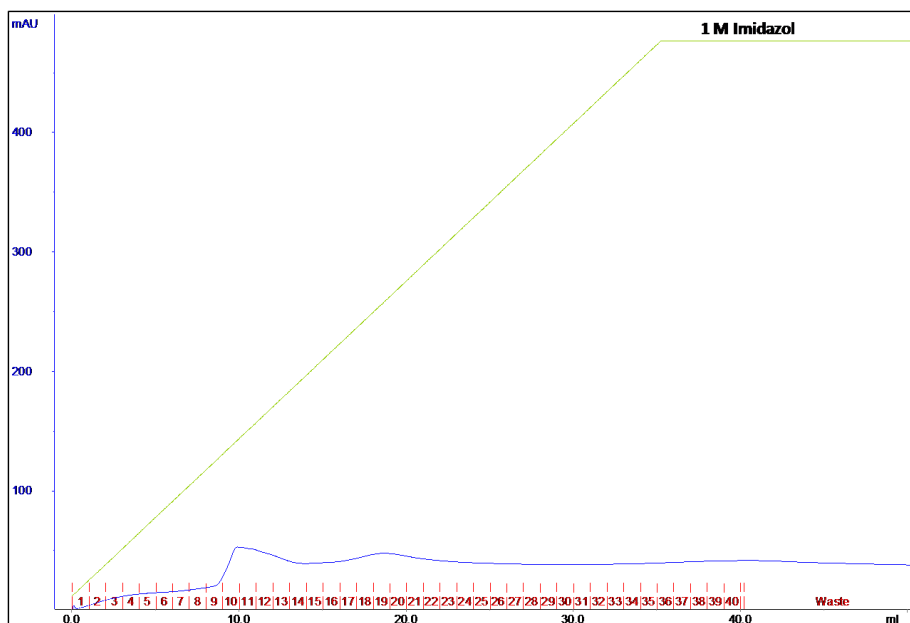


Figura 6 - Teste de renaturação da proteína Δ CNS1-JHA1 em gradiente decrescente de uréia. O extrato protéico insolúvel total contendo a proteína Δ CNS1-JHA1 foi utilizado para renaturação *in vitro* direto na coluna His-Trap HP com aplicação de gradiente linear de tampão de renaturação. Na figura tem-se apresentado o cromatograma da eluição, com gradiente linear de tampão contendo imidazol (0-1 M), da proteína Δ CNS1-JHA1 após renaturação.

Para tentar remover proteínas contaminantes de *E. coli* no procedimento de renaturação, a proteína Δ CNS1-JHA1 foi submetida ao processo de purificação por CAN de forma prévia, a partir do extrato protéico insolúvel, em condições desnaturantes. A purificação foi realizada com sucesso, sendo a proteína Δ CNS1-JHA1 eluída em pico único e com peso molecular esperado de ~35 kDa (figura 7). Uma vez purificada, a proteína Δ CNS1-JHA1 foi então submetida ao procedimento de renaturação gradual utilizando sistema de filtração tangencial. Esta técnica também permite a retirada gradual do agente desnaturante presente na amostra protéica e foi utilizada com sucesso para obtenção de outras proteínas insolúveis em nosso laboratório (64). Entretanto, de forma semelhante aos ensaios realizados anteriormente, a proteína comportou-se de forma instável, precipitando ao longo do processo, tendo rendimento final nulo (figura 8A). O método de diluição pulsada também foi testado utilizando esta

proteína purificada previamente em condições desnaturantes, entretanto, novamente houve precipitação sendo o rendimento final nulo (dados não mostrados).

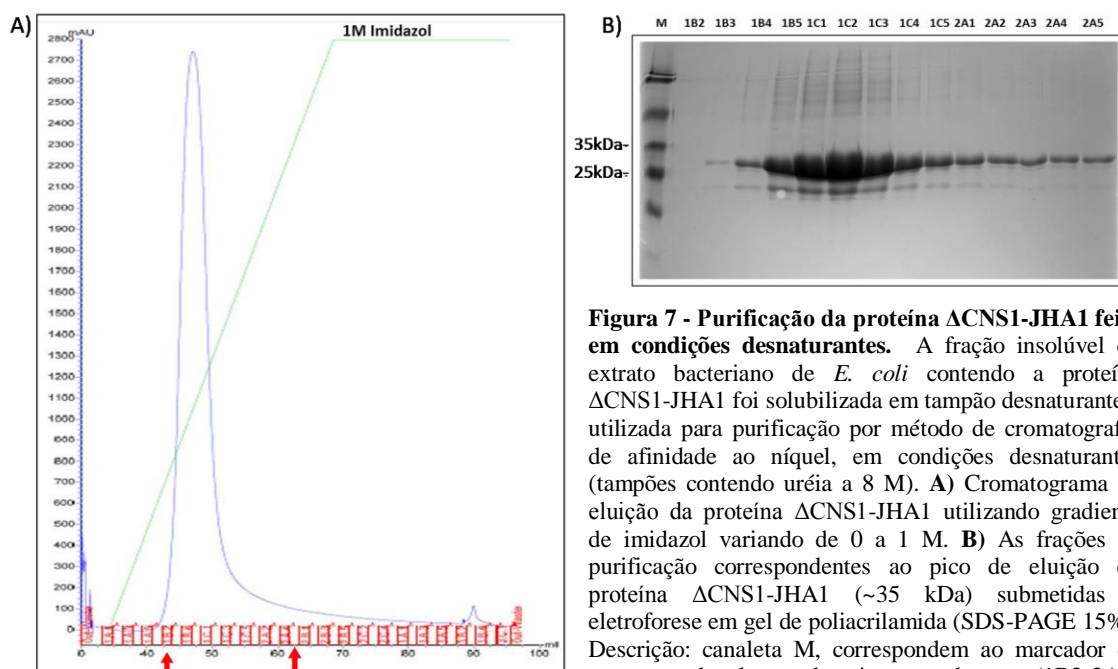


Figura 7 - Purificação da proteína Δ CNS1-JHA1 feita em condições desnaturantes. A fração insolúvel do extrato bacteriano de *E. coli* contendo a proteína Δ CNS1-JHA1 foi solubilizada em tampão desnaturante e utilizada para purificação por método de cromatografia de afinidade ao níquel, em condições desnaturantes (tampões contendo uréia a 8 M). **A)** Cromatograma de eluição da proteína Δ CNS1-JHA1 utilizando gradiente de imidazol variando de 0 a 1 M. **B)** As frações da purificação correspondentes ao pico de eluição da proteína Δ CNS1-JHA1 (~35 kDa) submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). Descrição: canaleta M, correspondem ao marcador de peso molecular; demais canaletas (1B2-2A5) correspondem as frações do pico de eluição da proteína Δ CNS1-JHA1, destacadas no cromatograma da figura A (setas em vermelho).

Por último, ainda na tentativa de obter a proteína Δ CNS1-JHA1 de forma solúvel, a técnica de eletroeluição protéica também foi testada. Para tal, a referida proteína purificada em condições desnaturantes foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo as bandas correspondentes à proteína excisadas (Figura 8B) e utilizadas em procedimento de eletroeluição. Esta técnica também não surtiu efeito, não sendo possível recuperar a proteína de interesse ao final do processo (Figura 8C). Assim, tomando em conjunto esses dados, foi possível concluir que a proteína Δ CNS1-JHA1 mostra-se altamente instável quando submetida aos principais procedimentos de renaturação *in vitro*.

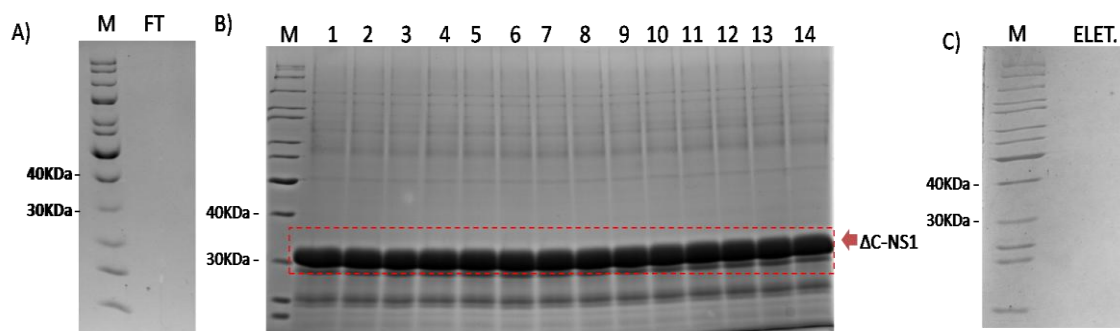


Figura 8 - Tentativa de obtenção da proteína Δ CNS1-JHA1 de forma solúvel pelas técnicas de filtração tangencial e eletroeluição. A) Alíquota da proteína Δ CNS1-JHA1 submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) após procedimento de renaturação, por sistema de filtração tangencial. B) Foto do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) contendo alíquotas da proteína Δ CNS1-JHA1 purificada (~35 kDa), sendo indicada pelo retângulo vermelho e tracejado a região excisada e utilizada no ensaio de eletroeluição. C) Alíquota do produto da eletroeluição submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). Descrição: canaletas M correspondem ao marcador de peso molecular; canaleta FT, corresponde à alíquota do produto de renaturação por filtração tangencial; canaletas 1-14, correspondem a fração da proteína Δ CNS1-JHA1 purificada e utilizada na eletroeluição; canaleta ELET., corresponde ao produto de eletroeluição da proteína Δ CNS1-JHA1.

4.1.5 Efeito da adição de agentes químicos diversos na solubilização da proteína Δ CNS1-JHA1.

A renaturação *in vitro* de proteínas insolúveis é influenciada por diversos fatores, dentre os quais o método de remoção do agente desnaturante e a composição do tampão. Uma alternativa utilizada para reduzir a agregação de proteínas e aumentar sua estabilidade durante o procedimento de renaturação consistiu em utilizar pequenas moléculas químicas junto ao tampão de renaturação (69). Diversos aditivos já foram descritos para esta finalidade, sendo que aminoácidos como a L-arginina, e carboidratos simples ou complexos, como a β -ciclodextrina, apresentaram propriedades promissoras de inibição da agregação protéica *in vitro* (65,78–80). Assim, na tentativa de reduzir a agregação da proteína Δ CNS1-JHA1 e aumentar sua estabilidade durante procedimento de renaturação, os aditivos L-arginina, D-glicose e β -ciclodextrina foram incorporados no tampão de renaturação em diferentes concentrações.

Para este teste, o extrato insolúvel da proteína Δ CNS1-JHA1 foi submetido ao procedimento de renaturação por diluição direta em tampão não desnaturante (na presença ou ausência dos aditivos), sendo monitorada a taxa de agregação e rendimento protéico. Como pode ser observado na figura 9 (A e B), quando a renaturação foi

realizada na presença de L-arginina a 0,5 M a agregação protéica foi reduzida em até 10%. Este fenômeno ocorreu de maneira dose e tempo dependente, no qual foi observado redução da agregação protéica. Após 30 min., o percentual de transmitância a 600nm se manteve o mesmo até o fim do procedimento de renaturação nas duas concentrações de L-arginina testadas. A utilização dos aditivos D-glicose e β -ciclodextrina não reduziu a agregação (Figura 9, C-F), sendo que a adição de β -ciclodextrina na concentração de 40 mM atuou de forma negativa promovendo a precipitação total da proteína.

Embora os aditivos químicos possam favorecer a estabilidade de proteínas e inibir sua agregação, essas propriedades dependem da concentração do aditivo utilizada e, principalmente, da solubilidade da proteína em questão. Como foi possível observar, a proteína Δ CNS1-JHA1 é altamente instável, mesmo na presença de aditivos clássicos como a L-arginina, sendo a inibição da agregação de 10% observada muito inferior ao encontrado em outros estudos (65,80).

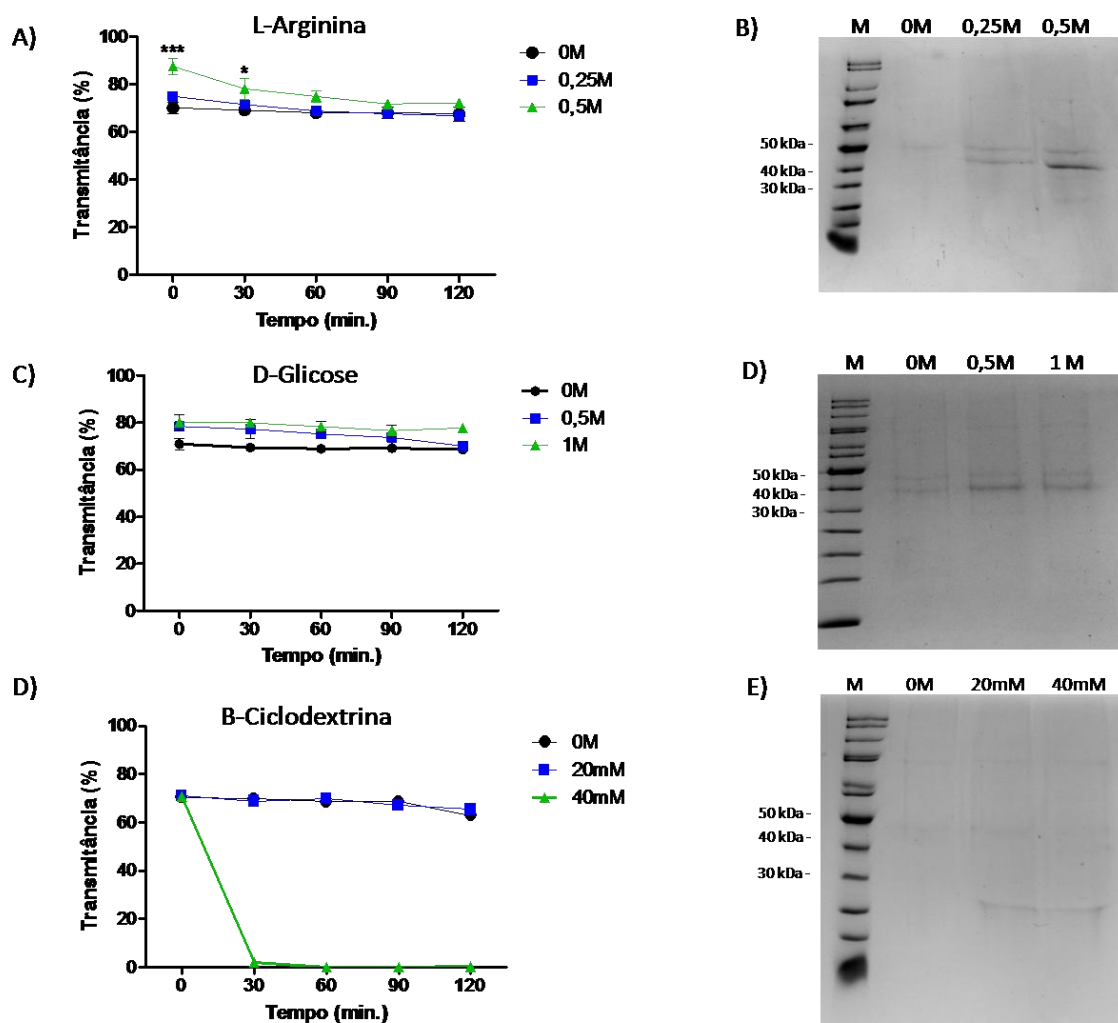


Figura 9 - Renaturação *in vitro* da proteína Δ CNS1-JHA1 na presença de diferentes concentrações de L-arginina, D-glicose e β -ciclodextrina. CI da proteína Δ CNS1-JHA1 expressa em *E. coli* foram solubilizados em tampão desnaturante e utilizados nos testes de renaturação *in vitro* por diluição direta em tampões contendo os aditivos em teste. A intensidade de agregação protéica, medida por espectrofotometria, foi acompanhada ao longo do tempo nas amostras diluídas nos tampões contendo L-arginina (A), D-glicose (C) ou β -ciclodextrina (E). Alíquotas do produto final de renaturação foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 15%), sendo apresentadas em B (L-arginina), D (D-glicose) e F (β -ciclodextrina).

4.1.6 Utilização da técnica de renaturação de proteínas por pressão hidrostática.

Diante das dificuldades encontradas na obtenção da proteína Δ CNS1-JHA1 utilizando métodos de renaturação convencionais partimos para uma estratégia alternativa. Sob este aspecto, estudos têm demonstrado que a aplicação de altas pressões hidrostáticas na desagregação e renaturação protéica podem apresentar bom rendimento, sendo acompanhado da manutenção da conformação nativa e atividade biológica das proteínas submetidas a tal processo (81–83). A aplicação de valores de pressão de até 5 kbar permite que agregados protéicos sejam desfeitos e que as proteínas assumam sua conformação nativa (84–86).

