

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL - MG

RAISSA PRADO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE TRÊS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS,
CONSERVADOS E TETRAVALENTES DERIVADOS DOS DOMÍNIOS I E II DA
PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *Dengue virus*.**

Alfenas/MG

2015

RAISSA PRADO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE TRÊS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS,
CONSERVADOS E TETRAVALENTES DERIVADOS DOS DOMÍNIOS I E II DA
PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *Dengue virus*.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em Biociências Aplicadas à
Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Rocha, Raissa Prado

Avaliação do potencial vacinal de três peptídeos sintéticos, conservados e tetravalentes derivados dos domínios I e II da proteína do envelope do *Dengue virus* / Raissa Prado Rocha. -- Alfenas/MG, 2015.

76 f.

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

1. Dengue. 2. Peptídeos. 3. Vacina. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil.
II. Título.

CDD-616.9

RAISSA PRADO ROCHA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE TRÊS PEPTÍDEOS
SINTÉTICOS, CONSERVADOS E TETRAVALENTES DERIVADOS DOS
DOMÍNIOS I E II DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *Dengue virus*.

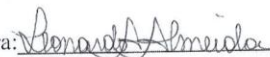
A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a
dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas
à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.
ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Aprovada em: 03 de agosto de 2015

Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura: 

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Dedico a Deus, minha família e todos que
contribuíram para o desenvolvimento
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus que em Sua infinita bondade me dá forças para seguir meus sonhos e enfrentar todos os desafios que são colocados à minha frente.

À Nossa Senhora que intercede por mim em todas as dificuldades.

À minha mãe, Stael, aos meus irmãos, Rafaela e Lucas, à minha tia, Érika, ao Julio e toda sua família por todo amor e por sempre torcerem por minha vitória.

Aos meus padrinhos, familiares e amigos por sempre acolherem meus sonhos e torcerem pela minha felicidade.

Ao meu pai, Júnior, que foi morar ao lado de Deus, por todo incentivo que me foi dado e por agora interceder por mim todos os dias de minha vida

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade que me foi dada todos esses anos e pela colaboração para meu crescimento profissional.

Ao Professor Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho por sua brilhante capacidade de ensinar e orientar, feitos com muita dedicação e humildade. Agradeço pela paciência e confiança depositada em meu trabalho por todos esses anos, que sem dúvidas contribuiu imensamente para minha formação profissional.

Ao Professor Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias por todo conhecimento transmitido e por diversas vezes compartilhar comigo sábios pensamentos e reflexões inspiradoras.

Aos professores, alunos e membros do Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde por todo conhecimento transmitido.

À CAPES e FAPEMIG pelo fomento à pesquisa.

Aos meus colegas e amigos, do Laboratório de Vacinas, em especial, à Andressa, Alessandra, Bianca, Gabriel, Isabella, Julianne, Julio, Lauana, Lauro, Luiz Gustavo, Marcílio, Michelle, Naiara, Paola, Stella por todo apoio que me foi dado e por compartilharmos grandes momentos todos esses anos.

Aos professores, técnicos e funcionários dos laboratórios de Vacinas e Microbiologia da UNIFAL-MG.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

“Tudo posso Naquele que me fortalece”.
Filipenses 4:13

RESUMO

A dengue é uma arbovirose que tem se destacado nos últimos anos como um grave problema de saúde pública no Brasil. O *Dengue virus* (DENV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e seu genoma é composto de uma fita RNA, com polaridade positiva. Atualmente são conhecidos cinco sorotipos de DENV, os quais são geneticamente e antígenicamente distintos. O desenvolvimento de uma vacina que confira imunidade simultânea, eficiente e duradoura, contra os cinco sorotipos do DENV é considerado prioritário diante a magnitude do problema. Desta forma, neste estudo foi avaliado o potencial vacinal de três peptídeos (PEP01, PEP02 e PEP03) tetravalentes, sintéticos e conservados derivados da proteína do envelope do DENV. Um ensaio de ELISA indireto revelou a reatividade de amostras de soros humanos IgM/IgG positivos para dengue contra os peptídeos sintéticos. Ensaio de imunização em modelo murino mostraram que estes peptídeos foram capazes de induzir a produção de anticorpos específicos. Entretanto, os ensaios de neutralização mostraram ausência ou um baixo título de anticorpos neutralizantes. As células do baço derivadas de camundongos imunizados com os peptídeos mostraram uma alta produção de IL-10 e uma redução da produção do TNF- α e IFN- γ após a infecção com todos os sorotipos DENV quando comparado ao controle positivo. Em adição, células provenientes de camundongos imunizados com os peptídeos PEP02 e PEP03 apresentaram in vitro uma redução significativa da viabilidade celular após a infecção com os quatro sorotipos de DENV. A fim de se buscar um candidato vacinal para a dengue, foi expressa em sistema procarioto uma proteína recombinante (PEPDENV) que contém as sequências de PEP01, PEP02 e PEP03 fusionadas a uma sequência específica capaz de induzir de anticorpos neutralizantes. A imunização com a proteína PEPDENV revelou a imunogenicidade desta proteína ao induzir alta produção de anticorpos IgG1 em modelo murino, porém os soros não apresentaram atividade de neutralização da partícula viral. Ensaio imunoenzimáticos utilizando os peptídeos como substratos mostraram que os soros dos animais imunizados com PEPDENV tem capacidade de reconhecer os peptídeos, apresentando especialmente uma alta reatividade com o PEP03. Esses resultados sugerem que a ausência de atividade neutralizante dos anticorpos ocorreu pelo fato de que a resposta imune à proteína PEPDENV está mais direcionada para PEP03 do que para outras regiões da molécula, confirmando a imunogenicidade deste peptídeo. No entanto, mais estudos que visam modificar a sequência peptídica serão necessários para induzirem a produção de uma resposta imune eficaz contra todos os quatro sorotipos de DENV e também para melhorar a imunogenicidade deste candidatos vacinais.

Palavras-chave: Dengue. Peptídeo. Vacina.

ABSTRACT

Dengue is an arbovirus that has distinguished itself in recent years as a serious public health problem in Brazil. The *Dengue virus* (DENV) belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* and its genome is composed of a single stranded RNA with positive polarity. Currently, there are five serotypes of DENV, which are genetically and antigenically distinct. The development of a vaccine that confers simultaneous, efficient and lasting immunity against the five serotypes of DENV is a priority given the magnitude of the problem. In this study, we evaluated the vaccine potential of three synthetic, conserved and tetravalent peptides (PEP01, PEP02 and PEP03) derived from the envelope protein. An indirect ELISA assay showed the reactivity of Dengue IgM/IgG human positive serum samples against the synthetic peptides. Immunization assays in mice have shown that these peptides were able to induce the production of specific antibodies. However, the neutralization assays showed absence or lower titers of neutralizing antibodies. The spleen cells derived from mice immunized with the peptides showed a high IL-10 expression and reduced expression of TNF- α and IFN- γ after infection for all DENV serotypes when compared with the positive control. In addition, cells from mice immunized with the PEP02 and PEP03 peptides present, in vitro, a significant reduction of cell viability after infection with the four DENV serotypes. To continue the evaluation of this vaccine candidate for dengue, it was expressed in prokaryote system a recombinant protein (PEPDENV) containing sequences of the PEP01, PEP02 and PEP03 fused to a specific sequence able to induce neutralizing antibodies. Immunization with PEPDENV protein showed the immunogenicity of this protein in inducing high production of IgG1 antibodies in mice, however the sera of immunized animals showed no neutralizing activity of the viral particle. Immunoenzymatics assay using the peptides as the substrates showed that the sera of immunized animals with PEPDENV were able to recognize the peptides, with a high reactivity to PEP03. These results suggest that the lack of neutralizing activity of the antibodies may be due to an immune response more directed to the PEP03 than to the other regions of the molecule, confirming the immunogenicity of this peptide. However, further studies aimed at modifying the peptide sequence will be required to induce the production of an effective immune response against all four serotypes of DENV and also to enhance the immunogenicity of these vaccine candidates.

Keywords: Dengue. Peptide. Vaccine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação da partícula viral do <i>Dengue virus</i>	17
Figura 2 -	Representação da estrutura dimérica da proteína E do <i>Dengue virus</i>	18
Figura 3 -	Representação do genoma e das principais proteínas do <i>Dengue virus</i> ...	19
Figura 4 -	Esquema do ciclo de multiplicação do <i>Dengue virus</i>	21
Figura 5 -	Predominância da Dengue no mundo, 2014.....	22
Figura 6 -	Figura esquemática representando a hipótese do Aumento da infecção mediada por Anticorpos (ADE).....	26
Figura 7 -	Representação dos seis resíduos de aminoácidos na proteína E do DENV descritos por Mazumder e colaboradores.....	33
Figura 8 -	Sequência de aminoácidos da proteína PEPDENV.....	39
Figura 9 -	Plasmídeo de expressão do proteínas pQE 30.....	42
Figura 10 -	Reatividade de amostras de soro humanas IgM/IgG positivas para dengue contra os peptídeos sintéticos.....	46
Figura 11 -	Resposta de anticorpos em camundongos imunizados com PEP01, PEP02 e PEP03.....	48
Figura 12 -	Produção de citocinas e atividade citotóxica em esplenócitos infectados com todos os sorotipos de DENV.....	50
Figura 13 -	Eletroforese em gel de agarose para verificação da presença da sequência codificadora da PEPDENV em plasmídeos pTrcHis inseridos em bactérias <i>E. coli</i> Top 10.....	51
Figura 14 -	PCR utilizando os oligos pQE para verificação da presença do inserto (PEPDENV) em bactérias <i>E. coli</i> JM109 transformados com o vetor pQE30.....	52
Figura 15 -	Digestão do plasmídeo recombinante pQE30/PEPDENV com enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.....	53
Figura 16 -	Resultado do sequenciamento dos plasmídeos recombinantes.....	54
Figura 17 -	Figura representativa da indução à expressão da proteína recombinante PEPDENV para clones recombinantes 1, 2, 3 e 4	55
Figura 18 -	Purificação da proteína recombinante PEPDENV em coluna de Quelato de Níquel.....	55

