

**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

## 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 ( $\Delta$ 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  $\Delta$ 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 ( $\Delta$ 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  $\Delta$ 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.

# 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 $\gamma$  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. Ensaios clínicos 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. Ensaios clínicos 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).

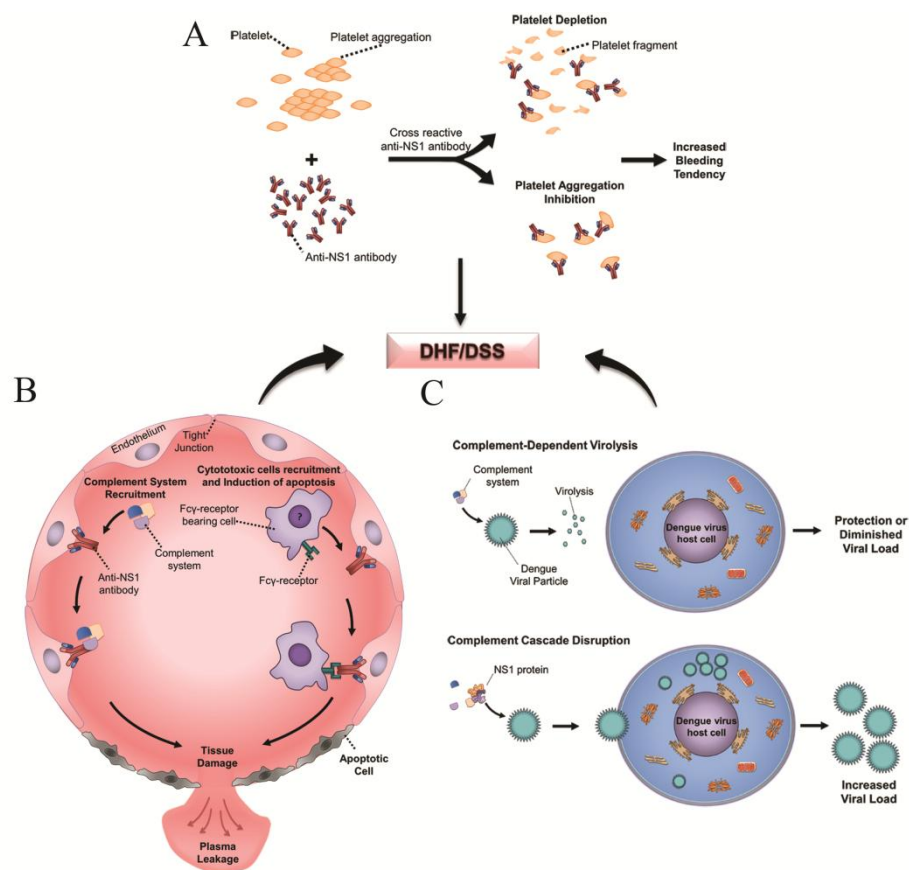
Associado a essa última observação, estratégias vacinais de subunidade tendo por base proteínas não estruturais do DENV representam uma alternativa atrativa, as quais não estão relacionadas ao fenômeno da ADE, sendo, portanto, seguras e promissoras.

### 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  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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 conseqüente processamento dos mesmos por estas células. Aproveitando-se desta propriedade um método eficiente desenvolvido para direcionar antígenos protéicos 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  $\alpha$ DEC205 e  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ DEC205 e  $\alpha$ 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- $\gamma$  (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 CONCLUSÕES

- As proteínas NS1-JHA1 e  $\Delta$ 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  $\alpha$ DEC e  $\alpha$ 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.00000000052>
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](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 CYD<sup>TM</sup> 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, Trumpfheller 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, Trumpfheller 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* [Internet]. 2006;00(3):599–606. Available from: [www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20051639](http://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. Taweekhaisupapong 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  $\alpha 2\beta 1$  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\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>