Como base nestes achados, a técnica de renaturação de proteínas agregadas por alta pressão hidrostática foi testada para a proteína Δ CNS1-JHA1. Para isso, os CI contendo a referida proteína foram lavados e submetidos a tratamento com alta pressão, sendo o produto resultante utilizado para purificação por cromatografia de afinidade ao níquel. Como pode ser observado na figura 10 (A e B), a proteína Δ CNS1-JHA1 foi recuperada de forma solúvel, sendo eluída em um pico único (com 400 mM Imidazol) durante a purificação, apresentando peso molecular característico de ~35 kDa. Entretanto, embora solúvel inicialmente, em análises posteriores a proteína se apresentou instável, precipitando rapidamente durante as diálises para retirada de imidazol após a purificação, fato que inviabilizou sua utilização em ensaios de imunização.

A técnica de solubilização por pressão foi também aplicada à proteína NS1-JHA1. De forma semelhante, foi possível a recuperação desta proteína em forma solúvel a partir de corpúsculos de inclusão (Figura 10, C e D). Além disso, quando a proteína NS1-JHA1 foi submetida à eletroforese em gel não desnaturante, foi possível observar uma banda na altura de sua forma dimérica (~86 kDa), sendo esta um indicativo que o método de renaturação preservou a estrutura da proteína (Figura 10-E). Estes dados estão de acordo com achados anteriores, no qual foi possível recuperar uma forma recombinante da subunidade B pentamérica da toxina colérica (CTB) a partir de CI, preservando sua estrutura quaternária (87).

Um dos fatores que auxiliaram na obtenção das proteínas Δ CNS1-JHA1 e NS1-JHA1 de forma solúvel, após tratamento por pressão, foi a presença de L-arginina (0,5 M) e cloridrato de guanidina (1M) no tampão de renaturação. Na ausência de tais

componentes não foi possível obter essas proteínas em quantidade considerável (dados não mostrados). Este achado corroborou os dados encontrados para proteína Δ CNS1-JHA1, para a qual a presença de L-arginina reduziu sua agregação durante procedimento de renaturação (item 4.1.5). Além disso, o impacto da presença de aditivos como aminoácidos, carboidratos (incluindo glicose e sacarose), glicerol, β -mercaptoetanol, dentre outros, foram descritos anteriormente, sendo importantes na estabilidade e inibição da agregação protéica durante a renaturação sob pressão, sobretudo, na inibição ou quebra de interações intermoleculares inespecíficas (especialmente pontes dissulfeto) (81,87).

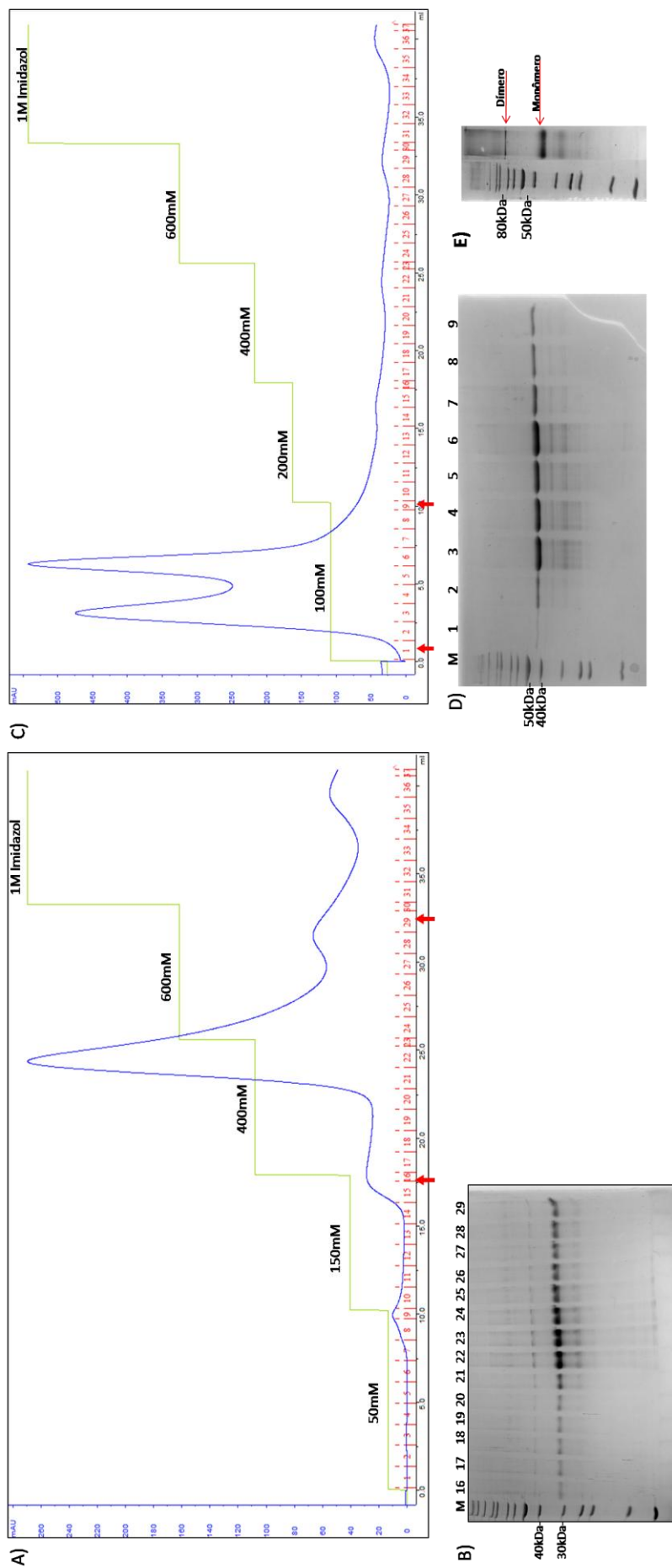


Figura 10 - Purificação das proteínas Δ CNS1-JHA1 e NS1-JHA1 após renaturação utilizando técnica de alta pressão hidrostática. CI das proteínas Δ CNS1-JHA1 e NS1-JHA1 expressas em *E. coli* foram obtidos após lise celular e submetidos à renaturação sob condições de alta pressão hidrostática por 16 h. A e C) Cromatogramas de eluição das proteínas Δ CNS1-JHA1 e NS1, respectivamente, utilizando gradiente de imidazol variando de 0 a 1 M. B e D) Frações da purificação das proteínas Δ CNS1-JHA1 (~35 kDa) e NS1 (~43 kDa), respectivamente, eluídas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). E) Amostra da proteína NS1 purificada e submetida à eletroforese em condições não desnaturante para verificação da formação de dímeros.

4.1.7 Análise computacional do perfil de hidrofobicidade da proteína NS1-JHA1.

Na tentativa de melhor entender os possíveis motivos que expliquem o comportamento da proteína Δ CNS1-JHA1, uma análise computacional foi realizada com objetivo de se determinar o perfil de hidrofobicidade da proteína NS1-JHA1 compreendendo sua sequência completa (a.a 1-352). Conforme ilustrado na figura 11, a região da proteína NS1-JHA1 que compreende a sequência de aminoácidos 271 a 352 corresponde a uma porção de caráter hidrofílico sendo, provavelmente, importante para manutenção da estabilidade da proteína quando em solução. Como na proteína Δ CNS1-JHA1 esta região está ausente, acreditamos que este fato explique, pelo menos em parte, a perda da estabilidade desta proteína, fato que resultou em sucessivas falhas na tentativa de obtenção da mesma em sua forma recombinante isolada.

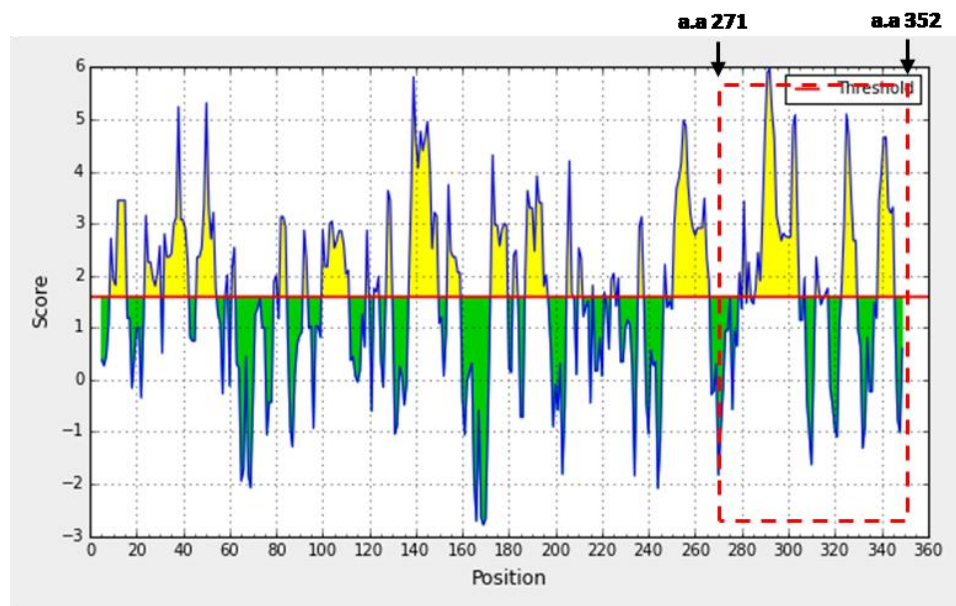


Figura 11 - Perfil de hidrofobicidade da proteína NS1-JHA1. A sequência de aminoácidos da proteína NS1-JHA1 foi utilizada para predição de hidrofobicidade de Parker por análise computacional. As porções amarelas do gráfico (acima da linha de corte) indicam regiões hidrofílicas, sendo que as porções esverdeadas (abaixo da linha de corte) indicam regiões hidrofóbicas.

4.1.8 Clonagem e expressão das proteínas NS1 e Δ CNS1 (cepa JHA1) fusionadas geneticamente ao anticorpo anti-DEC205.

Diante das dificuldades encontradas na obtenção da proteína Δ CNS1-JHA1, a última alternativa desenhada foi a de fusionar a mesma com outras proteínas na tentativa de torná-la mais estável. Em trabalho anterior realizado em colaboração com nosso grupo de pesquisa, a proteína NS1 DENV2 cepa NGC, quando fusionada ao anticorpo monoclonal anti-DEC205 e

utilizada como antígeno vacinal, promoveu expressivo aumento das respostas imunológicas humorais e celulares antígeno-específica, sendo essas associadas aos maiores níveis de proteção dos animais imunizados frente ao desafio com vírus DENV2 cepa NGC (44). Desta forma, decidimos fusionar as proteínas NS1 e Δ C-NS1 (cepa JHA1) ao anticorpo direcionado contra o receptor DEC205 presente em células dendríticas murinas. Além da tentativa de melhorar a estabilidade da proteína Δ CNS1-JHA1, esta estratégia propiciaria avaliar diferenças na indução de respostas imunológicas utilizando estes dois antígenos, quando administrados pela via i.d. (direcionados para as populações de células dendríticas DEC205⁺), e, sobretudo, o impacto na indução de anticorpos anti-NS1.

Assim, as regiões do cDNA obtido do DENV2 (cepa JHA1) codificadoras para as proteínas NS1 e Δ C-NS1 foram amplificadas e clonadas no vetor pJET (Figura 12-A). As sequências (NS1: ~1056 pb e Δ CNS1-JHA1: ~810 pb) foram, em seguida, subclonadas em fusão com a sequência codificadora para a região carboxi-terminal da cadeia pesada do anticorpo anti-DEC205 murino (Figura 12-B). O rastreamento dos plasmídeos recombinantes foi feito por análise de restrição (utilizando as enzimas XhoI e NotI) (Figura 12, A e B) e a confirmação da obtenção dos plasmídeos pDEC-NS1-JHA1 e pDEC- Δ CNS1-JHA1 foi realizada por sequenciamento, sendo a leitura realizada com auxílio do software SeqMan (LaserGene package, DNASTAR).

De posse dos plasmídeos construídos, os mesmos foram utilizados em conjunto a outro plasmídeo codificando a cadeia leve do anticorpo anti-DEC205 na transfecção de células HEK-293T para análise da expressão e purificação de acordo ao descrito por Henriques et al. (2013). A expressão e integridade dos anticorpos recombinantes construídos foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE12,5%) e ensaio de *western blot* utilizando soro NS1-específico. Como é possível observar na Figura 12-C, apenas os anticorpos α -DEC (controle) e α -DEC-NS1-JHA1 foram expressos, não sendo possível detectar a expressão do α -DEC- Δ CNS1-JHA1. Os mAbs obtidos apresentaram perfil eletroforético esperado, com cadeia leve contendo ~25 kDa e a cadeia pesada ~95 kDa (~50 kDa para o anticorpo controle). Além disso, a presença da proteína NS1 fusionada à cadeia pesada do anticorpo α -DEC foi confirmada por reconhecimento específico utilizando soro α -NS1 (Figura 12-C). Estes resultados demonstram que a proteína Δ CNS1-JHA1 não pôde ser obtida mesmo quando fusionada ao anticorpo anti-DEC205.

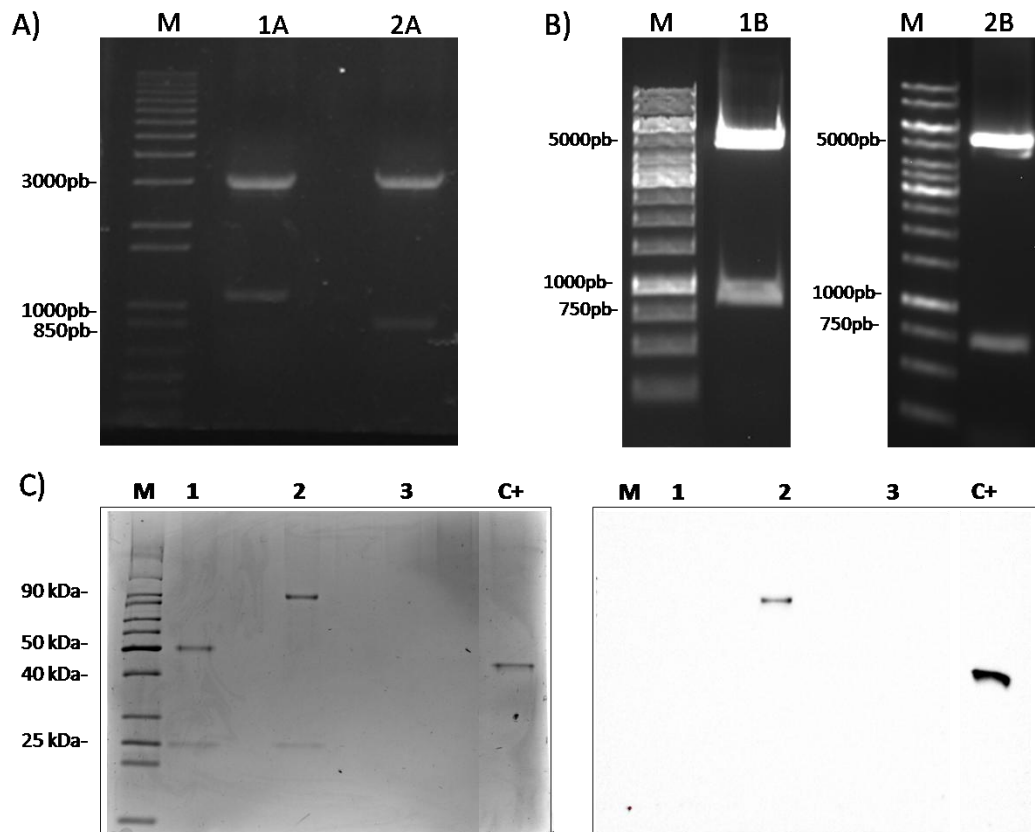


Figura 12 - Clonagem e expressão das proteínas NS1 e Δ CNS1 cepa JHA1 fusionadas geneticamente ao anticorpo monoclonal anti-DEC205. O cDNA das sequências codificadoras para as proteínas NS1 e Δ C-NS1 foram obtidas e clonadas junto à região C-terminal da cadeia pesada do anticorpo anti-DEC205. A) Análise de restrição, utilizando as enzimas XhoI e NotI, dos plasmídeos resultantes da clonagem das sequências NS1 e Δ C-NS1 no vetor de clonagem pJET. B) Análise de restrição, com as enzimas XhoI e NotI, dos plasmídeos resultantes da subclonagem das sequências NS1 e Δ C-NS1 em vetor de expressão contendo a sequência da cadeia pesada do anticorpo anti-DEC205. C) Análise da expressão e integridade dos anticorpos α -DEC-NS1-JHA1 e α -DEC- Δ CNS1-JHA1, por eletroforese em gel de poliácridamida e western blot, após serem produzidos em células (HEK) 293T transfectadas com os plasmídeos construídos. Amostras: M, marcador de peso molecular; 1A e 1B, correspondem, respectivamente, a digestão dos plasmídeos pJET-NS1 e pJET- Δ CNS1 com a enzimas XhoI e NotI; 2A e 2B, correspondem, respectivamente, à digestão dos plasmídeos pDEC-NS1-JHA1 e pDEC- Δ CNS1-JHA1 com a enzimas XhoI e NotI; 1, anticorpo α -DEC (controle) purificado; 2, anticorpo α -DEC-NS1-JHA1 purificado; 3, anticorpo α -DEC- Δ CNS1-JHA1 purificado. C+, 500 ng da proteína recombinante NS1JHA DENGUE2 purificada.