Figura 19 -	Resposta de anticorpos em camundongos imunizados com PEPDENV..	56
Figura 20 -	Avaliação da reatividade dos soros dos animais imunizados com PEPDENV com os peptídeos sintéticos (PEP01, PEP02 e PEP03).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Nova classificação dos casos de Dengue, Brasil 2014.....	23
Tabela 2 -	Sequências de aminoácidos dos peptídeos.....	33
Tabela 3 -	Títulos de anticorpos IgM e IgG total no soro de camundongos Swiss após imunização com os peptídeos sintéticos.....	47
Tabela 4 -	Títulos de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos Swiss imunizados com peptídeos sintéticos ou infectados com DENV-1.....	49
Tabela 5 -	Títulos de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos Swiss imunizados com a proteína PEPDENV ou infectados com DENV-1.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE	- Aumento da Infecção Mediada por Anticorpos
BHK	- Células de Rim de Hamster Bebê
C6/36	- Células de Glândula Salivar de <i>Aedes albopictus</i>
D	- Domínio
DCSA	- Dengue com sinais de alarme
DENV	- <i>Dengue virus</i>
DG	- Dengue grave
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DO	- Densidade óptica
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
ELISA	- Ensaio da Imunoadsorção Enzimática
FD	- Febre do dengue
FHD	- Febre hemorrágica do dengue
His	- histidina
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
IFN	- Interferon
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IL	- Interleucina
IPTG	- β -D-thiogalactoside
Kb	- Kilobase
LB	- Luria Broth
MCP-1	- Proteína quimiotática de monócitos 1
MEM	- Meio Essencial Mínimo
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	- Mililitro
Mock	- Sobrenadante de células C6/36 não infectadas
MOI	- Multiplicidade de infecção
MTT	- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ng	- Nanogramas
nm	- Nanômetro

NS	- Não estrutural
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPD	- Dicloridrato de O-Fenilendiamina
PBS	- Salina Fosfatada Tamponada
PBS-T	- Salina Fosfatada Tamponada acrescida de Tween 20
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
Pep	- Peptídeo
pfu	- Unidades Formadoras de Placa
pH	- Potencial Hidrogeniônico
prM	- Precursora de Membrana
PRNT	- Teste de Neutralização por Redução de Placa
Proteína C	- Proteína do Capsídeo
Proteína E	- Proteína do Envelope
Proteína M	- Proteína de Membrana
RBS	- Região de Ligação ao Ribossomo
RE	- Retículo Endoplasmático
RNA	- Ácido Ribonucléico
rpm	- Rotações por Minuto
SCD	- Síndrome do Choque da dengue
TGN	- Trans-Golgi
TNF	- Fator de Necrose Tumoral Alfa
U	- Unidades Enzimáticas
UTR	- Região não traduzida
v/v	- Volume a Volume
μL	- Microlitro
μm	- Micrômetro
μg	- Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	<i>Dengue virus</i>	16
2.2	CICLO DE MULTIPLICAÇÃO.....	19
2.3	DENGUE: EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÊNESE.....	22
2.5	VACINAS PARA A DENGUE.....	26
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL.....	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5	METODOLOGIA	32
5.1	SELEÇÃO E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS.....	32
5.2	ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) UTILIZANDO OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COMO ANTÍGENO.....	33
5.3	PRODUÇÃO DE <i>Dengue virus</i> 1, 2, 3 E 4.....	34
5.4	TITULAÇÃO VIRAL.....	34
5.5	ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO.....	35
5.6	ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO E TITULAÇÃO DE ANTICORPOS IgM, IgG TOTAL, IgG1 E IgG2a ANTI-PEPTÍDEOS OU PEPDENV.....	36
5.7	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES POR SORONEUTRALIZAÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL.....	37
5.8	OBTENÇÃO DE ESPLÊNOCITOS E ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	37
5.9	DOSAGEM DE CITOCINAS IL-5, IL-10, TNF- α E IFN- γ EM SOBRENADANTES DE ESPLÊNOCITOS.....	38
5.10	SÍNTESE DO GENE SINTÉTICO CODIFICADOR DA PROTEÍNA PEPDENV.....	38
5.11	CLONAGEM DA SEQUÊNCIA OBTIDA POR PCR.....	40

5.12	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	40
5.13	SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES POR PCR.....	40
5.14	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP).....	41
5.15	DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DA DIGESTÃO.....	41
5.16	CLONAGEM EM PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO pQE 30 E TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS <i>E. coli</i> JM109.....	42
5.17	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. coli</i> E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	43
5.18	SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	44
5.19	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
6	RESULTADOS	46
6.1	AVALIAÇÃO DE RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELOS PEPTÍDEOS.....	46
6.2	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	51
6.3	ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA PROTEÍNA RECOMBINANTE PEPDENV.....	56
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril transmitida pela picada de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* infectados com o *Dengue virus*. Esta doença é endêmica em mais de 100 países e aproximadamente 40% da população mundial vive em áreas de risco. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sua incidência aumentou trinta vezes em 50 anos (World Health Organization - WHO, 2009). No Brasil, a dengue tem se destacado nos como um grave problema de saúde pública, gerando preocupação por parte das autoridades e de todos os brasileiros (FERREIRA et al., 2009).

O *Dengue virus* (DENV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e atualmente são caracterizados cinco sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; POOJA; AMRITA; VINEY, 2014). A infecção pelo DENV possui um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo na maioria das vezes apresentada de forma assintomática. Quando apresentada sintomaticamente, é classificada em Febre indiferenciada, Febre do Dengue (FD) Febre hemorrágica do dengue (FHD). (WHO, 2009).

Apesar dos esforços da comunidade científica, não se dispõe atualmente de uma vacina licenciada. Vários trabalhos apontam o uso de proteínas do DENV como imunógenos, principalmente a proteína do envelope (proteína E) (MAZUMDER et al., 2007). Entretanto, a existência de quatro sorotipos diferentes, os quais apresentam variações genéticas e antigênicas, e a alta taxa de mutação nos genes que codificam a proteína E, levam a uma dificuldade na obtenção de um candidato vacinal. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de se buscar regiões conservadas da proteína E entre os sorotipos visando-se obter novos alvos para o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Após a revisão crítica da literatura, neste tópico serão apresentadas as principais descobertas no estudo da dengue que serão pertinentes para o desenvolvimento do trabalho.

2.1 *Dengue virus*

O *Dengue virus* (DENV) é um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*. Atualmente são conhecidos cinco sorotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5), os quais são geneticamente e antígenicamente distintos (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; NORMILE, 2013; POOJA; AMRITA; VINEY, 2014). Porém, devido à recente descoberta do DENV-5, este ainda necessita de melhor caracterização. A transmissão do vírus para os seres humanos é dada através da picada de mosquitos hematófagos principalmente da espécie *Aedes aegypti* (POOJA; AMRITA; VINEY, 2014).

O DENV apresenta partícula viral envelopada, com tamanho aproximado de 50 nanômetros (nm) de diâmetro. Seu genoma é constituído por RNA de fita simples com polaridade positiva e tamanho aproximado de 11 kilobases (Kb), o qual codifica uma única poliproteína que deve ser processada para dar origem a três proteínas estruturais (proteína do Capsídeo - C, proteína de Membrana - M e proteína do Envelope - E) e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). O genoma viral é envolvido por um capsídeo proteico formado pela proteína C e este envolto por uma membrana lipídica, onde se encontram inseridas as proteínas E e M (Figura 1) (DEL ANGEL; VALLE, 2013; LINDENBACH; RICE, 2003).

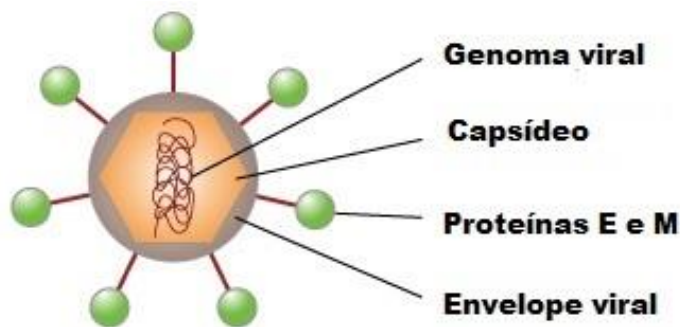


Figura 1 – Representação da partícula viral do *Dengue virus*.

Fonte: Adaptado de NATURE EDUCATION, 2011.

Disponível em:

<http://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/22401481/2_1.jpg>. Acesso em: 17 ago. 2015.

Nota: Figura esquemática da partícula viral apresentando o genoma viral, o capsídeo, as proteínas de superfície (M- Membrana, E- Envelope) e o envelope viral.

A proteína do capsídeo possui massa de 11 Kilodalton (KDa). Com caráter altamente básico, esta proteína possui resíduos carregados encontrados nas extremidades amina e carboxi terminais e participa da formação do complexo ribonucleoprotéico através do empacotamento do RNA genômico (LINDENBACH; RICE, 2003; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; URBANOWSKI; ILKOW; HOBMAN, 2008).

A proteína precursora de membrana (prM) é uma proteína glicosilada de massa aproximada de 21 KDa. O processamento da prM ocorre durante a maturação e no processo de liberação das partículas virais por exocitose. A clivagem da proteína prM por proteases do tipo furina permite a liberação do fragmento pr, a dimerização da proteína M (8 KDa) e seu ancoramento no envelope viral. O segmento pr permanece associado à partícula viral até que este seja liberado da célula infectada (LINDENBACH; RICE, 2003; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A proteína E é a proteína do DENV mais caracterizada. Sua estrutura tridimensional (Figura 2) é formada por um complexo dimérico com duas subunidades iguais, sendo subdividida em três domínios distintos: o domínio I (DI), ou domínio central, com aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos, o qual está envolvido na mudança conformacional gerada por alterações no pH. O domínio II (DII), ou também chamado de domínio de dimerização, possui uma alça altamente conservada que funciona como um peptídeo de fusão interna, desempenhando um papel importante na fusão do envelope viral à membrana endossomal. O domínio III (DIII) está envolvido com a ligação aos receptores

celulares e é responsável pela indução de elevados títulos de anticorpos neutralizantes específicos anti-DENV (HUANG et al., 2010; REY et al., 1995).

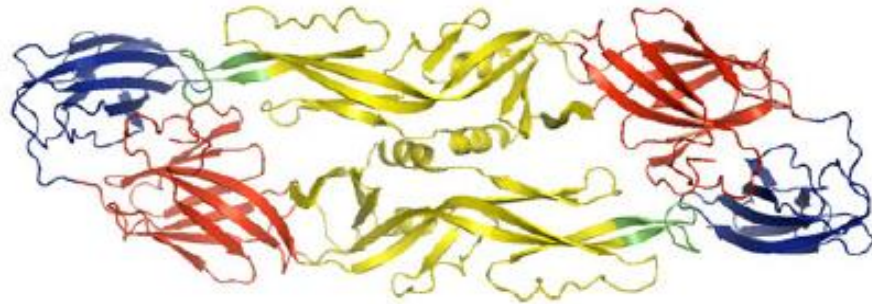


Figura 2 – Representação da estrutura dimérica da proteína E do *Dengue virus*.
 Fonte: RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, (2010, p. 2774).
 Nota : Em vermelho, o domínio I, em amarelo, domínio II com a alça de fusão em verde e em azul, domínio III.

Os anticorpos contra a proteína E se ligam em epitopos existentes em toda a superfície externa da mesma. Os anticorpos neutralizantes podem levar à dissociação do dímero de proteína E, impedindo as alterações conformacionais que levam à formação dos trímeros da molécula no endossomo, como também, ligando à região carboxi terminal da proteína E, obstruindo o sítio de ligação desta proteína ao receptor da membrana celular (CHAMBERS et al., 1997; REY et al., 1995).

As proteínas não estruturais do DENV estão envolvidas com a replicação viral, a montagem e a modulação da resposta imune. A proteína NS1 possui aproximadamente 46 KDa e pode ser encontrada no interior, na superfície ou ainda pode ser secretada para o meio extracelular da célula do hospedeiro. Esta proteína é altamente conservada entre os sorotipos de DENV, está envolvida na replicação viral e na inibição da resposta imune do hospedeiro mediada por complemento (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; LINDENBACH e RICE, 2003). Estudos apontam que o aumento NS1 solúvel no soro está relacionado com o aumento da viremia e gravidade da doença (PAWITAN, 2011).

A NS2a (22 KDa) é uma proteína de membrana de caráter hidrofóbico e é necessária para replicação e montagem do vírus, enquanto NS2B (14 KDa) é uma proteína associada à membrana que atua como cofator para atividade enzimática de NS3. A proteína NS3, de massa de 70 KDa, possui diversas atividades enzimáticas e está envolvida no processamento da poliproteína viral e na replicação do RNA viral. NS4a e NS4b são proteínas de massa 16 e 27 KDa, respectivamente. NS4a está envolvida no rearranjo da membrana e induz aumento da replicação viral, enquanto NS4b tem capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro

suprimindo as vias de sinalização de interferon α/β e tem atividade helicase de NS3. A proteína NS5 possui peso molecular de 103 KDa e contém domínios com atividade metiltransferase e RNA polimerase dependente de RNA, estando portanto, envolvida na replicação do RNA e possuindo também atividade de revestimento (cap) do RNA viral (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014; LINDENBACH; RICE, 2003). As principais proteínas do DENV citadas anteriormente estão representadas na Figura 3.

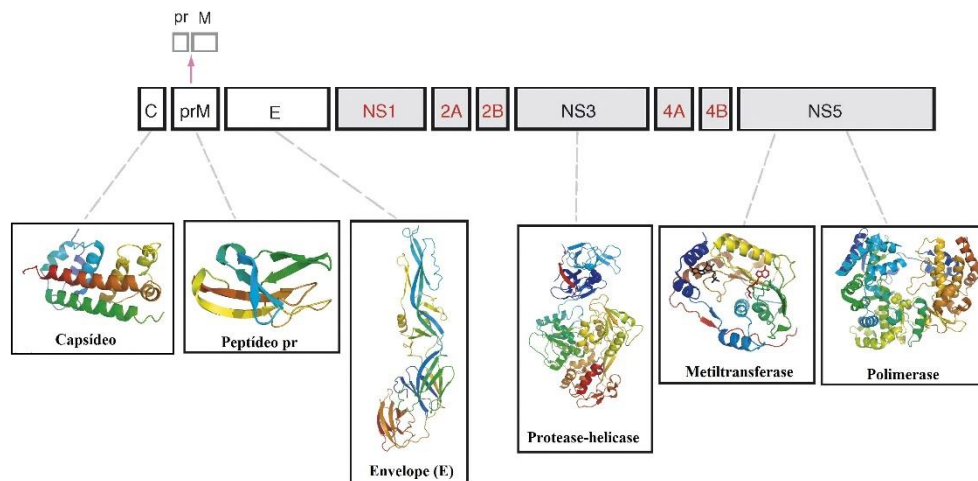


Figura 3 – Representação do genoma e das principais proteínas do *Dengue virus*.
Fonte: Adaptado de PERERA; KUHN, (2008, p.370).

2.2 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO

Ao ser inoculado no hospedeiro através da picada de mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Aedes* sp, o DENV se adere às células alvo, através da interação de sua proteína E com receptores de células de linhagens fagocíticas mononucleares tais como, monócitos, macrófagos e células dendríticas (incluindo células de Langerhans residentes na pele). Diversos trabalhos apontam que esta interação se dá com receptores DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), receptores de manose, várias glicoproteínas (como por exemplo Sulfato de Heparina) e o receptor do tipo lectina C (CLEL5A) (BACK; LUNDKVIST, 2013; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

Esta interação ocasiona a formação de uma vesícula endocítica que permite a penetração do vírus na célula (HEINZ; STIASNY, 2012; RODENHUIS-ZYBERT;

WILSCHUT; SMIT, 2010). A acidificação da vesícula ($\text{pH} < 6,5$) induz uma alteração conformacional da proteína E, favorecendo assim o rearranjo dos dímeros de proteína E para trímeros. Este fenômeno propicia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal e permite a liberação do capsídeo no citoplasma da célula juntamente com o RNA viral. O RNA viral é então traduzido em uma poliproteína no citoplasma e na superfície do retículo endoplasmático rugoso, a qual é clivada por proteases celulares. Após a tradução da proteína, inicia-se a replicação do genoma viral (Figura 4) (HEINZ; STIASNY, 2012; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

O RNA é novamente sintetizado e subsequentemente empacotado pela proteína C para formar um capsídeo. As proteínas prM e E formam heterodímeros que são orientados para dentro do lúmen do retículo endoplasmático. A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE) conduzindo à formação de partículas imaturas não infecciosas, que são transportadas através da via exocítica da célula. O pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) provoca um rearranjo das proteínas do envelope, o que favorece a clivagem da proteína prM pela protease celular furina em fragmentos denominados de pr e M. Desta forma, a partícula viral torna-se madura, e o vírus é liberado para o meio extracelular (HEINZ; STIASNY, 2012; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

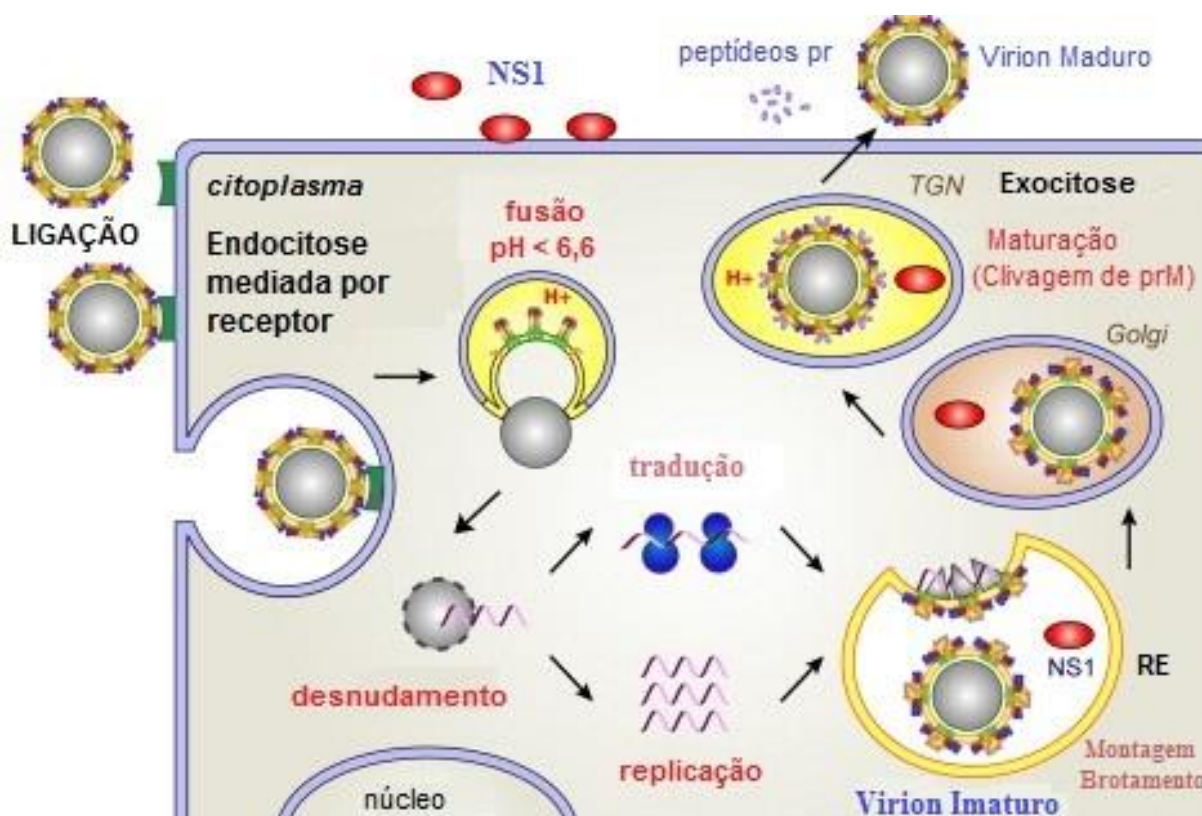


Figura 4 – Esquema do ciclo de multiplicação do *Dengue virus*.
 Fonte: Adaptado de HEINZ; STIASNY, (2012, p. 4303).

2.3 DENGUE: EPIDEMIOLOGIA

A dengue é endêmica em mais de 100 países da África, das Américas, de Regiões do Leste Mediterrâneo, Sudeste da Ásia e Oeste do Pacífico (Figura 5). Atualmente, mais de 2,5 bilhões de pessoas, o que corresponde a aproximadamente 40% da população mundial, vivem em áreas de risco para dengue. Segundo a OMS a incidência da dengue aumentou trinta vezes em 50 anos (WHO, 2009).