4.2 BLOCO 2 - Direcionamento da proteína NS1 DENV2 para células dendríticas após administração pela via i.d.

Diante da falta de sucesso na obtenção da proteína Δ CNS1-JHA1 optamos por não dar continuidade aos experimentos previstos. Desta forma, os ensaios de imunização foram realizados com a proteína NS1 DENV2 (cepa NGC) em sua forma recombinante isolada ou

fusionada a anticorpos específicos para receptores de células dendríticas. A mudança para a proteína NS1 do DENV2 cepa NGC (um clone viral obtido a partir de isolado clínico adaptado para camundongos, o qual é utilizado para ensaios de desafio murino para vacinas contra o vírus da dengue) (41,44,88,89) teve por base a disponibilidade de construções contendo a mesma fusionada com dois anticorpos distintos (α -DEC205 e α -DCIR2) (44), ferramentas que permitiram analisar o impacto do direcionamento deste antígeno para duas populações de DC's explorando a via i.d. Além disso, tínhamos disponível em nosso laboratório a cepa DENV2 NGC para realização dos ensaios de desafio.

4.2.1 Expressão, purificação e análise dos anticorpos quiméricos e da proteína NS1 DENV2 NGC.

Os anticorpos monoclonais controles (α DEC e α DCIR2) e quiméricos (α DEC-NS1 e α DCIR2-NS1) foram produzidos e purificados a partir de células HEK293T tranfectadas como descrito em Materiais e Métodos. Para avaliação da integridade dos anticorpos purificados alíquotas de 1 μ g foram desnaturadas (aquecimento a 100 °C/ 10 min.) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) (Figura 13-A). Como é possível observar, os anticorpos α DEC e α DCIR2 apresentaram perfil eletroforético característico, sendo evidenciado duas bandas (~25 kDa e ~50 kDa), compatíveis, respectivamente, ao esperado para as cadeias leve e pesada do anticorpo. De forma semelhante os anticorpos quiméricos apresentaram duas bandas características, sendo que para a cadeia pesada a maior massa molecular observada (~95 kDa) é resultante de sua fusão com a proteína NS1 de dengue. A proteína recombinante NS1 DENV2 (cepa NGC), aqui denominada rec. NS1, foi também expressa e purificada de acordo ao descrito previamente por nosso grupo e apresentou banda de ~47 kDa (Figura 13-A) (61).

Os anticorpos e a proteína rec. NS1 foram também confirmados por ensaio de western blot empregando anticorpos anti-NS1 e anti-IgG de camundongo. Como esperado somente a cadeia pesada dos anticorpos quiméricos (que contém a proteína NS1 fusionada) e a proteína rec. NS1 foram reagentes quando incubados com anticorpo monoclonal anti-NS1 (figura 13-B). Quando os antígenos citados foram incubados com anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo, ambas as cadeias (leve e pesada) dos anticorpos foram marcadas, sendo que a proteína rec. NS1 não foi reconhecida (Figura 13-C). Estes resultados confirmam que os anticorpos produzidos preservam sua estrutura, sendo que os anticorpos quiméricos

apresentam a proteína NS1 com antigenicidade preservada, assim como encontrado para a rec. NS1 em sua forma isolada.

A manutenção da funcionalidade dos anticorpos controles e quiméricos foi analisada quanto à capacidade de reconhecimento específico dos receptores DEC205 ou DCIR2 expressos em células CHO. Como é possível observar na figura 13 (D e E) todos os anticorpos se ligaram especificamente aos seus respectivos receptores, DEC205 ou DCIR2, em todas as concentrações testadas, sem observação de ligação cruzada entre os mesmos. Estes dados juntos demonstram que tanto os anticorpos quanto à proteína rec. NS1 apresentavam-se adequados para aplicação em ensaios de imunização.

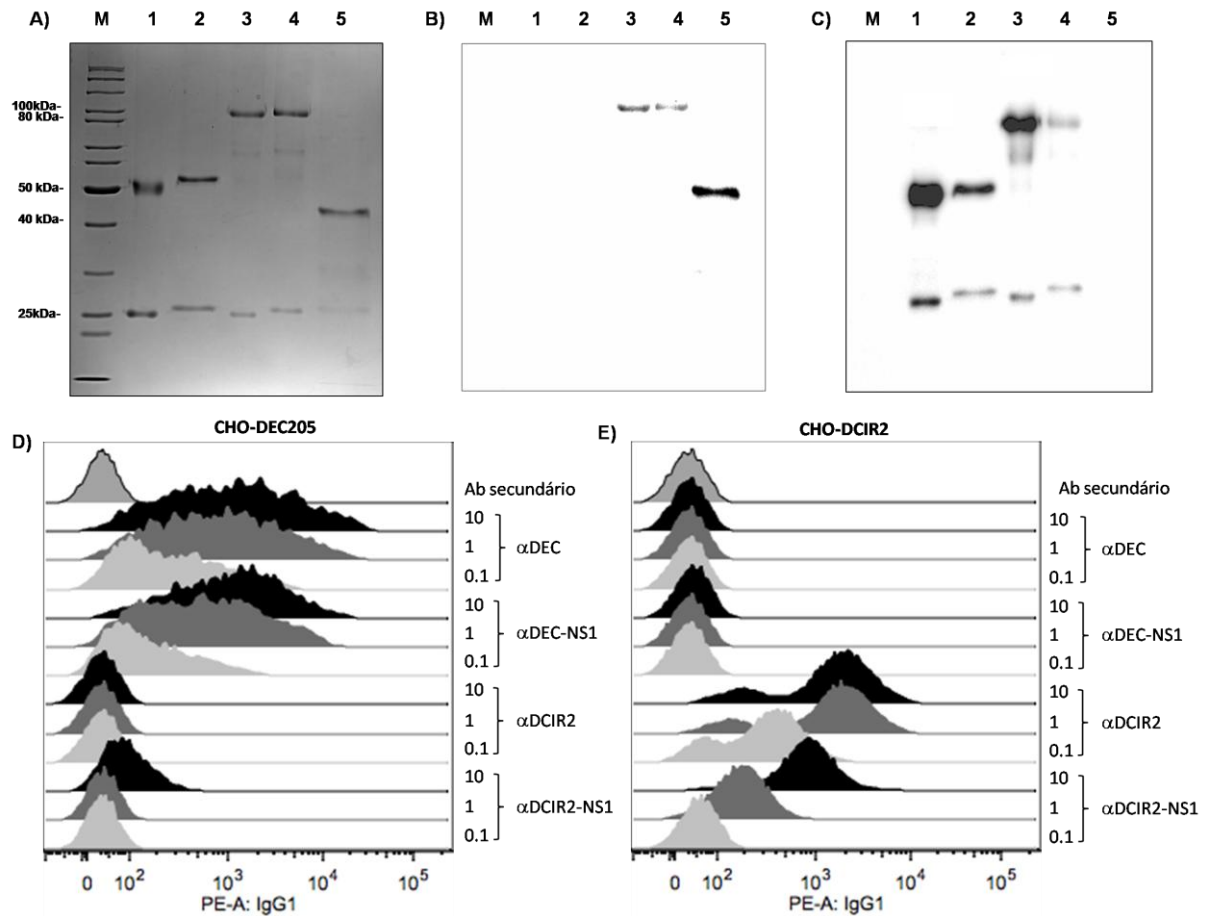


Figura 13 - Caracterização dos antígenos utilizados nos ensaios de imunização. Os anticorpos controles (α DEC e α DCIR2), quiméricos (α DEC-NS1 e α DCIR2-NS1) e a proteína NS1 (cepa NGC) recombinante foram produzidos de acordo aos itens 3.1 e 3.11. Alíquotas de 1 μ g dos antígenos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) em condições desnaturantes (A) e ensaios de western blot empregando anticorpo monoclonal anti-NS1 (B) e anti-IgG de camundongo (C). Os anticorpos controles e quiméricos também foram analisados por citometria de fluxo (nas concentrações de 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml e 10 μ g/ml) quanto a sua capacidade de se ligarem especificamente aos receptores DEC205 (D) ou DCIR2 (E) expressos em células CHO. Descrição: canaleta 1, α DEC; canaleta 2, α DCIR2; canaleta 3, α DEC-NS1; canaleta 4, α DCIR2-NS1; canaleta 5, NS1 recombinante.

4.2.2 Ensaio de imunização e análise quantitativa da resposta humoral NS1-específica desencadeada.

Após obtenção dos antígenos purificados iniciamos os experimentos de imunização utilizando camundongos BALB/c. O regime vacinal consistiu na administração de 2 doses das formulações vacinais, com intervalo de 15 dias entre as mesmas, utilizando as vias de inoculação i.d. ou i.p. (Figura 14-A). Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos (α DEC, α DCIR2, α DEC-NS1, α DCIR2-NS1 e rec. NS1) sendo que os mesmos

receberam 2,5 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de anticorpo ou 1 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de NS1 DENV2 (NGC), todos em associação com 50 μg do adjuvante Poly (I:C).

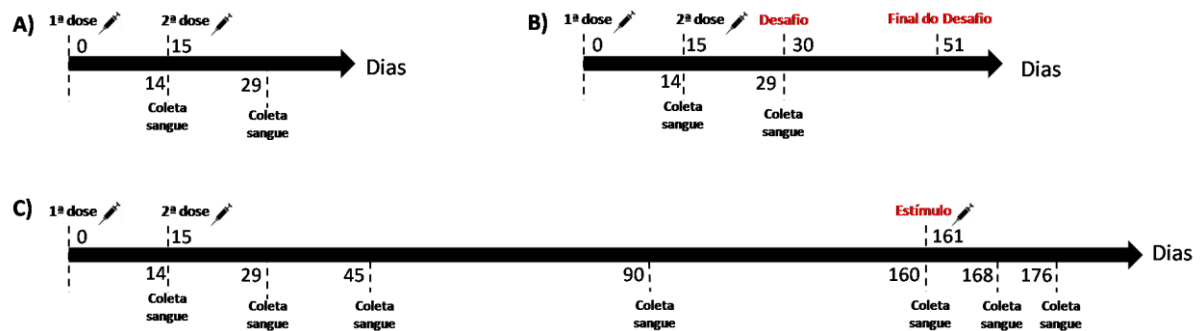


Figura 14 - Regimes vacinais empregados. O regime vacinal consistiu na administração de 2 doses das formulações vacinais com intervalo de 15 dias entre as mesmas através das vias i.d ou i.p. (A). A capacidade protetora conferida pelas formulações vacinais foi analisada mediante desafio dos animais imunizados por via i.c com DENV2 cepa NGC, sendo estes acompanhados por 21 dias quanto à ocorrência de morbidade e mortalidade (B). Os animais imunizados e não desafiados foram também monitorados por até 160 dias com objetivo de avaliar a longevidade da resposta humoral induzida. Os animais receberam re-estímulo com a proteína rec. NS1 (dia 161) e foram monitorados por mais 15 dias para avaliação de indução de memória imunológica (C). Coletas de sangue foram realizadas nos dias indicados na figura.

Como é possível observar na figura 15, os grupos vacinais desenvolveram forte resposta humoral evidenciada pela detecção de elevados títulos de anticorpos IgG NS1-específicos, não sendo detectadas respostas para os grupos controles (αDEC e αDCIR2), conforme o esperado. A dosagem de anticorpos IgG em amostras de soros obtidas 14 dias após a segunda dose vacinal demonstra que não houve diferença significativa nos títulos de anticorpos dos grupos que receberam direcionamento da proteína NS1 para células dendríticas ($\alpha\text{DEC-NS1}$ e $\alpha\text{DCIR2-NS1}$), sendo observada diferença estatística somente entre os grupos $\alpha\text{DEC-NS1}$ e o que recebeu apenas a proteína NS1 recombinante. Além disso, não houve diferença entre as duas vias de administração utilizadas sobre a magnitude da resposta de anticorpos IgG antígeno específicos.

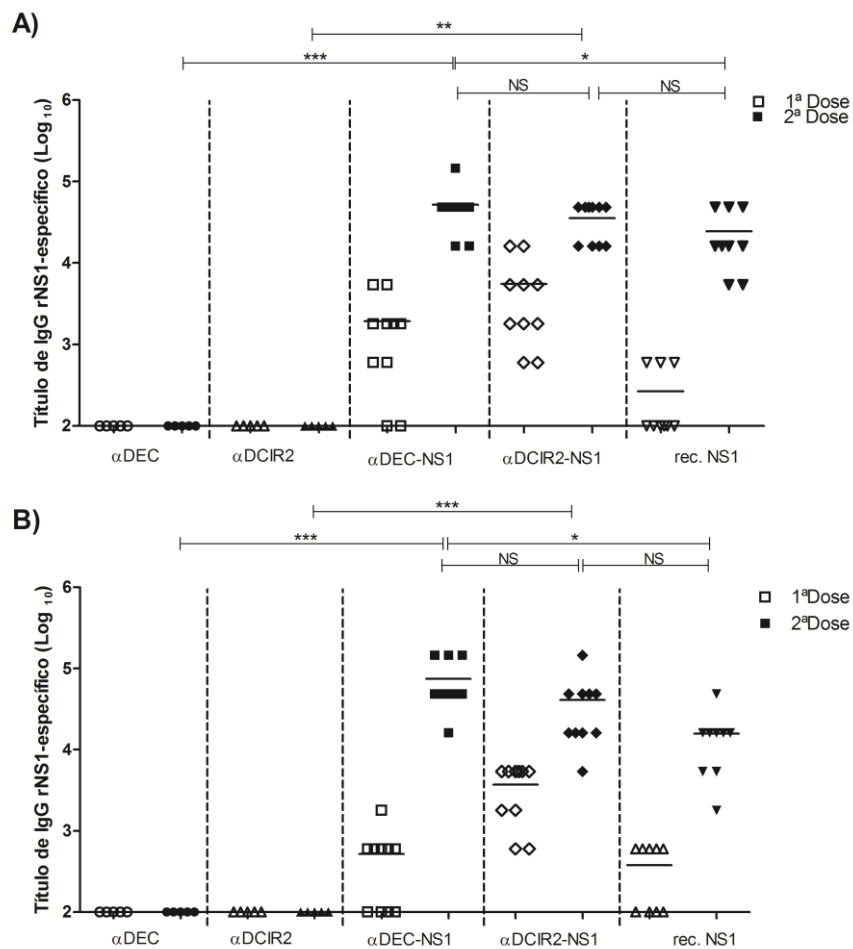


Figura 15 - Determinação da resposta de IgG NS1-específica. Para avaliação da resposta humoral sistêmica induzida pelo protocolo vacinal os títulos de anticorpos IgG NS1-específicos foram medidos por ELISA utilizando amostras de soro obtidas 14 dias após a administração de cada dose pelas vias i.d. (A) ou intraperitoneal (B). Valores médios (linha preta) e individuais (símbolos) de título (Log₁₀) de IgG sérico NS1 reagentes são resultantes de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.2.3 Determinação do perfil de reconhecimento de epítomos conformacionais e lineares pelos anticorpos gerados

Após analisar a magnitude da resposta humoral desencadeada, a próxima etapa do trabalho teve por objetivo caracterizar qualitativamente a resposta imunológica gerada nos animais. Desta forma, para verificar se os anticorpos desenvolvidos após estímulo das diferentes formulações vacinais reconhecem preferencialmente epítomos conformacionais ou lineares, a reatividade dos soros dos animais imunizados foi testada em ensaios de ELISA empregando a proteína Rec. NS1 intacta ou previamente submetida ao procedimento de desnaturação por calor. Como é possível observar na figura 16, todos os soros testados

apresentaram maior reatividade contra a proteína em sua forma intacta, demonstrando, portanto, que a maior parte da resposta de anticorpos desenvolvida é direcionada a epítomos conformacionais termolábeis. De forma semelhante ao encontrado anteriormente, não houve diferenças nas respostas induzidas por animais imunizados pelas vias i.d. ou i.p. em relação ao perfil de reconhecimento pelos soros hiperimunes NS1-específicos.