Estudos realizados no ano de 2013 estimaram que 390 milhões de pessoas foram infectadas pelo DENV e 96 milhões de pessoas manifestaram a doença no mundo todo, superando as estimativas da OMS. Estatísticas revelaram que em 2013 foram reportados 2,35 milhões de casos apenas nas Américas, sendo 37.687 dos casos com manifestações graves da dengue (GUZMAN; HARRIS, 2014; WHO, 2014; POOJA; AMRITA; VINEY, 2014).

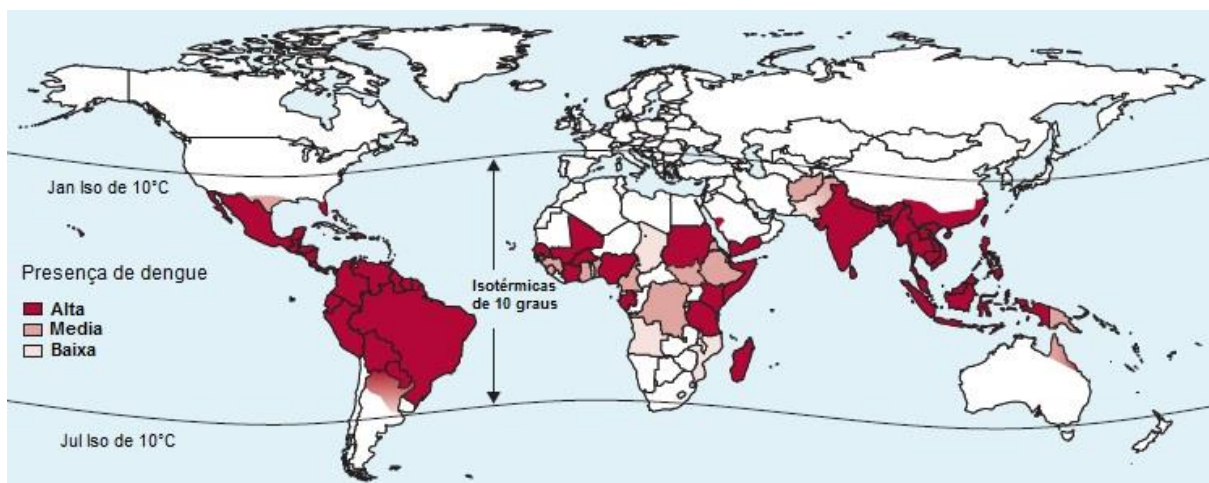


Figura 5 – Predominância da Dengue no mundo, 2014.
 Fonte: Adaptado de GUZMAN; HARRIS, 2014.

O clima do Brasil tem propícia condições favoráveis para o desenvolvimento e sobrevivência do vetor *Aedes Aegypti*, uma vez que o país se localiza em região tropical com o clima caracterizado por altas temperaturas, alta humidade e variações sazonais de chuva. Outro fator relevante é que no país existe circulação simultânea dos quatro sorotipos do DENV, o que pode favorecer o desenvolvimento das formas mais graves de manifestação da dengue (PASTRANA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2013).

Segundo o Boletim Epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde, foram notificados em 2015 até a semana epidemiológica 15 (04/01/2015 à 18/04/2015), 745.957 casos prováveis de dengue em todo o Brasil, superando significativamente os casos registrados em todo ano de 2014. O Boletim relatou 404 casos de dengue grave e 5.771 casos de dengue com sinais de alarme, ocasionando 229 óbitos, o que representa um aumento no país de 45% em comparação com o mesmo período de 2014, quando foram confirmados 158 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

De acordo com os isolamentos virais realizados no ano de 2015, 2.621 amostras foram positivas para o DENV, sendo o sorotipo viral mais frequente o DENV-1 (92,7%), seguido de DENV-4 (6,4%), DENV-2 (0,6%) e DENV-3 (0,2%). A distribuição dos sorotipos isolados em Minas Gerais a partir da análise de 1.438 amostras positivas demonstrou a presença de DENV-1 (98,8%) e DENV-4 (1,2%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOGÊNESE

A dengue possui um amplo espectro de apresentações clínicas, sendo na maioria das vezes apresentada de forma assintomática. Quando manifestada sintomaticamente a doença pode se apresentar como Febre indiferenciada, Febre do Dengue (FD) e a forma mais grave, denominada de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD). A FHD, quando apresentada nos graus de severidade III e IV, é definida como Síndrome do Choque da Dengue (SCD) (WHO, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil adotou em 2014 uma nova classificação de casos de dengue sugerida pela OMS. Os casos são classificados como Dengue Provável, Dengue com Sinais de Alarme (DCSA) e Dengue Grave (DG) conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Nova classificação dos casos de Dengue, Brasil 2014.

(Continua)

Dengue Provável

O indivíduo vive ou tenha viajado para área endêmica, e apresente duas ou mais das seguintes manifestações:

- Náusea, vômitos;
- Exantema;
- Mialgias, artralgia;
- Cefaléia, dor retroorbital;
- Petéquias ou prova do laço positiva;
- Leucopenia.

Dengue com Sinais de Alarme

Tratam-se dos casos em que no período de fervescência da febre apresenta um ou mais dos seguintes sinais de alarme:

- Dor abdominal intensa e contínua, ou dor a palpação do abdômen;
- Vômitos persistentes;
- Acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico);
- Sangramento de mucosas;
- Letargia ou irritabilidade;
- Hipotensão postural (lipotímia);
- Hepatomegalia maior do que 2 cm;
- Aumento progressivo do hematócrito.

Tabela 1 – Nova classificação dos casos de Dengue, Brasil 2014.

(Conclusão)

Dengue Grave

São todos os caso de dengue que apresentem um ou mais dos seguintes resultados:

- Choque, extremidades frias;
- Pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mm hg;
- Hipotensão arterial;
- Acúmulo de líquidos com insuficiência respiratória;
- Sangramento grave, segundo a avaliação do médico;

Comprometimento grave de órgãos tais como: dano hepático importante (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase >1000), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos.

Fonte: Adaptado de WHO, 2009.

As diversas formas de manifestações da doença podem estar relacionadas a diversos fatores como características do próprio vírus, carga viral e fatores relacionados ao hospedeiro como idade, estado nutricional, características imunológicas e genéticas (PAWITAN, 2011). Existe dentro de cada sorotipo, uma variação genotípica a qual está relacionada à capacidade inerente de determinados sorotipos de serem mais virulentos do que outros, embora a infecção por qualquer dos sorotipos do DENV possa levar à manifestações graves (KING; ANDERSON; MARSHAL, 2002).

O quadro clássico da febre da dengue caracteriza-se por febre alta, de início abrupto, acompanhada por cefaleia, mialgia, dor retroorbital, náuseas, exantema macular ou maculopapular e petéquias. (GARCIA-RIVERA; RIGAU-PEREZ, 2002; GREGSON; EDELMAN, 2003; LINDBÄCK et al., 2003).

A febre hemorrágica do dengue é uma forma da doença aguda, potencialmente fatal, cujas características clínicas estão relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular acompanhado por trombocitopenia, alteração da homeostase, danos no fígado indicado pelos aumentos séricos das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. Ainda se observa níveis elevados de citocinas pró inflamatórias no soro de pacientes e a outros mediadores produzidos por células fagocíticas (HALSTEAD et al., 2007).

A FHD pode evoluir para a SCD, sendo esta a forma mais grave de manifestação da dengue iniciando-se por dor abdominal intensa e apresentando sinais de insuficiência circulatória com pulso rápido e fraco, diminuição da pressão ou hipotensão, reperfusão capilar

prolongada, pele fria e úmida e agitação. O choque acontece rapidamente, podendo levar em 24 horas o paciente ao óbito ou a uma recuperação acompanhada por reposição adequada de fluidos e eletrólitos (SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007).

A patogênese da dengue é marcada pelo aumento da permeabilidade vascular e danos teciduais ocasionadas por uma cascata de citocinas e mediadores imunes em resposta à presença do DENV. Estudos clínicos em pacientes com FHD/SCD apresentaram altos teores séricos de interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, Proteína quimiotática de monócitos- 1 (MCP-1), interferon gama (IFN- γ), interferon alfa (IFN- α) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (AZEREDO et al., 2001; BASU; CHATURVEDI, 2008; BOZZA, 2008; CHAKRAVARTI; KUMARIA, 2006; DONG et al., 2007; Green et al., 1999; HOBBER et al., 1993; KURANE et al., 1991; SHRESTA et al., 2006; SUHARTI et al., 2003 apud RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

Diversos mecanismos têm sido estudados a fim de se entender a patogênese da FHD/SCD, principalmente em infecções secundárias causadas pelo DENV. Pesquisas apontam para duas teorias que tentam explicar tal fenômeno: a) Aumento da infecção mediada por anticorpos e b) Células T de reação cruzada (RAMAKRISHNAN; PILLAI; NAIR, 2015).

A proteção homóloga após a infecção primária causada pelo mesmo sorotipo é duradoura, porém a taxa de proteção cruzada contra outros sorotipos é inexistente ou de curta duração e pode ocasionar um aumento da infecção pelo DENV mediada por anticorpos (ADE) (Figura 6) (HEINZ; STIASNY, 2012). Experimentos *in vitro* mostraram que ocorre ADE em uma variedade de células primárias e em várias linhagens celulares como células dendríticas plasmocitóides humanas, maduras e monócitos (SUN; KOCHER, 2013).

A teoria sugere que uma segunda infecção com um sorotipo heterólogo de DENV pode levar ao desenvolvimento da FHD. Este fenômeno pode ser explicado pela presença de anticorpos não neutralizantes preexistentes que se ligam às partículas virais e favorecem a infecção de células que possuem receptor para imunoglobulina do tipo FC γ RII. Este evento leva a um aumento da replicação do vírus no interior destas células, com consequente aumento da viremia. Ainda se observa uma elevada produção a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α), o aumento da permeabilidade vascular e indução de apoptose induzida pela ADE (SUN; KOCHER, 2013; WHITEHEAD et al., 2007).

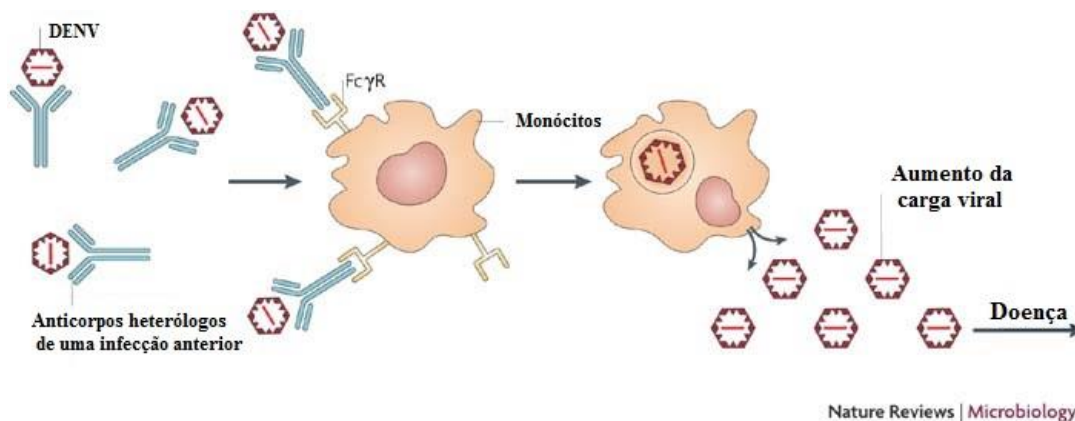


Figura 6 – Figura esquemática representando a hipótese do Aumento da infecção mediada por Anticorpos (ADE).

Fonte: Adaptado de WHITEHEAD et al. (2007, p.524).

Vários trabalhos apontam que a patogênese da FHD pode também estar relacionada à ativação de células T que apresentam um fenótipo anormal de produção de citocinas. A teoria de células T de reação cruzada preconiza que em uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo, ocorre uma ativação preferencial de linfócitos TCD4 e TCD8 de memória produzidos na infecção anterior por um sorotipo diferente, levando a uma resposta imune ineficaz caracterizada pela presença de linfócitos TCD8 com degranulação subótima e alta produção de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α . Este fenômeno leva a uma falha da eliminação da célula infectada, um maior dano tecidual e portanto, predispõe o hospedeiro à desenvolver as formas mais graves da dengue (SUN; KOCHER, 2013; ROTHMAN, 2011).

2.5 VACINAS PARA A DENGUE

Os esforços para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue foram iniciados há mais de 50 anos, quando se reconheceram os casos graves da doença e desde a década de 70 a OMS tem dado prioridade para a obtenção destas vacinas. O conhecimento sobre a resposta imune para os diversos sorotipos da dengue é determinante para que se possam desenvolver vacinas seguras e eficazes contra a dengue. Porém, não se dispõe atualmente de uma vacina licenciada, apesar de todos os esforços de pesquisa para a sua produção e desenvolvimento.

Os quatro sorotipos do DENV apresentam uma variação de aproximadamente 30% em seus genomas, o que leva às variações antigênicas acarretando no reconhecimento de diferentes epítopos na montagem de uma resposta imunológica para os diferentes sorotipos.

Uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo pode levar à produção de anticorpos com baixa atividade neutralizante e com capacidade de facilitar a infecção pelo DENV. Em adição, células T de reação cruzada podem ser ativadas, levando a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Ambos os mecanismos descritos podem levar às formas mais severas de manifestação da dengue e devem ser evitados no desenvolvimento de uma vacina para a dengue (GUZMAN; HARRIS, 2014; ROBERTS; MONGKOLSAPAYA; SCRETON, 2013; ROTHMAN, 2011).

Desta forma, existe a necessidade de se obter um candidato vacinal seguro que seja capaz de conferir uma resposta imune aos quatro sorotipos de maneira simultânea, equilibrada e duradoura para que evite o desencadeamento dos mecanismos levem às patologias da dengue (GUZMAN; HARRIS, 2014; ROBERTS; MONGKOLSAPAYA; SCRETON, 2013; ROTHMAN, 2011).

Atualmente, várias abordagens e diferentes proteínas vêm sendo utilizados na tentativa do controle da infecção pelo DENV. Vacinas baseando-se no uso de vírus vivos atenuados e inativados, proteínas recombinantes e vacinas de DNA estão em desenvolvimento e em diferentes estágios de avaliação (GUZMAN; HARRIS, 2014).

A busca de uma resposta balanceada para todos os quatro sorotipos é umas das principais características para desenvolvimento de vacinas para dengue. A soroconversão para apenas alguns sorotipos em formulações tetravalentes apresenta um problema para a vacinação de indivíduos que vivem em área endêmica. No intervalo entre uma dose e outra de vacinação pode ocorrer a infecção por um sorotipo para qual o indivíduo não possui anticorpos. Desta forma, a infecção heteróloga poderá predispor o indivíduo ao desenvolvimento das formas mais graves da dengue (RAMAKRISHNAN; PILLAI; NAIR, 2015).

Técnicas baseadas na geração de flavivírus quiméricos através da manipulação do genoma dos mesmos tem permitido a geração de vírus com deleções específicas e expressando alvos desejados. Um exemplo desta abordagem foi a vacina utilizada pela Sanofi Pasteur, que utilizou o genoma da cepa vacinal do vírus da febre amarela. Esta vacina tetravalente se baseia na substituição dos segmentos que codificam as proteínas prM e E do vírus da febre amarela por segmentos das mesmas regiões porém dos quatro diferentes sorotipos do DENV. A vacina foi considerada segura e imunogênica, entretanto os ensaios de fase II realizados em Cingapura descobriram que, após três doses, apenas 66,5% dos participantes apresentavam soroconversão para os quatro sorotipos. (LEO et al., 2012; ROTHMAN, 2011).

A vacina TV003, desenvolvida pelo centro de pesquisa nacional dos Estados Unidos (National Institute of Health -NIH), utiliza quatro candidatos monovalentes com deleção de 30 ou 31 nucleotídeos na região 3' não traduzida dos diferentes sorotipos (3' UTR). Esta modificação genética atenuou a maioria dos sorotipos virais e manteve a sua imunogenicidade para o DENV-1, DENV-3 e DENV-4. Para conferir imunidade contra o DENV-2, foi utilizado um vírus quimérico, no qual foi substituída as sequências codificadoras das proteínas prM e E do DENV-4 pelas do DENV-2. Os quatro candidatos monovalentes foram utilizados para compor uma vacina tetravalente. Ensaios de fase I apresentaram uma soroconversão equilibrada para os quatro sorotipos do DENV após segunda dose da vacina, sem efeitos adversos sérios. Os ensaios clínicos de fase III iniciam-se no presente ano, 2015 (Instituto Butantan, 2013; ROBERTS; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2013; ROEHRIG, 2013).

A formulação vacinal DENVax, é composta pelo DENV-2 atenuado e três vírus quiméricos com os genes de prM e do E de sorotipos 1, 3 e 4 inseridas no genoma do vírus atenuado DENV-2. Ensaios clínicos realizados na Colômbia confirmaram a imunogenicidade das formulações tetravalentes DENVax em adultos saudáveis e não infectados por flavivirus. Imunizações com altas e baixas doses da vacina induziu anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos do DENV. As imunizações com altas e baixas doses confirmaram a segurança da formulação vacinal (OSORIO et al., 2014).

Uma outra abordagem existente é o uso dos quatro sorotipos de DENV inativados como agentes vacinais. Esta alternativa tem sido desenvolvida pelo Instituto Walter Reed de Pesquisas do Exército dos Estados Unidos (WRAIR) e a empresa GlaxoSmithKline (DPIV). Os estudos para avaliar a proteção a partir da imunização com esta vacina inativada demonstraram a presença de diversos efeitos colaterais. A ineficácia na fase II de triagem foi caracterizada um alto efeito colateral quando testados em indivíduos que possuíam anticorpos preexistentes de uma infecção primária com o DENV (ROBERTS; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2013).

Vacinas de DNA apresentam dificuldades devido baixa eficiência com a qual o DNA exógeno é capturado pelas células hospedeiras. Desta forma, esta estratégia vem apresentado dificuldades de geração de respostas imunes eficientes (RAMAKRISHNAN; PILLAI; NAIR, 2015). A abordagem carrega um risco inerente em se trabalhar com ácidos nucléicos os quais podem se integrar ao DNA cromossomal e inativar genes supressores de tumores e/ou ativar oncogenes (KLINMAN et al., 1997). A presença destes fatores apresentados vem levando os pesquisadores a trabalhar com abordagens vacinais a partir da utilização de vetores virais. Um

trabalho realizado a partir do uso de Adenovirus recombinante carregando sequências das proteínas prM e do E de dois sorotipos do DENV levou a obtenção de resposta humoral e celular após vacinação em modelo animal (HOLMAN, et al., 2007).

A imunização em modelo murino com proteína recombinante derivada do domínio III da proteína E dos quatro sorotipos de DENV apresentou indução de uma resposta humoral com capacidade de conferir proteção cruzada contra os quatro sorotipos de DENV (LENG et al., 2009). Este candidato vacinal também foi testado em primatas não humanos e os resultados indicaram a presença de anticorpos neutralizantes contra o DENV-2 após a vacinação dos animais (CHEN et al., 2013).

Muitas formulações vacinais apresentam resposta eficaz nos estágios pré-clínicos, porém a maioria não iniciou ou encontra-se em estado precoce dos estágios clínicos (GUZMAN; HARRIS, 2014; ROTHMAN, 2011;). Estes desafios enfrentados para a obtenção de uma vacina para dengue vem mobilizando toda a comunidade científica com diferentes abordagens na busca de um melhor entendimento sobre comportamento do DENV no hospedeiro e os melhores alvos para se obter uma vacina segura, eficaz, duradoura e balanceada contra os quatro sorotipos do DENV.

3 JUSTIFICATIVA

A dengue é uma arbovirose que tem se destacado nos últimos anos como um grave problema de saúde pública no mundo todo. Não se dispõe atualmente de uma vacina licenciada para dengue, apesar de todos os esforços de pesquisa para a sua produção e desenvolvimento.

Infecções com o DENV são extremamente frequentes e estima-se que aproximadamente 100 milhões de casos de dengue são reportados à OMS a cada ano (GUBLER, 2011; GUZMAN et al., 2010). Estudos realizados em 2013 estimaram que 390 milhões de pessoas foram infectadas pelo *Dengue virus* com 96 milhões de casos no mundo todo, superando as estimativas da OMS. Estatísticas revelaram que em 2013 foram reportados 2,35 milhões de casos apenas nas Américas, com 37.687 casos com manifestações graves da dengue (POOJA; AMRITA; VINEY, 2014; GUZMAN E HARRIS, 2014; WHO, 2014).