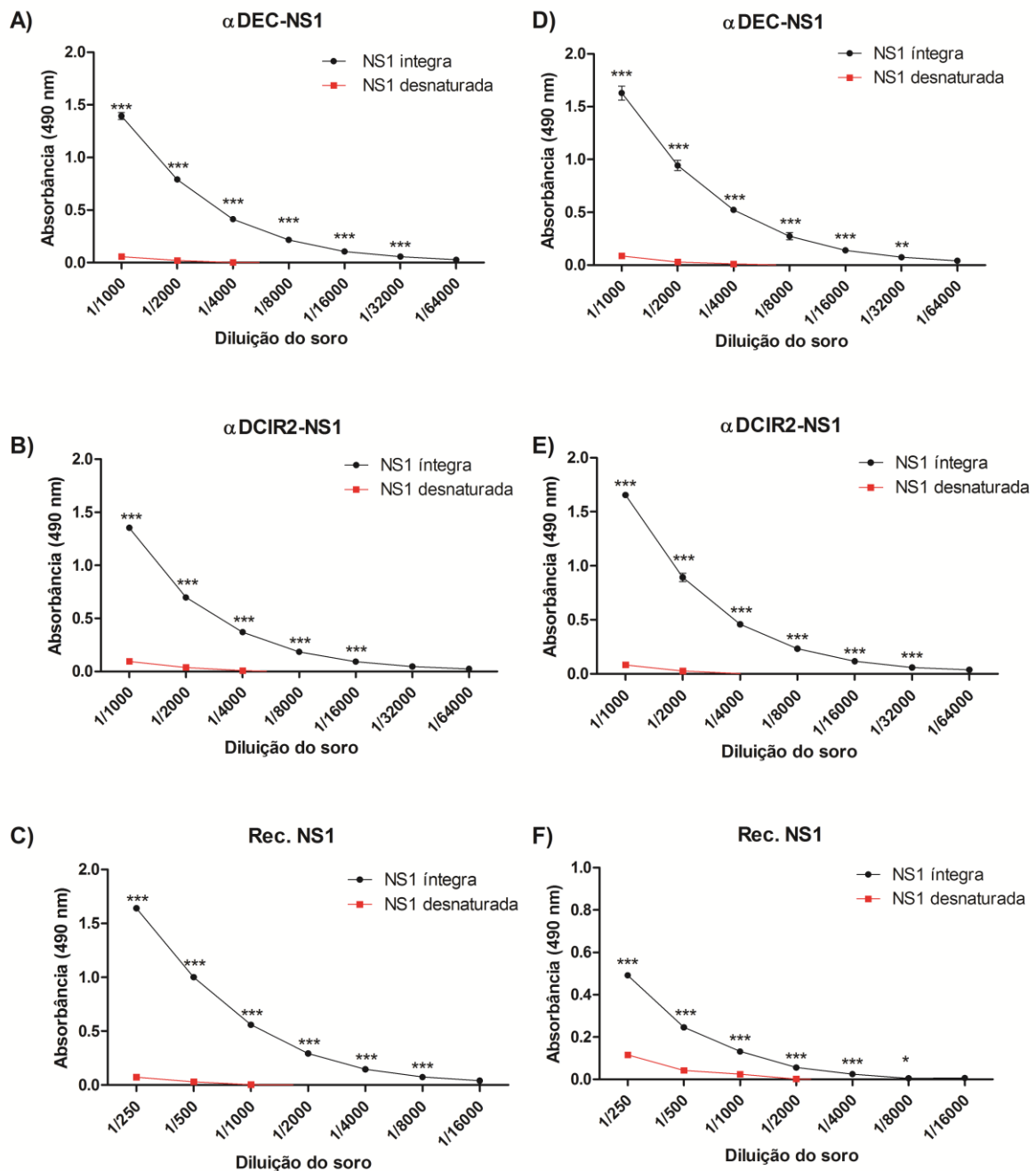


Figura 16 - Avaliação da capacidade dos anticorpos NS1-específicos se ligarem preferencialmente a epítomos conformacionais. Os anticorpos IgG NS1-específicos presentes nos soros dos animais imunizados pelas vias i.d. (A, B e C) e intraperitoneal (D, E e F) foram testados por ELISA quanto a sua reatividade com a proteína NS1 recombinante submetida ou não previamente à desnaturação (aquecimento a 100 °C por 10 min. seguido de choque térmico à 0 °C). As amostras utilizadas são misturas de soros de camundongos BALB/c imunizados (n=5/grupo) obtidas 14 dias após a administração da segunda dose prevista no protocolo vacinal. Os resultados expressos são representativos de dois experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.2.4 Determinação da afinidade dos anticorpos gerados frente ao antígeno NS1.

Nesta etapa do trabalho avaliamos a influência do direcionamento da proteína NS1 para células dendríticas e a utilização de diferentes vias de inoculação na afinidade dos anticorpos antígeno-específicos gerados. A afinidade dos anticorpos foi determinada por ELISA empregando etapa de dissociação com diferentes concentrações de tiocianato de amônio (Figura 17). Como resultado observou-se que as curvas de dissociação da interação antígeno-anticorpo apresentaram-se semelhantes entre os grupos de imunização quando utilizada a via i.d. de imunização (Figura 17-A). Quando analisado o perfil dos grupos imunizados pela via i.p. foi possível observar um decaimento mais acentuado do percentual de ligação de anticorpos do grupo que recebeu somente a proteína NS1 recombinante (Figura 17-B). Ao determinar-se a concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% da ligação do anticorpo ao antígeno (Figura 17-C), foi possível observar que o grupo sem direcionamento (rec. NS1), de fato, foi o que apresentou menor afinidade quando empregada ambas as vias de imunização, entretanto, este efeito foi mais pronunciado quando utilizada a via i.p. ($p < 0,01$). Sob este último parâmetro, os grupos α DEC-NS1 e α DCIR2-NS1 apresentaram perfil de anticorpos com maior afinidade ao antígeno, não sendo detectada diferença estatística entre estes, mesmo quando utilizadas distintas vias de administração. Essas observações demonstram que as duas estratégias e vias de inoculação mostraram-se promissoras no direcionamento da proteína NS1 de DENV para células dendríticas, com conseqüente melhora da qualidade da resposta humoral específica desencadeada. Além disso, a via i.d. se demonstrou capaz de aumentar a afinidade dos anticorpos anti-NS1 obtidos mesmo sem direcionamento quando comparada a via i.p.

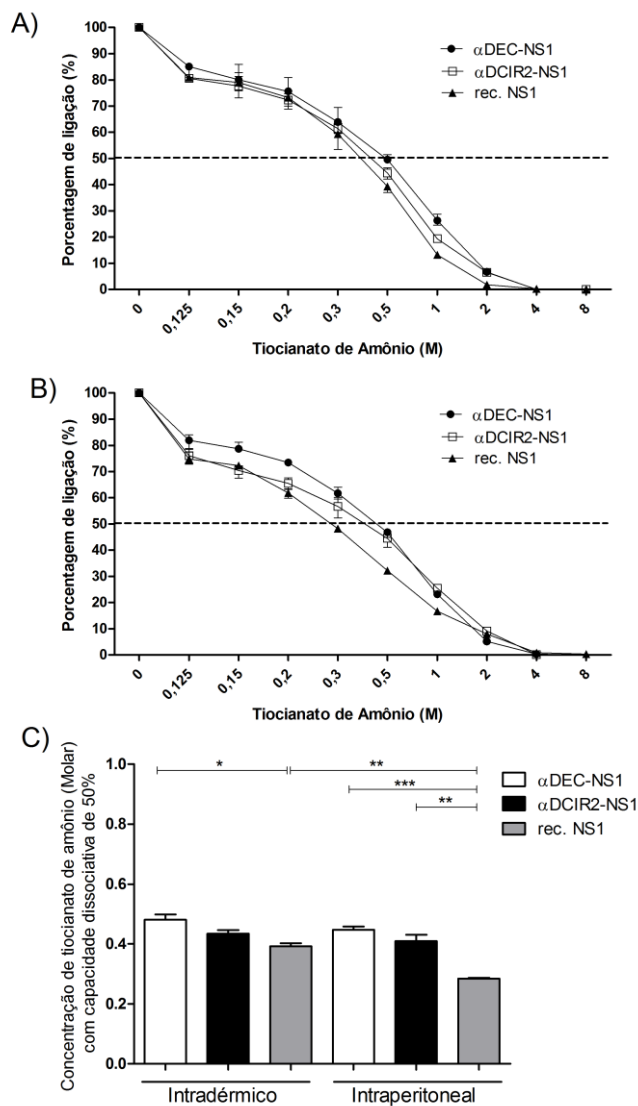


Figura 17 - Determinação da afinidade dos anticorpos NS1-específicos induzidos pelos diferentes estratégias de imunização. O percentual de ligação dos soros ao antígeno foi determinado por ensaio de ELISA utilizando a proteína rec. NS1 como antígeno de fase sólida. Neste experimento foi empregada etapa de dissociação utilizando diferentes concentrações de tiocianato de amônio (indicadas na figura). As amostras utilizadas são misturas de soros de camundongos BALB/c imunizados (n=5/grupo) pelas vias intradérmica (A) ou intraperitoneal (B) obtidas 14 dias após a administração da segunda dose prevista no protocolo vacinal. A concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar metade dos anticorpos ligados ao antígeno NS1 foi também determinada para os diferentes grupos de imunização (C). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.2.5 Análise do perfil de subclasses de IgG no soro de animais imunizados.

Com objetivo de entender o perfil de resposta imunológica gerado após a imunização com os anticorpos quiméricos, dosagens das subclasses de anticorpos IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) foram realizadas no soro dos animais imunizados. Níveis detectáveis de anticorpos das subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b foram observados no soro dos animais imunizados com os anticorpos quiméricos, sendo que para o grupo rec. NS1 somente foram detectados anticorpos do tipo IgG2a. Além disso, em nenhum dos grupos vacinais foram encontrados anticorpos da classe IgG3, mesmo em testes empregando baixas diluições dos soros (Figura 18, A e B). Ao calcular a razão entre os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a,

como um indicativo do perfil de resposta imunológica desenvolvida, observa-se que todos os grupos de imunização apresentaram valores abaixo de 1, tendo-se, portanto, um predomínio de imunoglobulinas IgG2a, sendo este resultado um indicativo da polarização da resposta imune para um perfil pró-inflamatório do tipo T-helper 1 (Th1) para todos os grupos de imunização (Figura 18-C). Além disso, não houve influência da utilização das vias de administração sobre o perfil de resposta imunológica predominante nos grupos analisados.

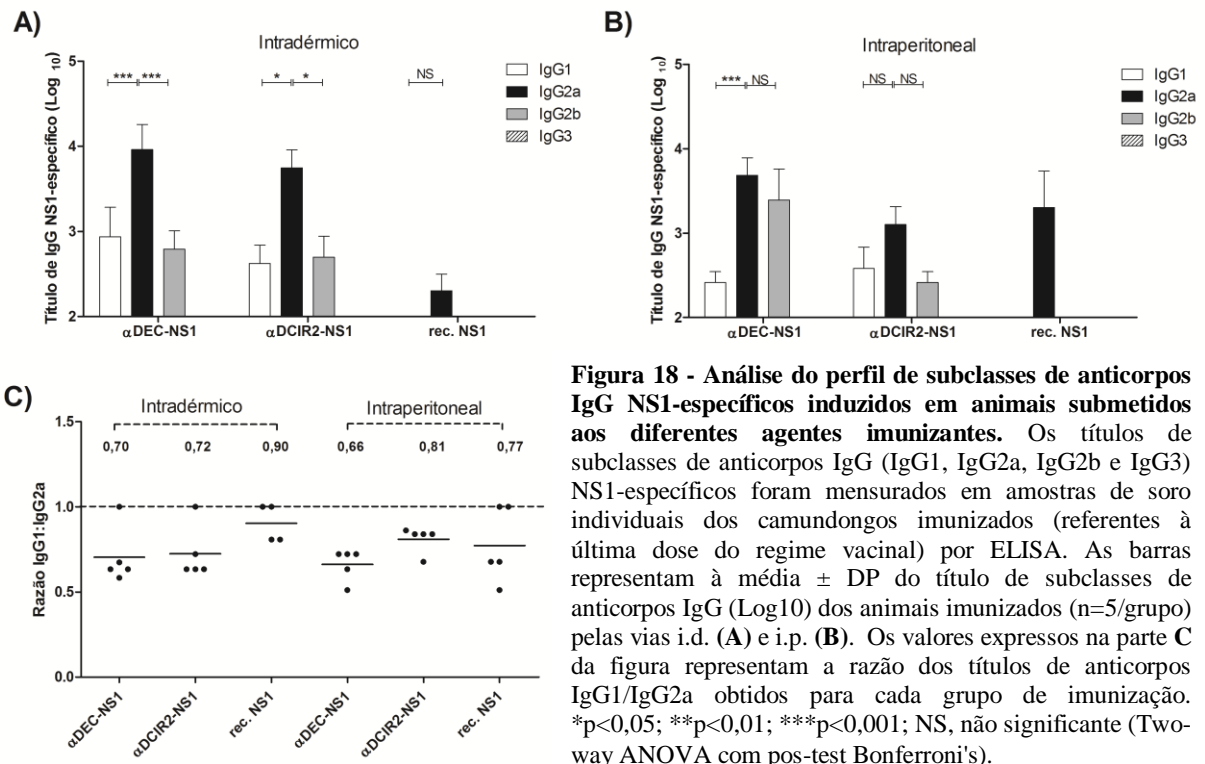


Figura 18 - Análise do perfil de subclasses de anticorpos IgG NS1-específicos induzidos em animais submetidos aos diferentes agentes imunizantes. Os títulos de subclasses de anticorpos IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) NS1-específicos foram mensurados em amostras de soro individuais dos camundongos imunizados (referentes à última dose do regime vacinal) por ELISA. As barras representam à média \pm DP do título de subclasses de anticorpos IgG (Log10) dos animais imunizados ($n=5$ /grupo) pelas vias i.d. (A) e i.p. (B). Os valores expressos na parte C da figura representam a razão dos títulos de anticorpos IgG1/IgG2a obtidos para cada grupo de imunização. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; NS, não significante (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.2.6 Avaliação da longevidade da resposta humoral desenvolvida e memória imunológica.

Além da magnitude e do perfil da resposta imunológica desenvolvida, o período de duração da mesma após vacinação bem como a capacidade do indivíduo vacinado responder frente à re-exposição ao antígeno constituem parâmetros importantes a serem analisados nos estudos de candidatos vacinais. Neste sentido, a resposta de anticorpos IgG foi monitorada por até 145 dias após a administração da segunda dose vacinal, dia 160 do protocolo vacinal conforme ilustrado na Figura 14-C. Neste ensaio foi possível observar que os níveis de anticorpos antígeno-específico decaem ao longo do período analisado, entretanto, títulos acima de 10^3 são preservados, com exceção do grupo rec. NS1, que apresentou queda brusca

nos títulos de anticorpos a partir de 30 dias depois da última vacinação (Figura 19). Estes dados demonstram que a utilização dos anticorpos quiméricos (direcionamento para DC's) foi mais eficiente na indução de resposta imunológica duradoura quando comparados ao grupo que recebeu apenas a proteína rec. NS1.

Além do exposto, transcorridos 145 dias após a última dose vacinal (dia 161, Figura 14-C) o animais foram inoculados com 1 µg da proteína recombinante NS1 DENV2 em simulação a re-exposição antigênica. De forma clara, todos os grupos foram capazes de responder rapidamente ao estímulo, sendo detectados níveis elevados de anticorpos específicos de 7 a 15 dias após exposição ao antígeno, resultado que serve de indicativo para a presença de memória imunológica nos animais imunizados. Ao avaliarmos a influência das vias de imunização sobre os perfis de resposta observados foi possível concluir que não houve diferença entre as vias de administração testadas, sendo, portanto, ambas promissoras ao direcionamento de antígenos para DC's.

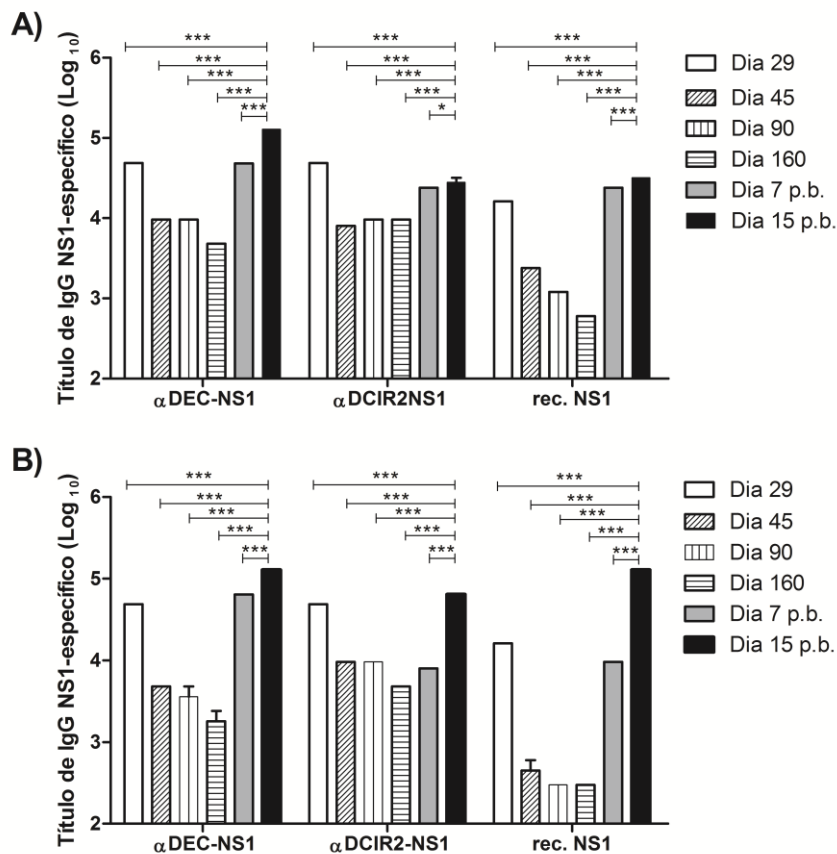


Figura 19 - Avaliação da longevidade da resposta humoral sistêmica NS1-específica e indução de memória imunológica. Para avaliar a duração da resposta humoral antígeno específica, os títulos de anticorpos IgG NS1-específicos foram medidos em misturas de soro de camundongos imunizados ($n=5$ /grupo) pelas vias i.d. (A) e i.p. (B). As amostras de soro utilizadas são referentes aos dias 29, 45, 90 e 160 do protocolo vacinal (vide figura 14). Após a administração da proteína rec. NS1 no dia 161, as amostras de soros coletadas nos dias 168 e 176 foram igualmente analisadas com objetivo de avaliar a presença de memória imunológica. As barras representam a média \pm DP do título IgG NS1-específico sérico (\log_{10}) dos animais. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.2.7 Ligação dos anticorpos NS1-específicos a plaquetas humanas e influência sobre a agregação plaquetária.