Um dos fatores que dificulta o desenvolvimento de uma vacina eficaz para a dengue é a existência de quatro sorotipos de DENV os quais são geneticamente e antigenicamente distintos. A proteção homóloga em uma segunda infecção com o DENV é existente e duradoura, porém a proteção cruzada é inexistente ou de curta duração e em uma infecção com um sorotipo heterólogo pode haver o desencadeamento de mecanismos que levem às formas de manifestações mais graves da doença.

Portanto, devido à presença deste fenômeno, torna-se necessário o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz que confira proteção balanceada contra os quatro sorotipos do DENV de uma só vez. Dada a importância da proteína E para a biologia do vírus e do seu potencial em induzir a produção de anticorpos neutralizantes anti-dengue, torna-se evidente a necessidade de se buscar regiões conservadas da proteína E entre os sorotipos visando-se obter novos candidatos vacinais.

4 OBJETIVOS

Neste tópico serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial vacinal de três peptídeos sintéticos, conservados e tetravalentes derivados dos domínios I e II da proteína do Envelope do *Dengue virus*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar a reatividade dos peptídeos sintéticos com amostras de soro humano positivas para dengue;
- b) Avaliar resposta sérica de anticorpos em camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos;
- c) Avaliar a produção de citocinas em esplenócitos obtidos dos camundongos imunizados com os peptídeos e infectados com os diferentes sorotipos de DENV.

5 METODOLOGIA

Neste tópico será descrita a metodologia empregada no desenvolvimento do presente trabalho.

5.1 SELEÇÃO E SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos escolhidos estão presentes na proteína E e foram desenhados de acordo com o dados descritos por Mazumder e colaboradores em 2007. Este estudo identificou através de ferramentas de bioinformática seis resíduos importantes na proteína E (N37, Q211, D215, P217, H244, K246), representados na Figura 7. De acordo com os resultados obtidos estes resíduos estão presentes somente no grupo dos DENV, são extremamente conservados entre os quatro sorotipos de DENV (vários isolados mundiais), possuem alta afinidade para a ligação ao MHC classe II e estão expostos quando a proteína E se encontra na forma de dímeros ou trímeros.

Foram selecionadas três regiões da proteína E altamente conservadas entre os sorotipos de DENV e que abrangem os seis sítios citados acima. As sequências de cada sorotipo de DENV foram ligadas entre si através de tetrâmeros de glicina. Foram desenhados três polipeptídios capazes de cobrir toda a divergência encontrada entre os quatro sorotipos nas regiões selecionadas. As sequências de cada sorotipo de DENV foram ligadas entre si através de tetrâmeros de glicina e os peptídeos foram denominados de PEP01, PEP02 e PEP03 (Tabela 2). Os peptídeos foram sintetizados em um sintetizador automático de Peptídeos (Applied Biosystems, USA). O grau de pureza dos peptídeos, determinados em HPLC, foram de 81,44% para PEP01, 82,73% para PEP02 e 91,31% para PEP03. Os peptídeos foram ressuspensos em água ultra-pura e filtrados em membrana de 0,22 µm.

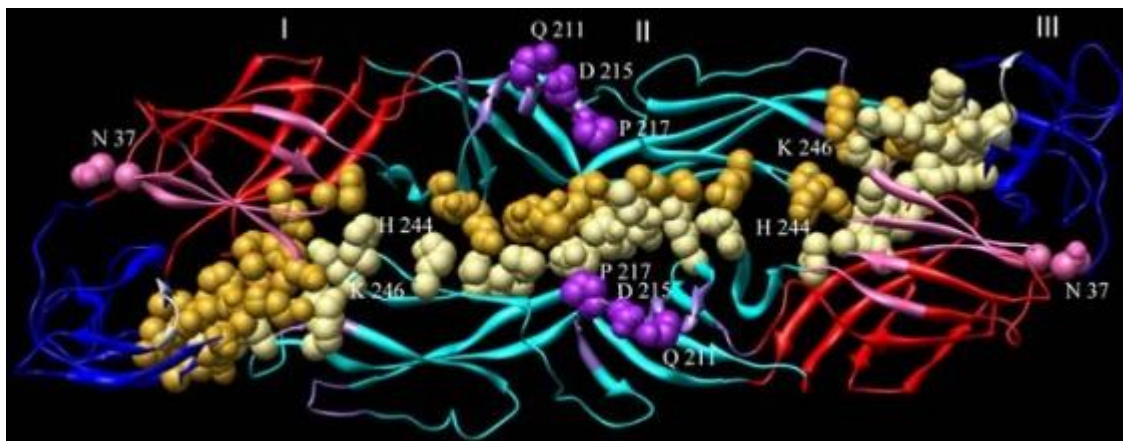


Figura 7 – Representação dos seis resíduos de aminoácidos na proteína E do DENV descritos por Mazumder e colaboradores.

Fonte: MAZUMDER et al. (2007, p. 183).

Nota: Em vermelho, encontra-se o domínio I da proteína E, em verde, o domínio II e em azul o domínio III, nos quais estão contidos os seis resíduos N37, Q211, D215, P217, H244, K246 identificados por Mazumder e colaboradores.

Tabela 2 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos.

PEP01	MAKDKPTLDIELGGGGMAKMKPTLDIELGGGGMAKNKPTLDFELGGGGMAQGKPTL DFEL
PEP02	WLCHKQWFLDLPLPWGGGGWVHRQWFFDLPLPWGGGGWLVHRQWFLDLPLPWG GGGWLVHKQWFLDLPLW
PEP03	LVTFKTAHAKKQEVGGGGLVTFKNAAHAKKQEVGGGGLVTFKNPHAKKQDVGGGG LVTFKVPFAKRQDV

Fonte: Do autor.

5.2 ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) UTILIZANDO OS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COMO ANTÍGENO

Para o ensaio ELISA utilizando os peptídeos sintéticos como antígenos, utilizou-se 16 amostras de soro de indivíduos IgM e IgG positivas para dengue. Os peptídeos PEP01, PEP02 e PEP03 foram diluídos na concentração de 20µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato (0,1M pH 9,6) e utilizados para a sensibilização da placa de 96 poços Nunc MaxiSorp® (eBIOSCIENCE, EUA). Foram adicionados 100 µL da solução por poço, e incubado por 16 horas a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada por três vezes com solução de lavagem composta por salina fosfatada tamponada (PBS) contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) e em seguida bloqueada com 200 µL de PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé) e 0,05% Tween 20 por 2 horas a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem e depois foram acrescentados 100 µL dos soros diluídos 1:25 em

solução de lavagem por poço e a placa foi incubada por uma hora a 37°C. Os poços foram lavados novamente por três vezes com a solução de lavagem e após, acrescentou-se 100 µL por poço de anti-IgM ou anti-IgG humano conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluídos 1:5000 e 1:8000, respectivamente, em PBS-T e incubado por uma hora a 37°C. A placa foi novamente lavada por mais três vezes com a solução de lavagem e posteriormente foram acrescentados 100 µL por poço de uma solução de Dicloridrato de O-Fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EUA) preparada em tampão citrato/fosfato (0,1M de Ácido Cítrico; 0,1M de Fosfato de Sódio; pH 4,5) acrescentado de 0,001% de H₂O₂. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e após este tempo foi realizada a leitura da densidade ótica em leitor de microplacas (Leitor de Elisa Anthos Zenyth 200rt) em comprimento de onda de 450 nm.

5.3 PRODUÇÃO DE *Dengue virus* 1, 2, 3 E 4

As amostras de DENV-1, 2, 3 e 4 foram cedidas pelo Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras foram diluídas 3x em meio Leibowitz L-15 (Cultilab, Brasil) suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) e 3 mL da diluição foram inoculadas em garrafas médias de cultura de células contendo monocamadas de células C6/36 e incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Após, o conteúdo da garrafa foi descartado e adicionou-se 12 mL de meio Leibowitz L-15 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado (Cultilab, Brasil), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram observadas em um intervalo de 5-7 dias de infecção até o desenvolvimento do efeito citopático característico de DENV em células C6/36 (formação de sincícios). O sobrenadante foi coletado, clarificado por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos (Eppendorf 5810R, Alemanha), aliquoteado e armazenado a -80°C até o uso.

5.4 TITULAÇÃO VIRAL

Células BHK-21 cultivadas em meio MEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado (Cultilab, Brasil), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) foram semeadas em placas de 6 poços (TPP, Suíça) na concentração de 10^6 células/mL e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 16 horas. Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, o meio foi descartado e diluições seriadas dos vírus (10^0 a 10^{-5}) foram adicionadas em poços pré-determinados e incubados por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂ para adsorção viral.

Após a incubação, as diluições foram descartadas e adicionou-se 2 mL de meio MEM (Cultilab, Brasil) contendo 1,5% de CarboximetilCelulose (Synth, Brasil) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino inativado (Cultilab, Brasil), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ em um intervalo de 5 a 7 dias dependendo do sorotipo viral. Posteriormente, o meio foi removido, e as placas foram fixadas com Solução PBS-Formaldeído a 10% por 2 horas, lavadas e coradas com Solução de Cristal Violeta 1% por 1 hora. O cálculo do título viral foi realizado pelo número de placas virais detectadas multiplicados pelo inverso da diluição.

5.5 ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

Camundongos Swiss Webster machos com seis a oito semanas de idade foram mantidos com livre acesso de comida e água estéril. Os camundongos imunizados com os peptídeos receberam, pela via subcutânea, três doses de 50 microgramas (µg) dos peptídeos (PEP01, PEP02 ou PEP03; 9 animais para cada grupo) ou 30 µg da proteína (PEPDENV – descrita no item 5.10; 5 animais por grupo) em intervalos de 7 dias na presença de adjuvante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich, EUA) (v/v) a um volume final de 100 µL. Como controle negativo, camundongos foram inoculados com PBS e adjuvante de Freund incompleto (v/v) por via subcutânea. Como controle positivo dos experimentos, animais foram inoculados por via intra peritoneal com DENV-1: 1 dose de DENV-1 contendo 4×10^4 unidades formadoras de placa (pfu) para os experimentos realizados com os peptídeos (PEP01, PEP02 ou PEP03) ou 2 doses de DENV-1 contendo $2,7 \times 10^6$ pfu para experimentos realizados com PEPDENV – 5 animais por grupo). Após 28 dias da primeira imunização ou infecção, o sangue dos animais foi obtido por punção cardíaca para obtenção de sangue e

separação do soro. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas (ANEXO A e B).

5.6 ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO E TITULAÇÃO DE ANTICORPOS IgM, IgG TOTAL, IgG1 E IgG2a ANTI-PEPTÍDEOS OU PEPDENV

Anticorpos IgM, IgG total, IgG1 e IgG2a foram medidos no soro de animais controle e imunizados. Os peptídeos PEP01, PEP02 ou PEP03 ou a proteína PEPDENV foram diluídos na concentração de 20µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato (0,1M pH 9,6) e utilizados para a sensibilização da placa de ELISA de 96 poços Nunc MaxiSorp® (eBIOSCIENCE, EUA), sendo adicionado 100 µL da solução por poço, e incubado por 16 horas a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada por três vezes com solução de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20, PBS-T) e em seguida bloqueada com 200 µL de PBS contendo 5% de leite em pó (Molico®, Nestlé) e 0,05% Tween 20 por 2 horas a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem e após foram acrescentados na primeira linha 200 µL dos soros provenientes de animais imunizados e controle diluídos 1:25 em solução de lavagem e nos demais poços 100 µL de solução de lavagem. Assim, prosseguiu-se diluição seriada transferindo 100 µL da primeira linha para as linhas subsequentes. Posteriormente, incubou-se a placa por uma hora a 37°C. Após incubação e nova lavagem com PBST, adicionou-se 100 µL de anti(-IgM, -IgG, -IgG1 ou -IgG2a) de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluídos a 1:2000, 1:2000, 1:1000 e 1:2000, respectivamente, em solução de PBS-T. A placas foi incubada por 60 minutos a 37°C.

A placa foi novamente lavada por mais três vezes com a solução de lavagem e posteriormente foi acrescentado 100 µl por orifício de uma solução de OPD (Sigma-Aldrich, EUA) preparada em tampão citrato/fosfato (0,1M de Ácido Cítrico; 0,1M de Fosfato de Sódio; pH 4,5) acrescentado de 0,001% de H₂O₂. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e após este tempo foi realizada a leitura da densidade ótica em leitor de microplacas (Leitor de Elisa Anthos Zenyth 200rt) em comprimento de onda de 450 nm.

5.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES POR SORONEUTRALIZAÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL

A detecção dos anticorpos específicos e neutralizantes no soro dos animais foi realizada através de testes de redução do número de placas virais (teste de neutralização da partícula viral). O teste de neutralização foi feito utilizando o soro coletado do camundongo e células BHK-21. O soro contendo os anticorpos foram incubados a 56°C por 30 minutos para inativação do sistema complemento, diluídos seriadamente nas diluições 1:20, 1:40; 1:80 e 1:160 e incubados por 1 hora com volumes iguais de vírus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) atingindo concentração final de 50 pfu/poço. Posteriormente, os 200 µL dos soros proveniente da incubação com os vírus foram adicionados em placas de 6 poços contendo monocamada de células BHK-21 na concentração de 10⁶ células/poço e incubados por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, as diluições foram descartadas e adicionou-se meio MEM (Cultilab, Brasil) contendo 1,5% de CarboximetilCelulose (Synth, Brasil) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino inativado (Cultilab, Brasil), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) e incubou-se a 37°C e 5% de CO₂ em um intervalo de 5 a 7 dias dependendo do sorotipo viral. Posteriormente, as placas foram fixadas com Solução PBS-Formaldeído a 10% por 2 horas, lavadas e coradas com Solução de Cristal Violeta 1% por 1 hora. A presença de anticorpos neutralizantes se deu pela redução do número de placas virais em relação ao controle de vírus (vírus incubados sem soro).

5.8 OBTENÇÃO DE ESPLÊNOCITOS E ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Após 28 dias da primeira imunização ou infecção, os camundongos foram anestesiados com solução ketamina e xilazina por via intraperitoneal e sacrificados por deslocamento cervical. O baço foi coletado e transferido para meio RPMI 1640 gelado com L-glutamina (Sigma Aldrich, USA) e com auxílio de uma pinça, este foi macerado para a obtenção de uma suspensão celular as quais foram sedimentadas por centrifugação à 500g e temperatura de 4°C (Eppendorf 5810R, Alemanha). O sedimento foi incubado por 4 minutos a temperatura ambiente com tampão de lise celular (uma parte de 0,17 M de Tris pH 7,65 para

nove partes de 0,16 M de cloreto de amônio). As células foram lavadas novamente e suspendidas para a concentração de 10^6 células/mL em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino inativado (Cultilab, Brasil), 1% de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA).

As células foram cultivadas em placas de 96 poços (10^6 células/mL) com meio RPMI 1640 suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino inativado (Cultilab, Brasil), 1% de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) e incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Após este tempo, os esplenócitos foram infectados com 0,01 MOI (multiplicidade de infecção) de cada sorotipo ou tratados com o mesmo volume do sobrenadante de células C6/36 não infectadas (mock). Depois de 72 horas os sobrenadantes foram recolhidos e os esplenócitos utilizados para teste de viabilidade celular a partir da incubação com 10 μ L de uma solução contendo 5 mg/mL de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – MTT (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS por 4 horas a 37°C.

Após, este tempo, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e adicionou-se 100 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan. A leitura da densidade ótica foi feita em espectrofotômetro a 570 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada como $[(A-B)/(Ax,100)]$, onde A e B são as absorbâncias das células controle e tratadas, respectivamente.

5.9 DOSAGEM DE CITOCINAS IL-5, IL-10, TNF- α E IFN- γ EM SOBRENADANTES DE ESPLENÓCITOS

Os sobrenadantes coletados dos esplenócitos foram utilizados para dosagem de citocinas através do kit Mini ELISA Development Kits (Peprotech, USA), segundo o protocolo do fabricante.

5.10 SÍNTESE DO GENE SINTÉTICO CODIFICADOR DA PROTEÍNA PEPDENV

As sequências dos três peptídeos (PEP01, PEP02 e PEP03) foram utilizadas para construção de um gene sintético capaz de codificar uma única proteína contendo todos os três peptídeos avaliados e fusionados a uma sequência indutora de anticorpos neutralizantes. A sequência identificada por DENG e colaboradores (2011) na proteína E (98-VDRGWGNGCGLF-108) possui ampla atividade neutralizante contra vários *Flavivirus* e desta forma foi escolhida para a construção do gene sintético. A proteína PEPDENV codificada por este gene está representada na figura 7.

VDRGWGNGCGLFMAKDKPTLDIELMAKNKPTLDIELMAKNKPTLDFELMAQGKPTLDFELW
LVHKQWFLDLPLPWWWVHRQWFFDLPLPWWLVHRQWFLDLPLPWLVTFKTAHAKKQEV
LVTFKNAHAKKQEVLVTFKNPHAKKQDVLVTFKVPFAKRQDV

Figura 8 - Sequência de aminoácidos da proteína PEPDENV.

Fonte: Do autor.

Nota- Em verde a região identificada no estudo de DENG et al., 2011. Em azul, amarelo e cinza as regiões pertencentes aos peptídeos sintéticos fusionados formando uma única proteína.

A sequência de aminoácidos dos peptídeos construídos foi convertida em nucleotídeos através do programa DNA works (Hoover et al., 2002/ <http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>). Nesta etapa, a sequência codificadora dos peptídeos foi produzida de forma a otimizar a produção da proteína por organismos procariotos.

A sequência de nucleotídeos obtida foi enviada para a empresa IDT - Integrated DNA Technologies (EUA) para a síntese do fragmento codificador da proteína. O fragmento sintetizado foi utilizado em uma reação em cadeia da polimerase com os oligos senso Gblock (5' CCG GAT CCA TGG TTG ATC GTG GTT GGG 3') e antisenso Gblock (5' GGA AGC TTT TAA TCC TGA CGT TTT GCA TG 3') no intuito de inserir na sequência do PEPDENV os sítios de restrição para enzimas *Bam*HI e *Hind*III.

A reação de PCR foi feita com 50ng do fragmento sintetizado; Tampão da Taq 1X; 1,25 mM de MgCl₂; 500 μM de dNTPs; iniciador senso Gblock e antisenso Gblock 0,2 μM de cada; 1,25 U de Taq polimerase e quantidade suficiente de água para volume final de 50 μL.

A amplificação foi feita em termociclador nas seguintes condições: 30 segundos a 95°C -1 ciclo; 20 segundos a 95 °C; 20 segundos a 58.8°C; 90 segundos a 72 °C – 30 ciclos; 10 minutos a 72 °C- 1 ciclo e 4°C infinito. Uma alíquota do produto da amplificação foi diluído (v/v) em corante fluorescente de ácidos nucleicos Gel Red (Biotium, EUA) e aplicado em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X).

5.11 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA OBTIDA POR PCR

O produto da amplificação da sequência codificadora do PEPDENV foi clonado em plasmídeo pTrcHis TOPO TA (Invitrogen, EUA) segundo instruções do fabricante. A reação de ligação foi empregada para transformar bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) Top 10 competentes (Invitrogen, EUA).

5.12 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

O tubo contendo a bactéria competente *E. coli* Top 10 (Invitrogen, EUA) foi retirado do freezer -80°C e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Após, a reação de ligação foi adicionada ao tubo, o qual foi homogeneizado suavemente e imediatamente incubado em banho gelo por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se o choque térmico incubando-se o tubo a 42°C por 90 segundos e novamente em gelo por 30 segundos. Adicionou-se 100 µL de meio Luria Broth (Himedia, Índia) sem antibióticos e incubou-se a 37°C por 60 minutos. Volumes de 30 e 70 µL foram semeados em placas de Petri contendo LB ágar contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) para seleção das bactérias transformadas.

5.13 SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES POR PCR

As colônias que cresceram na placa contendo o antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) foram coletadas da placa de Petri com o auxílio de uma ponteira de micropipeta de 200 µL e foram então, mergulhadas em tubos de 0,2 mL contendo mix de PCR previamente preparado e após, transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 500 µL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA). A reação de PCR foi realizada com Tampão da Taq 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 500 µM de dNTPs, iniciador senso Gblock (5' CCG GAT CCA TGG TTG ATC GTG GTT GGG 3') e antisenso Gblock (5' GGA AGC TTT TAA TCC TGA CGT TTT GCA TG 3') 0,5 µM de cada, 2 U de Taq polimerase e quantidade suficiente de água para volume final de 20 µL.