Uma preocupação na utilização da proteína NS1 de dengue como antígeno vacinal consiste nos possíveis efeitos deletérios que anticorpos anti-NS1 podem causar, dentre eles a ligação cruzada com proteínas presentes em células humanas, como antígenos presentes em plaquetas (27). Para avaliar se as formulações vacinais propostas neste trabalho induzem ou não a produção de anticorpos deletérios, os soros dos animais imunizados foram testados

quanto à capacidade de ligação a plaquetas humanas por citometria de fluxo (Figura 20). Para todos os grupos testados não foi observada ligação às plaquetas em níveis estatisticamente divergente do grupo controle (IgG de camundongo comercial), demonstrando que as formulações contendo a proteína NS1, fusionada ou não a anticorpos monoclonais, não induzem a produção de anticorpos com reatividade cruzada a plaquetas.

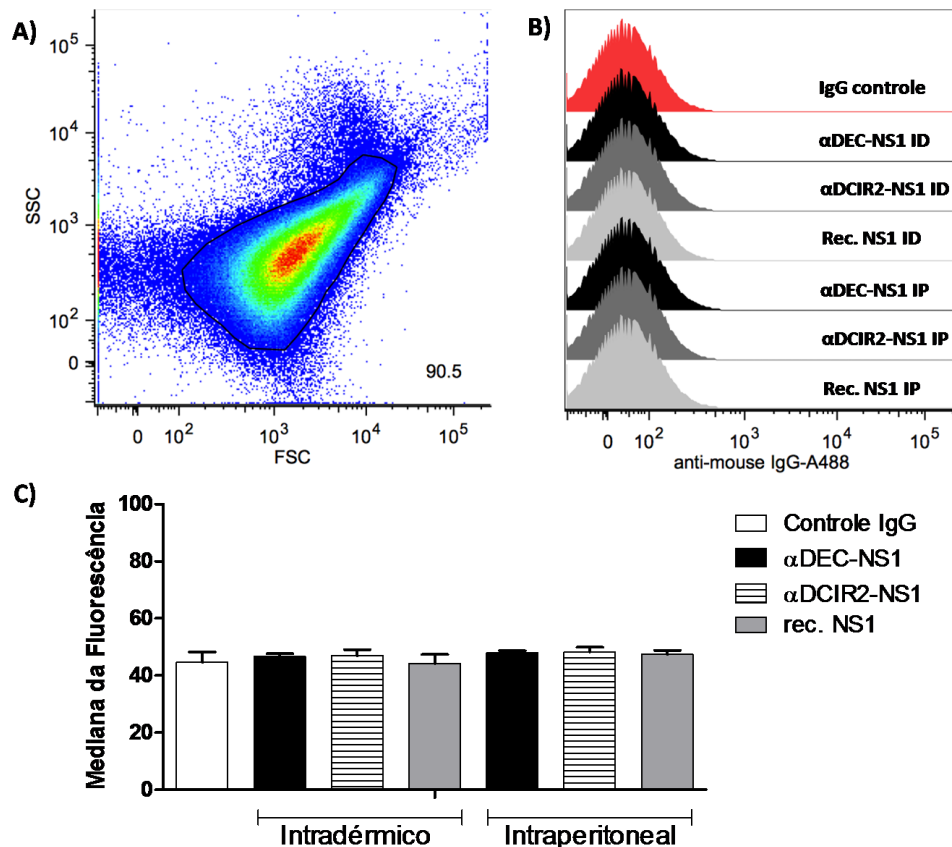


Figura 20 - Capacidade de ligação dos anticorpos NS1-específicos a plaquetas humanas. Misturas de soros dos animais imunizados com as distintas formulações vacinais foram testadas quanto à capacidade de ligação a plaquetas humanas. Amostras de soro previamente quantificadas foram diluídas para uma concentração final de 10 ug/ml de IgG NS1-específico e incubadas com 10⁶ plaquetas humanas, seguido de marcação secundária com anticorpo anti-IgG de camundongo (conjugado a Alexa 488) e analisadas por citometria de fluxo. A) Estratégia de análise das células marcadas após tratamento com os diferentes soros hiperimunes. B) Mediana da fluorescência ± DP das culturas em triplica. ID, Intradérmico; IP, Intraperitoneal. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

Além da ligação específica dos soros a plaquetas humanas, analisamos também a influência dos mesmos sobre a agregação plaquetária *in vitro*. Neste ensaio plasma humano rico em plaquetas foi incubado com os soros separadamente e a agregação plaquetária,

induzida por ADP, medida em um agregômetro. Conforme ilustrado na figura 21, não houve alteração no perfil de agregação plaquetária na presença dos soros controles ou vacinais, sendo o percentual de agregação semelhante para todos os grupos. Esses dados tomados juntos demonstram que o método de direcionamento da proteína NS1 para DC's por anticorpos quimeras não induzem a produção de anticorpos NS1-específicos que reagem ou alteram as funções de plaquetas humanas sendo, portanto, seguros para o desenvolvimento de estratégias vacinais contra a dengue.

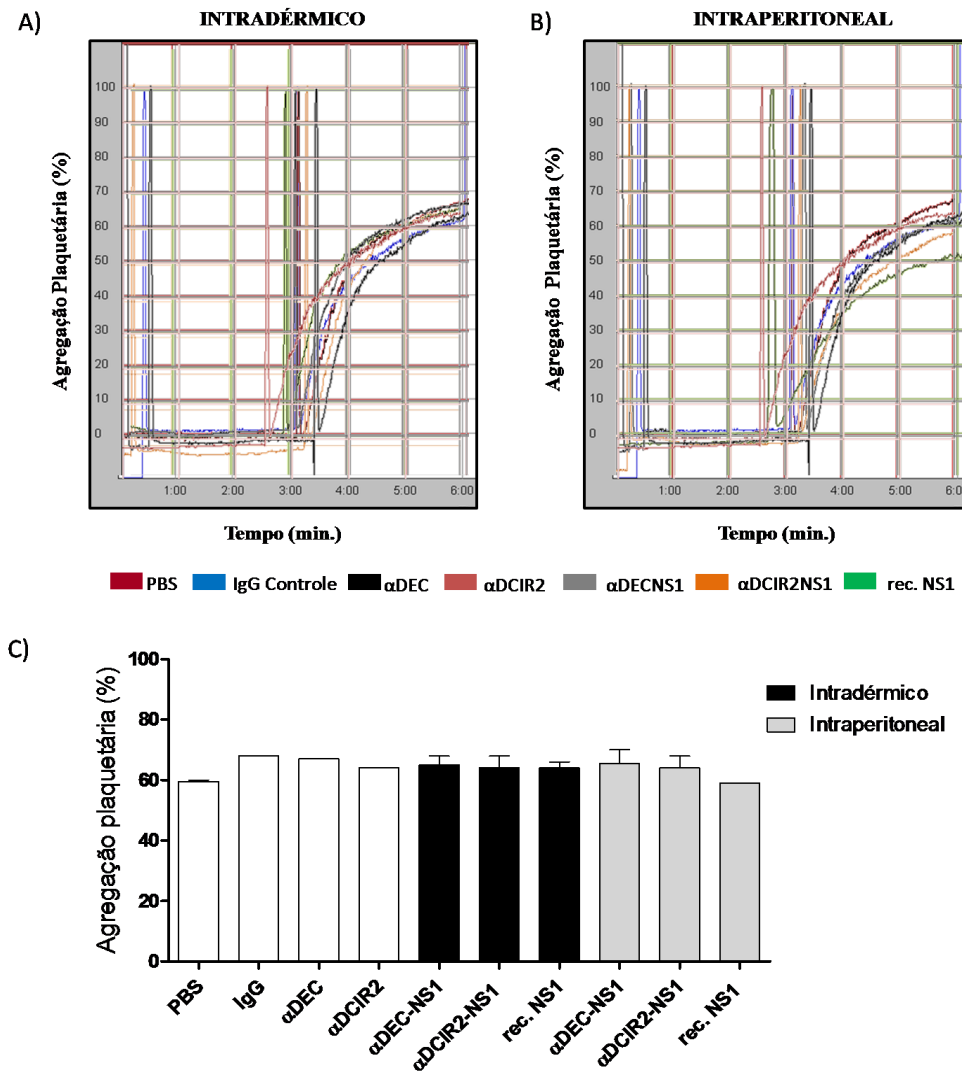


Figura 21 - Avaliação da agregação plaquetária *in vitro* na presença de soros NS1-específicos. Amostras de plasma humano rico em plaquetas foram pré-incubadas com isotipo IgG controle ou amostras de soro diluídas para uma concentração final de 2,5 ug/ml de IgG NS1-específico. Após incubação a suspensão de plaquetas foi monitorada para ocorrência de agregação plaquetária após estímulo de 20 μ M de adenosina difosfato (ADP). A e B) Percentuais de agregação em suspensão de plaquetas incubadas com soros obtidos de animais imunizados pelas vias i.d. ou i.p. conforme indicado na figura. C) O percentual de agregação plaquetária foi quantificado e expresso como média \pm erro de duplicatas de culturas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.2.8 *Análise da influência dos soros NS1-específicos sobre a permeabilidade vascular in vitro.*

Além da ligação e alteração da função plaquetária, os anticorpos anti-NS1 DENV foram relacionados à ligação a células endoteliais e indução de apoptose resultando em possíveis distúrbios hemodinâmicos como aqueles observados em quadros de dengue grave (2,27). Com objetivo de verificar se anticorpos anti-NS1 presentes no soro dos animais imunizados seriam capazes de interferir na homeostase vascular, testamos os mesmos em modelo experimental de permeabilidade vascular empregando linhagem de células endoteliais (Figura 22). Neste ensaio, monocamadas de células endoteliais, estabelecidas em sistema transwell, foram tratadas com diluições dos soros dos animais imunizados, sendo a resistência trans-endotelial (TEER, do inglês “Trans-endothelial Electrical Resistance”) medida em diferentes tempos. Embora o ensaio apresentado seja preliminar, é possível observar que os grupos vacinais apresentaram TEER maior que o grupo controle (Salina) nas condições testadas, sendo estes dados um indicativo que os anticorpos NS1-específicos produzidos não alteram a permeabilidade vascular *in vitro*. De forma inesperada, a tratamento das células com o soro do grupo controle apresentou TEER menor que o tratamento com a citocina TNF- α , um indutor da permeabilidade vascular, adotado no ensaio como um controle positivo. Além disso, o tratamento com os soros gerados por imunização utilizando a via i.d. resultou em acentuado decaimento da TEER transcorridas 24 h de incubação, o que torna o resultado obtido inconclusivo.

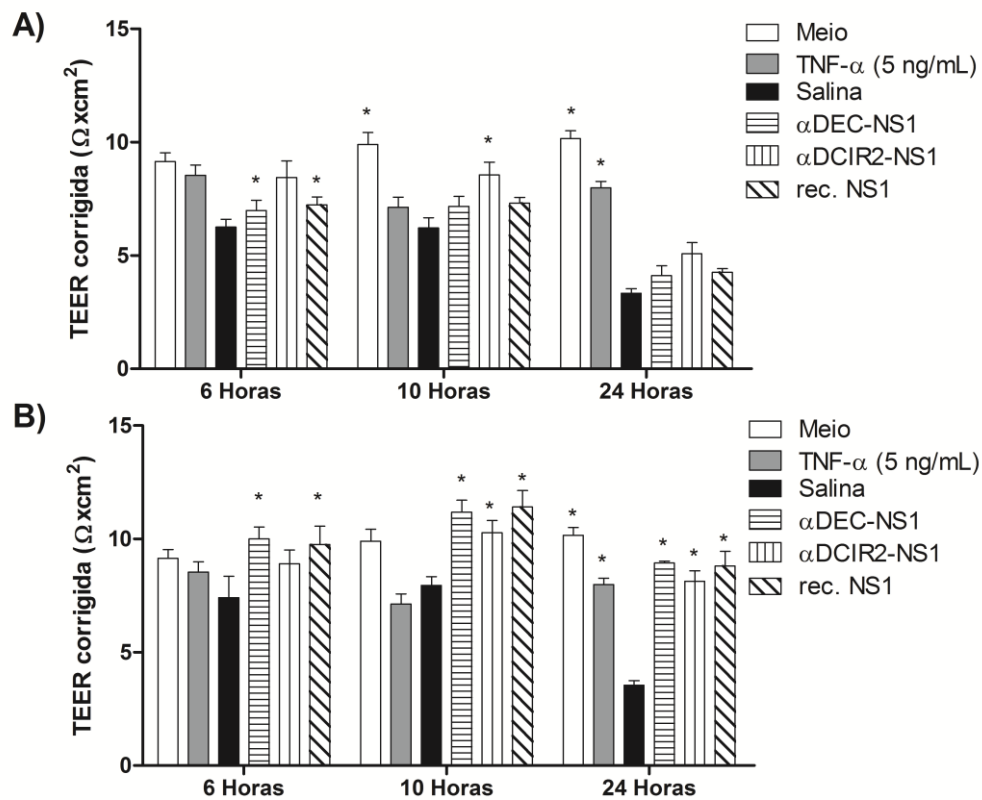


Figura 22 - Avaliação da permeabilidade vascular *in vitro* na presença de soros NS1-específicos.

Monocamadas confluentes de células HUVEC estabelecidas em sistema transwell foram incubadas por 6-24h com diluições dos soros anti-NS1 obtidos de animais imunizados pelas vias i.d. (A) ou i.p. (B), sendo a TEER (ohm) medida nos tempos indicados na figura. TNF- α (5 ng/ml) foi utilizado como controle positivo do ensaio. As barras representam a média \pm erro da TEER obtida. Os dados apresentados são resultantes de um ensaio realizado em quadruplicata. *Valores significativamente diferentes das culturas tratadas com soro controle (grupo salina) com $p < 0,05$ (Two-way ANOVA seguido de teste de Dunnet).

4.2.9 Avaliação da função hepática dos animais imunizados.

Ainda como validação da segurança vacinal marcadores bioquímicos de danos teciduais foram analisados. Como indicativo de danos hepáticos induzidos pelas imunizações, as atividades das transaminases TGO e TGP foram medidas em amostras de soro dos animais (figura 23), não sendo encontradas diferenças significativas entre os grupos controles e vacinais. Para os camundongos imunizados pela via i.d. foi medida a atividade da transaminase lactato desidrogenase (LDH) e não se encontrou diferença com as amostras de grupos controle. Diante destes resultados fica claro que as formulações vacinais não induzem efeitos deletérios nas condições testadas.

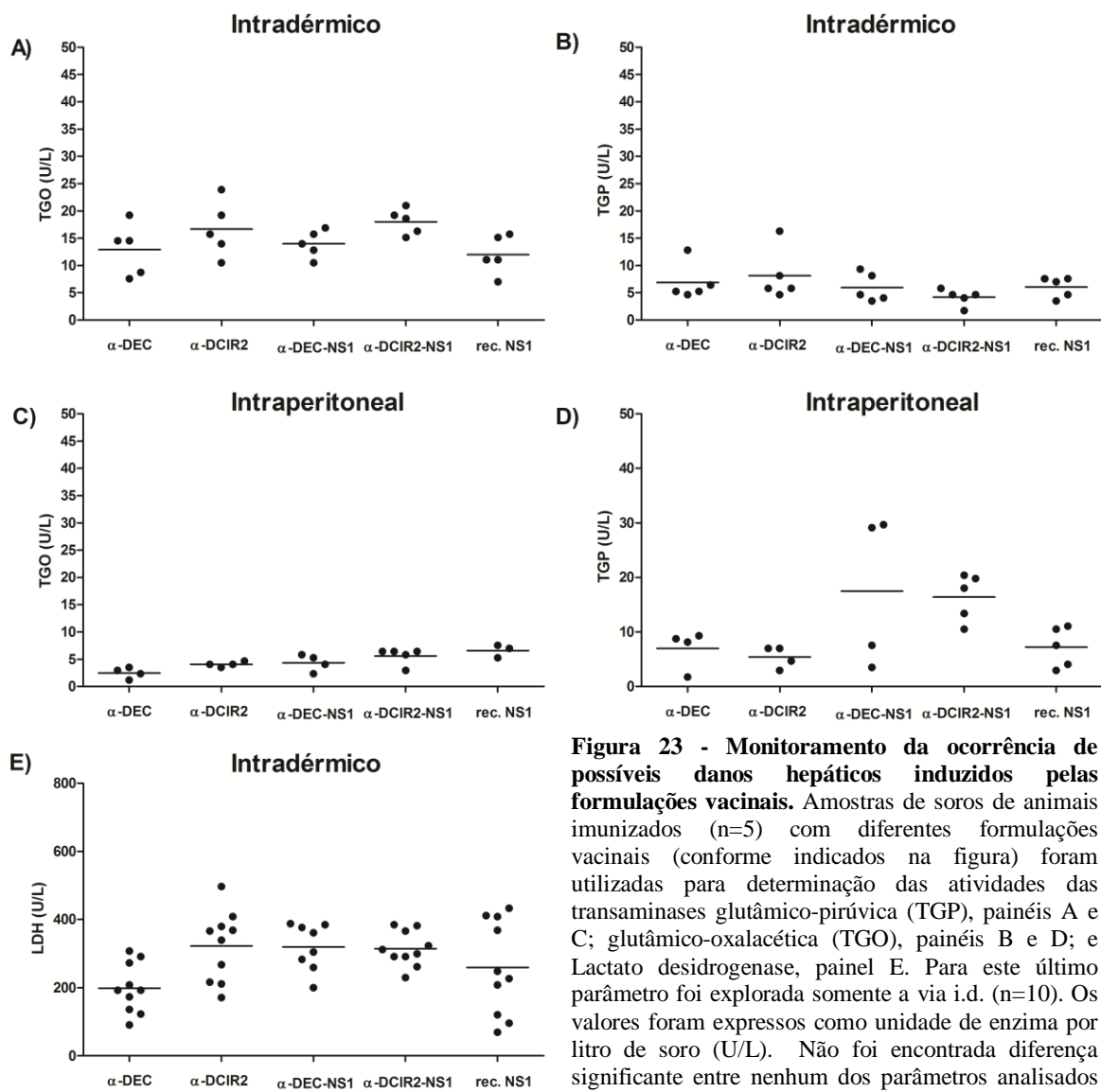


Figura 23 - Monitoramento da ocorrência de possíveis danos hepáticos induzidos pelas formulações vacinais. Amostras de soros de animais imunizados (n=5) com diferentes formulações vacinais (conforme indicados na figura) foram utilizadas para determinação das atividades das transaminases glutâmico-pirúvica (TGP), painéis A e C; glutâmico-oxalacética (TGO), painéis B e D; e Lactato desidrogenase, painel E. Para este último parâmetro foi explorada somente a via i.d. (n=10). Os valores foram expressos como unidade de enzima por litro de soro (U/L). Não foi encontrada diferença significativa entre nenhum dos parâmetros analisados (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.2.10 Análise hematológica dos grupos vacinais.

Uma das principais características observadas durante a infecção pelo DENV consiste na alteração de parâmetros hematológicos, sendo observado especialmente leucopenia, trombocitopenia e elevação do hematócrito. Esses dois últimos parâmetros, de acordo a literatura, podem estar relacionados com os efeitos deletérios de anticorpos anti-NS1 que reagem cruzadamente com plaquetas, células endoteliais e fatores da coagulação. Diante disto, análises hematológicas das amostras de sangue dos animais imunizados, coletadas 7 dias após a administração da última dose vacinal, foram realizadas. Conforme apresentado na tabela 4, todos os parâmetros analisados apresentaram-se dentro da normalidade, dentre eles o número de leucócitos totais, linfócitos e hematócrito, não havendo diferença estatística entre os grupos controles e imunizados. Ao se contabilizar o número de plaquetas circulantes em amostras de sangue dos animais imunizados, também não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos analisados (Figura 24), resultado que se correlaciona com a ausência de ligação específica de anticorpos anti-NS1 frente a este tipo celular (figura 20).

Parâmetros	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS										
	Hematológicos	Intradérmico					Intraperitoneal				
		αDEC	αDCIR2	αDEC-NS1	αDCIR2-NS1	rNS1	αDEC	αDCIR2	αDEC-NS1	αDCIR2-NS1	rNS1
Leucócitos Totais	10 ³ /μl	13,68 ± 5,15	9,9 ± 2,31	11,04 ± 2,94	10,38 ± 4,35	9,7 ± 0,8	6,42 ± 0,41	9,1 ± 3,0	6,44 ± 1,32	6,68 ± 1,40	11,32 ± 4,28
Linfócitos	10 ³ /μl	10,48 ± 3,9	7,8 ± 1,67	8,54 ± 2,26	8,64 ± 3,42	7,16 ± 0,77	4,72 ± 0,93	7,14 ± 2,16	5,14 ± 1,17	4,96 ± 0,95	8,38 ± 3,40
Monócitos	10 ³ /μl	0,46 ± 0,2	0,32 ± 0,13	0,34 ± 0,05	0,24 ± 0,15	0,32 ± 0,04	0,28 ± 0,24	0,28 ± 0,14	0,14 ± 0,05	0,24 ± 0,11	0,48 ± 0,47
Granulócitos	10 ³ /μl	2,76 ± 1,1	1,78 ± 0,56	2,16 ± 0,69	1,5 ± 0,88	2,22 ± 0,40	1,42 ± 0,77	1,68 ± 0,80	1,16 ± 0,19	1,48 ± 0,42	2,46 ± 1,40
Eritrócitos	10 ⁶ /μl	9,66 ± 0,77	9,39 ± 0,61	10,1 ± 0,34	9,56 ± 3,07	9,56 ± 0,26	10,30 ± 0,88	10,05 ± 0,83	9,64 ± 0,56	9,92 ± 0,67	9,84 ± 0,88
Hemoglobina	g/dL	15,48 ± 1,10	15,26 ± 1,17	15,8 ± 0,40	15,02 ± 4,92	14,64 ± 0,40	16,36 ± 1,34	15,6 ± 1,4	14,82 ± 0,85	15,54 ± 1,14	15,06 ± 1,65
Hematócrito	%	46,08 ± 3,35	46,26 ± 4,11	48,1 ± 1,31	46,02 ± 14,76	44,98 ± 1,0	50,42 ± 4,4	48,02 ± 4,0	46,5 ± 3,12	48,64 ± 3,15	46,6 ± 4,86

Tabela 4 - Análise hematológica dos animais imunizados com diferentes formulações vacinais. Amostras de sangue de camundongos BALB/c (5/grupo) foram obtidas 7 dias após a administração da segunda dose vacinal e submetidas à análise em contador hematológico. Os dados estão representados como média ± DP de análises individuais. Estes dados são representativos de dois experimentos independentes. Não foi encontrada diferença significativa entre nenhum dos parâmetros analisados (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

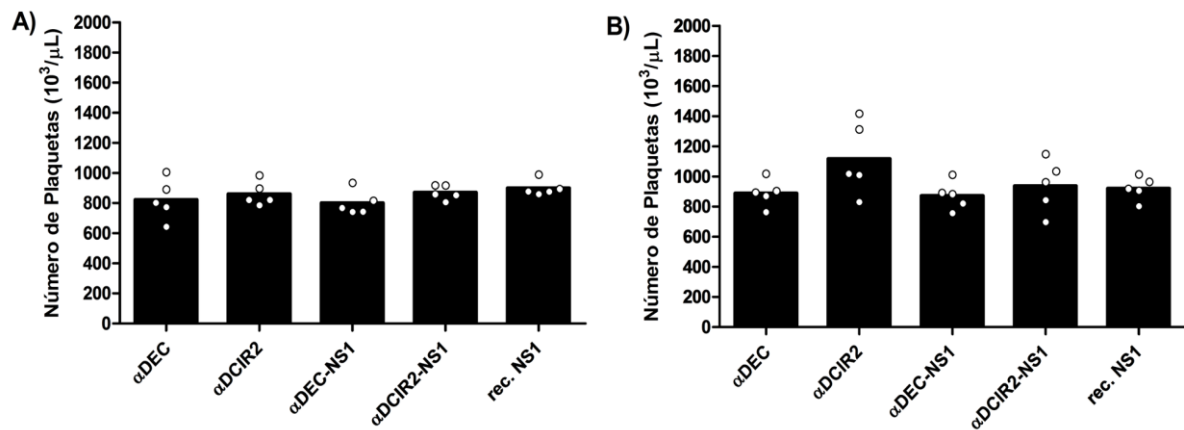


Figura 24 - Influência das formulações vacinais sobre o número de plaquetas circulantes nos animais imunizados. O número de plaquetas presentes em amostras de sangue de camundongos imunizados pelas vias i.d. (A) ou i.p. (B), obtidas 7 dias após a administração da segunda dose vacinal, foi determinado com auxílio de analisador hematológico. Os valores médios (barras) e individuais (símbolos) de plaquetas foram expressos em $\times 10^3$ células/ μL de sangue. Estes dados são representativos de dois experimentos independentes. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos e vias de imunização (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

Como avaliação da manutenção do perfil de coagulação dos animais imunizados os tempos de sangramento (TS) e de protombina (TP) dos mesmos foram determinados. Devido à ausência de alterações nos parâmetros de segurança vacinal, demonstrados nos resultados anteriores, bem como pelo limitado tempo necessário à conclusão deste trabalho, para os experimentos de TS e TP foi priorizada somente a via i.d. de imunização. Assim, conforme ilustrado na figura 25 não foi detectado alteração nos parâmetros analisados, sendo que esses resultados corroboram as outras análises de segurança vacinal feitas no presente estudo.

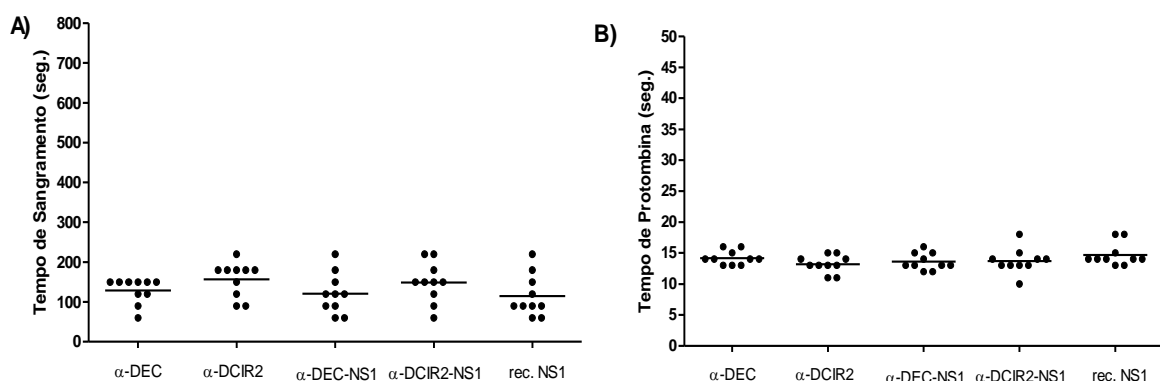


Figura 25 - Avaliação do tempo de sangramento e protombina dos animais imunizados pela via i.d.. A) Tempo de sangramento (TS) dos animais imunizados determinado 7 dias após a administração da segunda dose vacinal. O TS foi determinado após transecção da ponta da calda do animal (3 mm), sendo coletadas gotas de sangue a cada 30 s até interrupção do sangramento. B) Tempo de protombina determinado em amostras de soro dos animais imunizados. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos de imunização (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.2.11 Determinação da capacidade protetora das formulações vacinais.

Para avaliar a capacidade protetora das formulações vacinais os animais foram desafiados pela via i.c. com DENV2 (cepa NGC) duas semanas após a administração da última dose vacinal (Figura 14-B), sendo, em seguida, acompanhado por até 21 dias quanto à ocorrência de mortalidade e morbidade. Como é possível observar na figura 26, o grupo que recebeu a proteína NS1 fusionada ao anticorpo anti-DEC205 foi o que apresentou sinais de morbidade em menor intensidade quando comparado o seu respectivo grupo controle (α DEC) e aos demais grupos vacinais (α DCIR2-NS1 e rec. NS1). Embora esta diferença não tenha significância estatística, os dados evidenciam uma tendência de proteção para o grupo α DEC-NS1 frente aos sinais clínicos da infecção. Foi observada uma morbidade máxima de apenas 60%, bem como mortalidade de apenas 10% nos animais do grupo controle (Dados não mostrados). Desta forma, novas repetições de experimento deverão ser realizadas para uma correta avaliação da capacidade protetora das formulações vacinais em estudo.

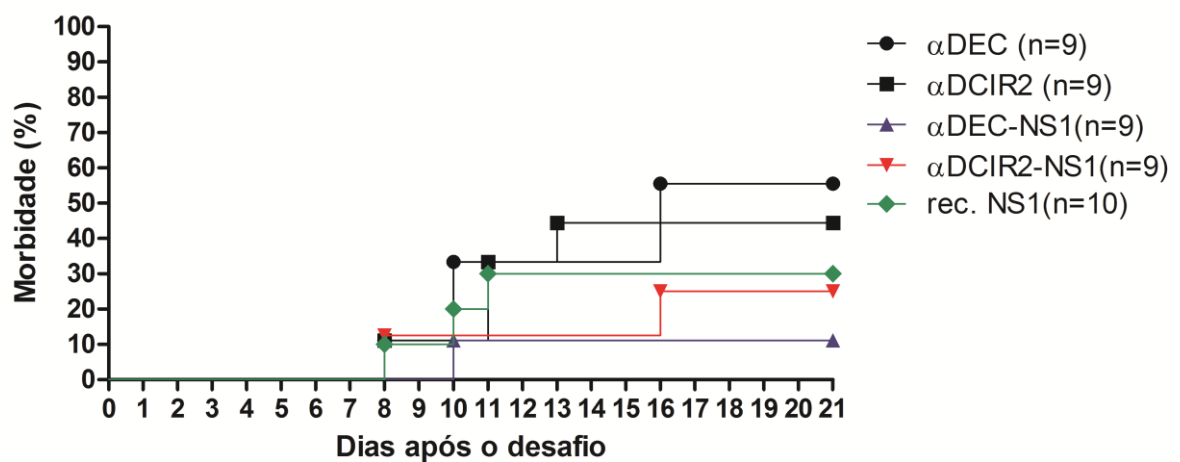


Figura 26 - Proteção à morbidade associada ao desafio com o vírus DENV2 (cepa NGC) em camundongos submetidos à imunização com as diferentes formulações testadas. Duas semanas após a última dose do protocolo vacinal (dia 30) os grupos de animais imunizados foram desafiados pela via i.c. com 50 x DL50 do vírus DENV2 (cepa NGC). A morbidade dos animais foi avaliada ao longo de 21 dias e o número de animais/grupo está indicado na legenda do gráfico. (Mantel-Cox).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho tivemos como objetivo a busca por formulações vacinais baseadas na proteína NS1 do vírus DENV2, que apresentassem respostas imunológicas antígeno-específicas promissoras, quando utilizada à via i.d. de inoculação, sem promoção de efeitos adversos. Os antígenos escolhidos para compor as formulações foram as proteínas NS1-JHA1 em sua forma recombinante e um fragmento da mesma (Δ CNS1-JHA1), cuja deleção na porção C-terminal (a.a 271-352) foi descrita por reduzir a produção de anticorpos NS1-específicos com reatividade cruzada junto a proteínas humanas. Diversas tentativas de obter a proteína Δ CNS1 foram realizadas, entretanto, a mesma se apresentou instável perante todos os procedimentos de renaturação *in vitro* testadas, sendo possível obter somente a proteína NS1-JHA1 em quantidade e qualidade adequada aos ensaios de imunização. Assim, diante dos problemas enfrentados, alternativamente optamos por utilizar a estratégia de direcionamento do antígeno NS1 para células dendríticas por meio da sua fusão com anticorpos monoclonais específicos para os receptores DEC205 e DCIR2. Ao associarmos as vias i.d. e i.p com a estratégia descrita anteriormente, observamos a geração de potente resposta humoral NS1 específica, que foi acompanhada de modulação do perfil de subclasses de IgG e aumento da afinidade dos anticorpos ao antígeno alvo. Além disso, demonstramos a ausência de efeitos deletérios associados às formulações vacinais. Desta forma, o conjunto de dados obtidos neste trabalho destaca de forma inédita a combinação da via i.d ao direcionamento do antígeno NS1 DENV para DC's, sendo esta uma estratégia segura e extremamente promissora para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus da dengue.

As proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 propostas como antígenos neste trabalho foram expressas em modelo procarioto (*E. coli*), concentraram-se na fração insolúvel do extrato bacteriano, requerendo estratégia de renaturação *in vitro* para obtenção das mesmas em estado solúvel. Ao testarmos o método de renaturação por diluição pulsada apenas à proteína NS1-JHA1 apresentou antigenicidade, estrutura e rendimento satisfatórios, sendo este resultado compatível com dados publicados por nosso grupo em que esta metodologia se demonstrou eficiente na obtenção da proteína NS1 de DENV2 de outra cepa viral (NGC) (61), além de outros trabalhos que renaturaram esta proteína sob distintas metodologias (71,72,90,91).

A superexpressão de proteínas heterólogas em *E. coli* em geral apresenta a desvantagem das mesmas se concentrarem em CI, característica influenciada por distintos fatores, podendo-se destacar a elevada taxa de expressão protéica quando utilizados

promotores fortes (T7, por exemplo), condições de cultivo bacteriano durante a expressão protéica e as propriedades físico-químicas da biomolécula alvo (69,76). Assim, diversas alternativas descritas que visam reduzir esses efeitos, bem como aperfeiçoar o processo de renaturação *in vitro*, foram utilizadas na tentativa de obter a proteína Δ CNS1-JHA1 incluindo, expressão protéica em temperatura reduzida, renaturação na presença de aditivos químicos anti-agregantes e utilização de pressão hidrostática na desagregação e renaturação protéica, as quais se mostraram falhas nas condições testadas. Diante das dificuldades encontradas na obtenção da proteína Δ CNS1-JHA1, ficou claro que a deleção de sua porção C-terminal resultou na perda de estabilidade. A partir da seqüência de aminoácidos da proteína NS1-JHA1 foi possível determinar o seu perfil de hidrofobicidade através de análise computacional. Com base nesta análise observamos que a região que compreende os a.a. 271-352 apresenta em maioria epítomos lineares com caráter hidrofílico, elemento que nos permite especular que, mediante sua retirada, a molécula perde estabilidade quando colocada em meio aquoso, tendo-se como resultado a precipitação.

Os resultados encontrados corroboram com achados da literatura no qual, mutações sítio-dirigidas (com substituição de Cys, Tyr e Trp pelo aminoácido hidrofóbico alanina) localizadas na porção carboxi-terminal da proteína NS1 do DENV promoveram a desestabilização da proteína inibindo sua dimerização e secreção (hexâmeros), bem como propiciou a formação de agregados (92). Em outra publicação de autoria do mesmo grupo de pesquisa demonstrou-se que uma deleção de 79 a.a na região C-terminal da NS1 DENV2 também inibiu a formação de dímeros (93). Ainda, em outro trabalho foi observada uma menor expressão protéica quando o fragmento amino-terminal (a.a.1-175) da NS1 DENV2 foi produzido em linhagem de *E. coli* BL21, com deposição também em CI insolúveis, não sendo possível obter a mesma solúvel após renaturação adotando estratégia de retirada de uréia por diálise gradual. Além do exposto, em outros dois artigos publicados a proteína Δ CNS1 (com a mesma seqüência e que deu base ao nosso projeto) foi igualmente expressa de forma insolúvel, sendo utilizada nos experimentos de imunização a partir de recorte de gel de poliacrilamida e associada a adjuvantes, estratégia incompatível com a utilização em humanos (45,46). Desta forma, a utilização da proteína NS1 em sua forma truncada se apresentou inviável, sendo plausível a escolha de uma estratégia alternativa para continuação do trabalho.

Na segunda etapa do projeto optamos por utilizar a estratégia de direcionamento de antígenos para DC's, empregando anticorpos monoclonais contendo em fusão a proteína NS1 de interesse, os quais são específicos para os receptores DEC205 e DCIR2 presentes em

subpopulações de DC's. Como um dos principais objetivos do trabalho foi explorar a via i.d, a escolha de utilizar o direcionamento se mostrou adequada e promissora, visto que as camadas dérmicas da pele contêm elevada proporção de células dendríticas, sendo esta associação ainda inédita para o campo de vacinologia contra dengue. A eficiência deste método de entrega antigênica *in vivo* requer a presença de moléculas com capacidade ativadora sobre as células dendríticas como agonistas de receptores do tipo toll. A ausência deste fato pode acarretar indução de tolerância ao antígeno, efeito contrário ao do nosso objetivo. Diante disso, optamos por utilizar o adjuvante Poly (I:C), uma agonista de TLR3 e MDA5, cuja efetividade junto a direcionamento de antígenos para DC's via mAbs α DEC205 e α DCIR2 já foi comprovada (44,56). Para tentar demonstrar o efeito da associação das estratégias escolhidas sobre a resposta imunológica antígeno-específica desencadeada centralizamos nossos esforços na análise da resposta humoral sistêmica, sobretudo a de anticorpos IgG, tendo a via i.p. como referência.

Inicialmente obtivemos os anticorpos de fusão, bem como a proteína NS1 recombinante em sua forma isolada, com estrutura e antigenicidade preservadas seguindo metodologias descritas previamente (44,61). Os anticorpos controles e quiméricos também preservaram suas características funcionais, sendo capazes de reconhecerem seus respectivos receptores de forma específica *in vitro*. De posse dos antígenos realizamos ensaios de imunização pelas vias i.d e i.p, os quais desencadearam uma potente resposta de anticorpos IgG NS1-específica, não sendo encontradas diferenças significativas entre as vias de administração testadas, bem como entre as estratégias de fusão (α DEC-NS1 e α DCIR2-NS1), na presença do adjuvante Poly (I:C), sendo este último achado compatível com a literatura (44). Os níveis de anticorpos específicos detectados após a segunda dose vacinal apresentaram um decréscimo de 10x (uma unidade de log. 10), em especial para o grupo rec. NS1, quando comparados a resultados prévios (44). Essa diferença observada provavelmente se deve a pequenas variações entre os protocolos vacinais adotados nos dois trabalhos, sendo que utilizamos a metade da quantidade de anticorpo empregada previamente e padronizamos os nossos ensaios tendo a proteína NS1 recombinante em proporção equimolar à administrada junto aos anticorpos quiméricos, o que nos levou a utilizar apenas 1/10 da quantidade de proteína recombinante descrita previamente.

Ao avaliarmos aspectos qualitativos das respostas geradas frente às distintas formulações vacinais foi possível concluir que os anticorpos IgG NS1-específicos reconhecem em sua maioria epítomos conformacionais termolábeis. Esses achados se

correlacionam com o fato da proteína NS1 recombinante utilizada preservar sua estrutura terciária e quaternária, como formação de dímeros, sendo o mesmo observado para a NS1 presente nos mAbs quiméricos (41,44,61). Ainda, ambas as estratégias de direcionamento antigênico aumentaram a afinidade desses anticorpos ao antígeno, embora diferenças foram encontradas quando comparadas as duas vias de administração utilizadas, sendo a via i.d eficiente em induzir anticorpos ávidos ao antígeno mesmo no grupo que recebeu a proteína NS1 de forma isolada. Embora em artigo prévio não tenha sido observada diferença na avidéz de anticorpos gerados nos grupos tratados com os mAbs recombinantes e a proteína NS1 após administração pela via i.p.(44), em nossas análises observamos sutis diferenças entre os grupos analisados. Essa diferença pode ser explicada pela faixa mais ampla de concentrações de tiocianato de amônio empregada em nossos ensaios de avidéz dos anticorpos aos antígenos alvos. Os achados aqui descritos indicam que as vias de administração testadas se mostram eficientes para o direcionamento antigênico para DC's por meio de mAbs quiméricos, além de destacar uma importante propriedade da via i.d, que se mostrou capaz de potencializar e melhorar a resposta antígeno-específica, mesmo na ausência de direcionamento antigênico. Portanto, os resultados confirmam que tal via de administração se mostra particularmente promissora para o desenvolvimento de vacinas de subunidades contra o DENV.

Além da afinidade dos anticorpos, as estratégias de direcionamento também foram capaz de modular o perfil de subclasses de IgG .Com exceção de IgG3, todas as demais subclasses (IgG1, IgG2a e IgG2b) foram detectadas nos grupos que receberam os anticorpos quiméricos, sendo que o controle (rec. NS1) só induziu a produção de IgG2a. Apesar dessas diferenças, ao se analisar a relação de anticorpos IgG1/IgG2a todos os grupos vacinais apresentaram o mesmo perfil de resposta imune, sendo evidenciado um predomínio do anticorpo IgG2a, indicativo da modulação da resposta para um perfil pró-inflamatório do tipo T-helper 1 (Th1). Embora não tenhamos realizado análise da resposta celular e do padrão de citocinas desenvolvidos, elementos que nos permitiriam confirmar esses resultados, estudos prévios demonstram que o direcionamento de antígenos para DC's por meio de mAbs anti-DEC205 e anti-DCIR2 em associação com estímulo de maturação para DC's é capaz de promover a ativação de linfócitos T CD4⁺ que, ao auxiliarem na maturação de linfócitos B, modulam a afinidade dos anticorpos antígenos-específicos bem como os níveis e o espectro de isotipos de imunoglobulinas (55,56).

De maneira interessante as duas estratégias de direcionamento foram capazes de induzir resposta humoral NS1-específica duradoura, sendo detectados títulos de anticorpos

acima de 10^3 por aproximadamente 4,8 meses (145 dias) após protocolo de sensibilização dos animais. Além disso, todos os grupos demonstraram indicativo de formação de memória imunológica, os quais responderam rapidamente produzindo elevados títulos de anticorpos NS1-específicos quando re-expostos ao antígeno 141 dias após administração da segunda dose do protocolo vacinal. Embora não tenhamos realizado ensaios celulares que demonstrassem que, de fato, ocorre a expansão clonal de linfócitos B de memória específicos após o re-estímulo citado, já foi demonstrado que o direcionamento de antígenos para células dendríticas, utilizando mAb α DEC205 na presença de estímulos de maturação (Poly I:C + α CD40), pode induzir eficientemente a ativação de células T-auxiliares de longa duração, as quais podem modular as respostas de células B de memória (55).

Além da capacidade de gerar resposta imunológica específica, robusta e protetora, as formulações vacinais baseadas na NS1 do vírus da dengue devem ser testadas quanto à segurança. Essa necessidade se deve principalmente a expressiva literatura disponível que relaciona os anticorpos anti-NS1 com reatividade cruzada frente a proteínas humanas, que conduz à depleção e disfunção de plaquetas, a apoptose de células endoteliais, a ativação do sistema complemento, dentre outros fatores, levando a danos aos tecidos do hospedeiro (27,28,94,95). Sob esse aspecto, não observamos a ocorrência de efeitos deletérios associadas às formulações propostas neste trabalho, não sendo detectada reatividade cruzada dos soros gerados com plaquetas humanas, nem alteração da capacidade de agregação das mesmas na presença dos soros hiperimunes. Os parâmetros hematológicos dos animais imunizados se apresentaram dentro da normalidade incluindo, o número de plaquetas circulantes e hematócrito. Além disso, o tempo de sangramento e protombina, exames que remetem ao estado do sistema de coagulação do indivíduo, bem como a medida de atividade de transaminases (TGO, TGP e LDH) que avaliam principalmente danos ao tecido hepático, também se apresentaram inalterados. Esses dados tomados juntos deixam claro que as estratégias vacinais aqui adotadas são seguras mesmo induzindo elevados níveis de anticorpos NS1-específicos, característica importante para o desenvolvimento de novas vacinas anti-dengue tendo por base a proteína NS1.

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa também confirmam que é possível combinar potente resposta humoral específica sem ocorrência de efeitos deletérios em imunizações com a proteína NS1 de DENV (41). Entretanto, neste mesmo trabalho ficou claro que o adjuvante adotado pode influenciar na segurança vacinal. A incorporação do adjuvante de Freund (AF), cuja reatogenicidade é conhecida e não tem aprovação para uso em humanos,

ocasionou elevação de parâmetros de inflamação e danos teciduais nos animais imunizados. De forma curiosa, expressiva parte dos trabalhos que relatam anticorpos anti-NS1 com reatividade cruzada a proteínas humanas também relata protocolos de imunização contendo AF como adjuvante (28,31,45,46,96), característica que pode estar associada à inflamação gerada durante a montagem da resposta NS1-específica e, conseqüentemente, influencia no perfil de anticorpos gerados contra este antígeno (27). Assim, embora o limiar entre a indução de anticorpos anti-NS1 benéficos versus maléficos ainda seja um enigma na literatura, a escolha do adjuvante correto em formulações contendo NS1 poderá ser crucial na geração de resposta imune segura. Sob este aspecto, a capacidade adjuvante exercidas pelos anticorpos anti-DEC205 e anti-DCIR2, bem como do Poly (I:C), apresentaram-se adequadas em nosso trabalho, característica que era desconhecida até o momento.

Tentamos avaliar também em ensaio preliminar o efeito dos soros dos animais imunizados em modelo de permeabilidade vascular. Apesar dos soros dos grupos vacinais não terem induzido alteração da permeabilidade vascular quando comparado às culturas tratadas com soro controle, o ensaio realizado mostrou-se inconclusivo, sendo necessário novas repetições de forma a avaliar corretamente esse parâmetro. Arelado a isto, em publicações recentes tem-se elucidado o papel direto da proteína NS1 sobre a ativação endotelial, a qual ao interagir com TLR4 induz ativação de células endoteliais (36), tendo como provável consequência o aumento da permeabilidade vascular. Além disso, o papel protetor dos anticorpos anti-NS1 em neutralizar esse efeito também foi demonstrado (35), sendo este um modelo interessante na avaliação do papel protetor dos anticorpos anti-NS1 induzidos por formulações vacinais, o qual poderá ser considerado nos experimentos futuros a serem realizados.

Realizamos ensaio de desafio dos animais imunizados pela via i.d frente ao vírus DENV2 (NGC) na tentativa de avaliar a capacidade protetora das formulações aqui propostas. Apesar dos resultados inconclusivos decorrentes da falta de mortalidade causada pelo vírus, observamos menor incidência de sinais clínicos da infecção nos animais que receberam o mAb α DEC-NS1 na presença de Poly (I:C). Se confirmado, esse resultado estará de acordo a resultado publicado previamente cuja administração deste mesmo anticorpo pela via i.p foi o único que protegeu significativamente os animais sob os parâmetros de morbidade (44).

6 CONCLUSÕES

- As proteínas NS1-JHA1 e Δ CNS1-JHA1 foram expressas em linhagem de *Escherichia coli*, sendo possível obter somente a proteína NS1-JHA1 em quantidade e qualidade compatíveis à realização de ensaios de imunização.
- As proteínas NS1 NGC em fusão com os anticorpos α DEC e α DCIR2 mostraram-se imunogênicas quando administradas tanto pela via i.d quanto pela via a i.p., sendo capazes de desencadear potentes respostas humorais NS1-específica que reconheceu predominantemente epítomos conformacionais termolábeis.
- A imunização por via i.d. demonstrou-se promissora ao uso de vacinas de subunidades baseadas na proteína NS1 de DENV, sendo capaz de induzir anticorpos NS1-específicos de elevada afinidade mesmo na ausência de direcionamento para DC's.
- Não foi observada diferença significativa na utilização das vias i.d ou i.p sobre os perfis de respostas imunológicas induzidas pelas formulações vacinais, bem como sobre a capacidade de memória imunológica antígeno específica.
- Todas as formulações vacinais demonstraram-se seguras, não sendo detectadas alterações hematológicas, bioquímicas e funcionais nos animais imunizados.

REFERÊNCIAS*

1. Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology Advances*. 2011. p. 239–47.
2. Chuang Y-C, Wang S-Y, Lin Y-S, Chen H-R, Yeh T-M. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *J Biomed Sci* [Internet]. 2013;20(1):42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3704815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet]. 2013;496(7446):504–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3651993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet* [Internet]. 2015;385(9966):453–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614605729>
5. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados*. 2008. p. 53–72.
6. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998. p. 480–96.
7. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427(6972):313–9.
8. Henchal EA, Putnak JR. The Dengue Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 1990. p. 376–96.
9. Hadinegoro SRS. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatr Int Child Health* [Internet]. 2012 May 12;32(sup1):33–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/2046904712Z.000000000052>
10. Halstead SB, Udomsakdi S, Simasthien P, Singharaj P, Sukhavachana P, Nisalak A. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses. *Yale J Biol Med*. 1970;42(5):261–75.
11. Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, et al. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog*. 2010;6(2).
12. Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009. p. 564–81.

*De acordo com:

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

13. Edelman R. Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2007 Jul 15;45 Suppl 1:S56–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582571>
14. Kirkpatrick BD, Whitehead SS, Pierce KK, Tibery CM, Grier PL, Hynes NA, et al. The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. *Sci Transl Med* [Internet]. 2016 Mar 16;8(330):330ra36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27089205>
15. Whitehead SS. Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYDTM vaccine? *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2016 Apr;15(4):509–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26559731>
16. Kirkpatrick BD, Durbin AP, Pierce KK, Carmolli MP, Tibery CM, Grier PL, et al. Robust and Balanced Immune Responses to All 4 Dengue Virus Serotypes Following Administration of a Single Dose of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine to Healthy, Flavivirus-Naive Adults. *J Infect Dis* [Internet]. 2015 Sep 1;212(5):702–10. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/infdis/jiv082>
17. Osorio JE, Velez ID, Thomson C, Lopez L, Jimenez A, Haller AA, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2014 Sep;14(9):830–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309914708114>
18. Huang CYH, Kinney RM, Livengood JA, Bolling B, Arguello JJ, Luy BE, et al. Genetic and Phenotypic Characterization of Manufacturing Seeds for a Tetravalent Dengue Vaccine (DENVax). *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5).
19. da Costa VG, Marques-Silva AC, Floriano VG, Moreli ML. Safety, immunogenicity and efficacy of a recombinant tetravalent dengue vaccine: A meta-analysis of randomized trials. *Vaccine* [Internet]. 2014 Sep;32(39):4885–92. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X14009347>
20. Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J. From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2011 Sep;29(42):7229–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11009881>
21. Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2012 Nov 3;380(9853):1559–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22975340>
22. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHJM, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2014 Oct 11;384(9951):1358–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25018116>

23. Flipse J, Smit JM. The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. Simmons CP, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 Jun 11;9(6):e0003749. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003749>
24. Weiskopf D, Angelo MA, Bangs DJ, Sidney J, Paul S, Peters B, et al. The human CD8+ T cell responses induced by a live attenuated tetravalent dengue vaccine are directed against highly conserved epitopes. *J Virol* [Internet]. 2015 Jan;89(1):120–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25320311>
25. Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, et al. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog*. 2007;3(11):1798–812.
26. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuk P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol*. 2011;187(1):424–33.
27. Amorim JH, Alves RPDS, Boscardin SB, Ferreira LCDS. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Res* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;181:53–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.001>
28. Lin C-F, Wan S-W, Chen M-C, Lin S-C, Cheng C-C, Chiu S-C, et al. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest*. 2008;88(10):1079–89.
29. Ho TS, Wang SM, Anderson R, Liu CC. Antibodies in dengue immunopathogenesis. *J Formos Med Assoc* [Internet]. Elsevier Taiwan LLC; 2013;112(1):1–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2012.11.009>
30. Lin C-F, Lei H-Y, Shiau a.-L, Liu H-S, Yeh T-M, Chen S-H, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol* [Internet]. 2002;169(2):657–64. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037100398&partnerID=40&md5=2b2b8da28d6a4a51d52e8f7575acd3ef>
31. Cheng HJ, Lei HY, Lin CF, Luo YH, Wan SW, Liu HS, et al. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Mol Immunol*. 2009;47(2-3):398–406.
32. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol*. 2003;69(1):82–90.
33. Falconar AKI. Antibody responses are generated to immunodominant ELK/KLE-type motifs on the nonstructural-1 glycoprotein during live dengue virus infections in mice and humans: Implications for diagnosis, pathogenesis, and vaccine design. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(5):493–504.
34. Immenschuh S, Rahayu P, Bayat B, Saragih H, Rachman A, Santoso S. Antibodies against dengue virus nonstructural protein-1 induce heme oxygenase-1 via a redox-dependent pathway in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med* [Internet].

- Elsevier; 2013;54:85–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.551>
35. Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015 Sep 9;7(304):304ra141–304ra141. Available from: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aaa3787>
 36. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015 Sep 9;7(304):304ra142–304ra142. Available from: <http://stm.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/scitranslmed.aaa3863>
 37. Gao G, Wang Q, Dai Z, Calcedo R, Sun X, Li G, et al. Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Hum Gene Ther*. 2008;19(9):927–36.
 38. Zhang YM, Hayes EP, McCarty TC, Dubois DR, Summers PL, Eckels KH, et al. Immunization of mice with dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. *J Virol*. 1988;62(8):3027–31.
 39. Falgout B, Bray M, Schlesinger JJ, Lai CJ. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol*. 1990;64(9):4356–63.
 40. Wu S-F, Liao C-L, Lin Y-L, Yeh C-T, Chen L-K, Huang Y-F, et al. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine*. 2003;21(25-26):3919–29.
 41. Amorim JH, Diniz MO, Cariri F a MO, Rodrigues JF, Bizerra RSP, Gonçalves AJS, et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine*. 2012;30(5):837–45.
 42. Huang S, Li I-H, Hong P, Yeh M. Evaluation of protective efficacy using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine-loaded microspheres against dengue 2 virus. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2013;8:3161–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3753149&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 43. Costa SM, Azevedo AS, Paes M V., Sarges FS, Freire MS, Alves AMB. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*. 2007;358(2):413–23.
 44. Henriques HR, Rampazo E V, Gonçalves AJS, Vicentin ECM, Amorim JH, Panatieri RH, et al. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013;7(7):e2330. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3715404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Chen M-C, Lin C-F, Lei H-Y, Lin S-C, Liu H-S, Yeh T-M, et al. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol.* 2009;183(3):1797–803.
 46. Wan SW, Lu YT, Huang CH, Lin CF, Anderson R, Liu HS, et al. Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural protein 1. *PLoS One.* 2014;9(3):1–11.
 47. Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing Vaccines Based on Biology of Human Dendritic Cell Subsets. *Immunity* [Internet]. 2010 Oct;33(4):464–78. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761310003675>
 48. Niezold T, Storcksdieck genannt Bonsmann M, Maaske A, Temchura V, Heinecke V, Hannaman D, et al. DNA vaccines encoding DEC205-targeted antigens: Immunity or Tolerance? *Immunology* [Internet]. 2015;n/a – n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imm.12467>
 49. Flacher V, Tripp CH, Haid B, Kissenpfennig A, Malissen B, Stoitzner P, et al. Skin Langerin+ Dendritic Cells Transport Intradermally Injected Anti-DEC-205 Antibodies but Are Not Essential for Subsequent Cytotoxic CD8+ T Cell Responses. *J Immunol* [Internet]. 2012;188(5):2146–55. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1004120>
 50. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* [Internet]. 2007 Jan 5;315(5808):107–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204652>
 51. Romani N, Flacher V, Tripp CH, Sparber F, Ebner S, Stoitzner P. Targeting skin dendritic cells to improve intradermal vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;351(1):113–38.
 52. Flacher V, Tripp CH, Stoitzner P, Haid B, Ebner S, Del Frari B, et al. Epidermal Langerhans cells rapidly capture and present antigens from C-type lectin-targeting antibodies deposited in the dermis. *J Invest Dermatol.* 2010;130(3):755–62.
 53. Cheong C, Choi JH, Vitale L, He LZ, Trumfheller C, Bozzacco L, et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood.* 2010;116(19):3828–38.
 54. Idoyaga J, Lubkin A, Fiorese C, Lahoud MH, Caminschi I, Huang Y, et al. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(6):2384–9.
 55. Boscardin SB, Hafalla JCR, Masilamani RF, Kamphorst AO, Zebroski HA, Rai U, et

- al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* Artic JEM [Internet]. 2006;00(3):599–606. Available from: www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20051639
56. Do Y, Koh H, Park CG, Dudziak D, Seo P, Mehandru S, et al. Targeting of LcrV virulence protein from *Yersinia pestis* to dendritic cells protects mice against pneumonic plague. *Eur J Immunol*. 2010;40(10):2791–6.
 57. Andrianov AK, Mutwiri G. Intradermal immunization using coated microneedles containing an immunoadjuvant. *Vaccine*. 2012. p. 4355–60.
 58. Taweekaisupapong S, Sriurairatana S, Angsubhakorn S, Yoksan S, Khin MM, Sahaphong S, et al. Langerhans cell density and serological changes following intradermal immunisation of mice with dengue 2 virus. *J Med Microbiol*. 1996;45(2):138–45.
 59. Clinical Trials. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01765426>
 60. Amorim JH, Pereira Bizerra RS, dos Santos Alves RP, Sbrogio-Almeida ME, Levi JE, Capurro ML, et al. A Genetic and Pathologic Study of a DENV2 Clinical Isolate Capable of Inducing Encephalitis and Hematological Disturbances in Immunocompetent Mice. *PLoS One*. 2012;7(9):1–12.
 61. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*. 2010;167(2):186–92.
 62. Amorim JH. Desenvolvimento de vacinas de subunidades contra a dengue baseadas no domínio III da proteína E e na proteína NS1 recombinantes. Universidade de São Paulo; 2013.
 63. Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*. 1967;6(7):1948–54.
 64. Porchia BFMM, Diniz MO, Cariri F a MO, Santana VC, Amorim JH, Balan A, et al. Purified herpes simplex type 1 glycoprotein D (gD) genetically fused with the type 16 human papillomavirus E7 oncoprotein enhances antigen-specific CD8⁺ T cell responses and confers protective antitumor immunity. *Mol Pharm*. 2011;8(6):2320–30.
 65. Bajorunaite E, Sereikaite J, Bumelis VA. L-arginine suppresses aggregation of recombinant growth hormones in refolding process from *E. coli* inclusion bodies. *Protein J*. 2007;26(8):547–55.
 66. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* [Internet]. 1986 Sep 23;25(19):5425–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430611>

67. 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* [Internet]. 2009 Jan;55(1):93–9. Available from: <http://femsim.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00506.x>
68. Tanjoni I, Evangelista K, Della-Casa MS, Butera D, Magalhães GS, Baldo C, et al. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha\beta 1$ integrin and collagen. *Toxicon* [Internet]. 2010 Jun;55(6):1093–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010109005790>
69. Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* [Internet]. 2014;4(1):235–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4030991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
70. De Bernardez Clark E. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 1998;9(2):157–63.
71. Das D, Mongkolaungkoon S, Suresh MR. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. 2009;66:66–72.
72. Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, Lin YL, Kuo MD, et al. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J Med Virol*. 2001;65(3):553–60.
73. Muller D a, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;98(2):192–208. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=23523765&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/doi/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>
74. Noisakran S, Dechtawewat T, Avirutnan P, Kinoshita T, Siripanyaphinyo U, Puttikhunt C, et al. Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. *J Gen Virol*. 2008;89(10):2492–500.
75. Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(19):8003–8.
76. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2004;22(11):1399–408.
77. Lodish H. *Molecular cell biology*. Macmillan; 2008.
78. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog*. 2004;20(5):1301–8.
79. Bajorunaite E, Cirkovas A, Radzevicius K, Larsen KL, Sereikaite J, Bumelis VA. Anti-

- aggregatory effect of cyclodextrins in the refolding process of recombinant growth hormones from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Int J Biol Macromol*. 2009;44(5):428–34.
80. Chen J, Liu Y, Wang Y, Ding H, Su Z. Different Effects of L -Arginine on Protein Refolding: Suppressing Aggregates of Hydrophobic Interaction, Not Covalent Binding. 2008;1365–72.
 81. St John RJ, Carpenter JF, Randolph TW. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13029–33.
 82. Gorovits BM, Horowitz PM. High hydrostatic pressure can reverse aggregation of protein folding intermediates and facilitate acquisition of native structure. *Biochemistry*. 1998;37(17):6132–5.
 83. Malavasi N V., Foguel D, Bonafe CFS, Braga C a C a, Chura-Chambi RM, Vieira JM, et al. Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model. *Process Biochem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;46(2):512–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.002>
 84. Perrett S, Zhou JM. Expanding the pressure technique: Insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 2002;1595(1-2):210–23.
 85. Mozhaev V V, Heremans K, Frank J, Masson P, Balny C. High pressure effects on protein structure and function. *Proteins*. 1996;24(1):81–91.
 86. Silva JL, Weber G. Pressure stability of proteins. *Annu Rev Phys Chem*. 1993;44:89–113.
 87. Rodrigues D, Farinha-Arcieri LE, Ventura AM, Chura-Chambi RM, Malavasi N V., Lemke LS, et al. Effect of pressure on refolding of recombinant pentameric cholera toxin B. *J Biotechnol*. 2014;173(1):98–105.
 88. Irie K, Mohan PM, Sasaguri Y, Putnak R, Padmanabhan R. Sequence analysis of cloned dengue virus type 2 genome (New Guinea-C strain). *Gene* [Internet]. 1989 Feb;75(2):197–211. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378111989902667>
 89. Costa SM, Paes M V., Barreto DF, Pinhão AT, Barth OM, Queiroz JLS, et al. Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine*. 2006;24(2):195–205.
 90. Athmaram TN, Saraswat S, Misra P, Shrivastava S, Singh AK, Verma SK, et al. Optimization of Dengue-3 recombinant NS1 protein expression in *E. coli* and in vitro refolding for diagnostic applications. *Virus Genes*. 2013;46(2):219–30.
 91. Allonso D, da Silva Rosa M, Coelho DR, da Costa SM, Nogueira RMR, Bozza FA, et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. *J Virol Methods*.

- 2011;175(1):109–16.
92. Pryor MJ, Wright PJ. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology* [Internet]. 1993 Jun;194(2):769–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389081>
 93. Parrish CR, Woo WS, Wright PJ. Expression of the NS1 gene of dengue virus type 2 using vaccinia virus. Dimerisation of the NS1 glycoprotein. *Arch Virol* [Internet]. 1991;117(3-4):279–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1826827>
 94. Wan S-W, Lin C-F, Chen M-C, Lei H-Y, Liu H-S, Yeh T-M, et al. C-Terminal Region of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Is Involved in Endothelial Cell Cross-Reactivity via Molecular Mimicry. *Am J Infect Dis*. 2008;4(1):85–91.
 95. Chen C-LL, Lin C-FF, Wan S-WW, Wei L-SS, Chen M-CC, Yeh T-MM, et al. Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies Cause NO-Mediated Endothelial Cell Apoptosis via Ceramide-Regulated Glycogen Synthase Kinase-3 beta and NF-kappa B Activation. *J Immunol* [Internet]. 2013;191(4):1744–52. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=biop39&NEWS=N&AN=PREV201300659844> \n <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84881416314&partnerID=40&md5=be61fdc5e26db3a4ed325277ea33f810>
 96. Lin C-F, Chiu S, Hsiao Y-L, Wan S, Lei H, Shiau A-L, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol* [Internet]. 2005;174(1):395–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15611263>

APÊNDICES – Artigos de Periódicos

APÊNDICE A - AMORIM, J. H.; ALVES, R. P. S.; BIZERRA, R.; PEREIRA, S. A.; **PEREIRA, L. R.** ; FABRIS, D. L. N. ; SANTOS, R. A.; ROMANO, C. M. ; FERREIRA, L. C. S. Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in a mouse encephalitis model. *Virology*. v. 487, p. 41-49, 2016.

APÊNDICE B - ALVES, R. P. S.; **PEREIRA, L.**; FABRIS, D. L. N.; SALVADOR, F. S.; SANTOS, R. A.; ZANOTTO, P. M. A.; ROMANO, C. M.; AMORIM, J. H.; FERREIRA, L. C. S. Production of a recombinant Dengue virus 2 NS5 protein and the potential use as a vaccine antigen. **Clinical and Vaccine Immunology**. 2016. doi: 10.1128/CVI.00081-16.

APÊNDICE A

Virology 487 (2016) 41–49



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro

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



Jaime Henrique Amorim^{a,*}, Rúbens Prince dos Santos Alves^a, Raíza Bizerra^a, Sara Araújo Pereira^a, Lennon Ramos Pereira^a, Denicar Lina Nascimento Fabris^a, Robert Andreata Santos^a, Camila Malta Romano^b, Luís Carlos de Souza Ferreira^{a,*}

^a Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, Brasil

^b Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias (IUMHC), Universidade de São Paulo, Brasil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2015

Returned to author for revisions

28 September 2015

Accepted 5 October 2015

Keywords:

Dengue

Nonstructural proteins

Immune response

T lymphocytes

Antibodies

ABSTRACT

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

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

APÊNDICE B

CVI Accepted Manuscript Posted Online 30 March 2016
 Clin. Vaccine Immunol. doi:10.1128/CVI.00081-16
 Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

1 **Production of a recombinant Dengue virus 2 NS5 protein and the**
 2 **potential use as a vaccine antigen**

3

4

5

6 Ribeiro Prince dos Santos Alves^a, Lennon Pereira^a, Denicar Lima Nascimento Fabris^a, Felipe

7 Scassi Salvador^b, Robert Andreato Santos^a, Paolo Marinho de Andrade Zanotto^c, Camila Malta

8 Romano^d, Jaime Henrique Amorim^{*#}, Luís Carlos de Souza Ferreira^{a*}

9

10 ^a-Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento
 11 de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

12 ^b-Instituto de Medicina Tropical, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo,
 13 SP, Brazil.

14 ^c-Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, Instituto de Ciências Biomédicas,
 15 Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

16 [#]- Present address: Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste
 17 da Bahia, Brazil.

18

19 *Corresponding authors. LCSF: lcsf@usp.br and JHA jaime.amorim@ufob.edu.br.