A amplificação foi feita em termociclador nas seguintes condições: 30 segundos a 95°C -1 ciclo; 20 segundos a 95 °C; 20 segundos a 58,8 °C; 90 segundos a 72 °C – 30 ciclos; 10 minutos a 72 °C- 1 ciclo e 4°C infinito. O produto da amplificação foi diluído (v/v) em corante fluorescente de ácidos nucleicos Gel Red (Biotium, EUA) e aplicado em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X).

5.14 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA (MINIPREP)

Para a extração do DNA plasmidial em pequena escala dos clones de interesse (aqueles que apresentaram o inserto), a suspensão bacteriana foi inoculada em tubos de 50 mL contendo 5 mL de meio LB e antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) e incubados sob agitação de 180 rpm a 37°C overnight. Após este tempo utilizou-se o Kit Wisard™ *Plus Minipreps DNA purification System* (PROMEGA, EUA) para a obtenção dos plasmídeos recombinantes, segundo o protocolo do fabricante.

5.15 DIGESTÃO DO DNA PLAMIDIAL COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DA DIGESTÃO

A digestão do DNA plasmidial foi realizada com enzimas de restrição BamHI e HindIII (Promega, EUA). Esta digestão teve como objetivo a liberação do inserto para a posterior clonagem em vetor de expressão digerido com as mesmas enzimas de restrição. A reação de digestão utilizou Tampão de Restrição Enzimática 1X, 2 µg de Albumina Sérica Bovina Acetilada (BSA), 1 µg de DNA plasmidial, 5 U de BamHI, 5 U de HindIII e quantidade suficiente de água para volume final de 20 µL. A reação foi incubada em banho Maria a 37°C por 4 horas e o produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X).

A banda referente ao fragmento (495 pb) foi recortada do gel e congelada a -20°C. Para purificação do fragmento utilizou-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) conforme o protocolo do fabricante.

5.16 CLONAGEM EM PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO pQE 30 E TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS *E. coli* JM109

O plasmídeo pQE 30 (Qiagen, Alemanha) (Figura 8) contém um promotor/operador (P/O2) localizado próximo ao sítio de ligação do ribossomo. A atividade deste promotor é reprimida pela ligação de uma proteína repressora lac ao operador. A atividade do promotor pode ser restabelecida pela adição de β -D-thiogalactoside (IPTG) o qual inativa o repressor liberando assim o operador e permitindo a expressão da proteína de interesse. Após a região de ligação ao ribossomo (RBS) segue-se o código de iniciação (ATG), as sequências que codificam para 6 moléculas de Histidina (His) e o sítio de clonagem adjacente. A inserção das His adjacentes permite a fácil purificação e concentração da proteína recombinante produzida através da cromatografia de afinidade em resina de quelato de níquel

A ligação do fragmento de interesse (PEPDENV) ao plasmídeo pQE30 foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega, EUA). Foram utilizados 50 ng de vetor e uma razão de 1:3 de inserto, conforme o protocolo do fabricante. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* JM109, segundo o protocolo apresentado no item 5.12.

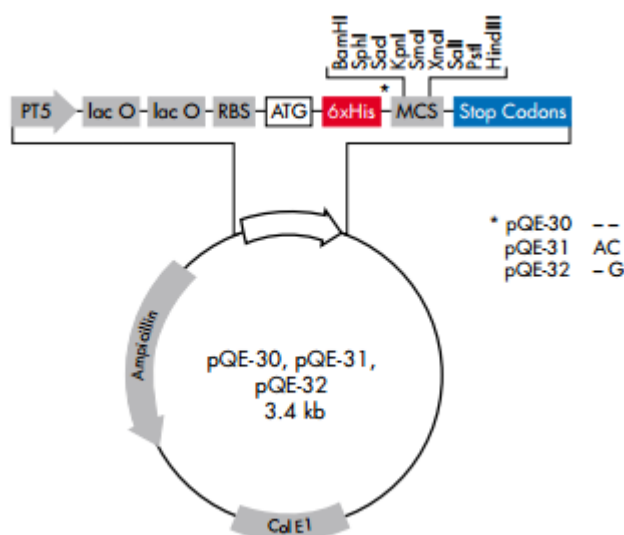


Figura 9 – Plasmídeo de expressão do proteínas pQE 30.

Fonte: <https://www.qiagen.com/~media/nextq/image%20library/illu/00/89/illu_0089_pqe-30/2_9.ashx?h=113&la=en&w=161&hash=D2FA4CB0FCA9C170D6317F077D3B12FC68776AC2>. Acesso em: 9 ago. 2015.

As colônias que cresceram na placa contendo o antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) foram coletadas da placa de Petri com o auxílio de uma ponteira de micropipeta de 200 µL e foram então, mergulhadas em tubos de 0,2 mL contendo mix de PCR previamente preparado e após, transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 500 µL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA). A PCR foi realizada com tampão da Taq 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 500 µM de dNTPs, iniciador senso pQE (5' CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG 3') e antisenso pQE (5' GTT CTG AGG TCA TTA CTG G 3') 0,5 µM de cada, 2 U de Taq polimerase e quantidade suficiente de água para volume final de 20 µL.

A amplificação foi feita em termociclador nas seguintes condições: 30 segundos a 95°C -1 ciclo; 20 segundos a 95 °C; 20 segundos a 49,2 °C; 90 segundos a 72 °C – 30 ciclos; 10 minutos a 72 °C- 1 ciclo e 4°C infinito. O produto da amplificação foi diluído (v/v) em corante fluorescente de ácidos nucleicos Gel Red (Biotium, EUA) e aplicado em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X). Os clones recombinantes foram selecionados e crescidos em caldo LB contendo ampicilina para posterior extração de plasmídeo conforme protocolo descrito no item 5.14.

A digestão do DNA plasmidial foi realizada com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Promega, EUA). Esta digestão teve como objetivo a verificação da presença do inserto em vetor de expressão pQE30. A reação de digestão utilizou Tampão de Restrição Enzimática 1X, 2 µg de Albumina Sérica Bovina Acetilada (BSA), 1 µg de DNA plasmidial, 5 U de *Bam*HI, 5 U de *Hind*III e quantidade suficiente de água para volume final de 20 µL. A reação foi incubada em banho Maria a 37°C por 4 horas e o produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X). Após a confirmação da presença do inserto, o plasmídeo pQE30 contendo a sequência codificadora do peptídeo PEPDENV foi utilizado para a transformação de bactérias *E. coli* M15, segundo o protocolo apresentado no item 5.12. Porém, foram utilizados para a seleção dos clones recombinantes os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) e kanamicina (25 µg/mL) (Applichem, Alemanha).

5.17 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *E. coli* E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Após a transformação bacteriana, as colônias capazes de crescer em meio LB-ágar com antibióticos de seleção ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) e kanamicina (25 µg/mL) (Applichem, Alemanha) foram inoculadas em 4 mL de meio LB contendo os mesmos antibióticos citados acima e incubadas sob agitação de 180 rpm a 37°C por 16 horas. Após este período, foi feita uma diluição 1:20 da cultura bacteriana, em 500 mL de meio LB, contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) e kanamicina (25 µg/mL) (Applichem, Alemanha). A cultura foi incubada a 37°C, sob agitação até a densidade óptica de 0,6 a 600 nm, onde foi adicionado o IPTG para na concentração final de 1mM por 4 horas. Retirou-se 1 mL antes e após o processo de indução para análise da expressão da proteína de interesse em gel de Poliacrilamida-SDS a 12%. O restante da cultura pós-indução foi clarificada a 4000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado homogeneizado em 20 mL de tampão A (Guanidina 6M; 0,1 M de Fosfato de sódio; 0,01 M de Tris; pH 8,0). O lisado bacteriano foi centrifugado a 12000 rpm durante 30 segundos e o sobrenadante utilizado para a purificação da proteína.

Para purificação da proteína recombinante, o sobrenadante foi aplicado em coluna contendo 3 mL de resina de quelato de níquel previamente equilibrada com 20 mL de Tampão A. O eluato foi coletado e a coluna lavada com 20 mL do tampão B pH 8 (Uréia 8M, 0,1M de fosfato de sódio, 0,01M de Tris). Após, lavou-se a coluna com 20 mL de tampão B pH 6.0 e 4.0 e coletou-se frações de 10 mL.

O perfil proteico das bactérias antes e após a indução por IPTG foram analisados através de eletroforese em gel de Poliacrilamida-SDS a 12%. As amostras foram diluídas volume a volume (v/v) em tampão de aplicação 2X (5% Mercaptoetanol; 10% de glicerol; 50 mM de tris pH 6,8; 0,25% v/v do volume azul de bromofenol), fervidas a 100°C por 5 minutos e então aplicadas no gel. Após a corrida, o gel foi corado com solução de Coomassie blue R 250 1% diluído em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 10%) por no mínimo 3 horas e depois o gel foi descorado em solução de Álcool Etilico 35% por 3 horas.

5.18 SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

Os plasmídeos recombinantes foram enviados para o Centro de Estudos sobre Genoma Humano (USP, São Paulo, Brasil). O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi, descrito por SANGER e colaboradores (1977), em sequenciador automático capilar Mega

Bace1000 (GE HEALTHCARE, USA), utilizando o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (MegaBACE™) (GE HEALTHCARE, USA), obedecendo às condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Duas reações de sequenciamento foram feitas para cada plasmídeo em ambas as orientações.

5.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatística do dados foi realizada utilizando análise de variância seguida por teste paramétrico Tukey-Kramer (INSTAT software, GraphPad, San Diego, CA). O P valor <0,05 foi considerado para indicar significância estatística.

6 RESULTADOS

Serão apresentados neste tópico, os resultados obtidos após o desenvolvimento do trabalho.

6.1 AVALIAÇÃO DE RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELOS PEPTÍDEOS

Amostras soro humano IgM/IgG positivas para Dengue (n = 16) foram utilizadas para determinar a capacidade dos anticorpos presentes nestas amostras reagirem com os peptídeos sintéticos (PEP01, PEP02 e PEP03). De um total de 16 amostras de soro IgM/IgG positivas para Dengue, apenas 3 (18,75%) apresentaram IgM contra PEP01; 15 (93,75%) contra PEP02 e 16 (100%) contra PEP03. A presença de anticorpos IgG contra os peptídeos foi avaliada e 14 soros (87,5%) reagiram contra PEP01; 11 (68,75%) contra PEP02 e 15 (93,75%) contra PEP03 (Figura 9). Nenhum dos soros IgM/IgG negativos para dengue mostrou reatividade contra os peptídeos sintéticos em ambos ensaios (IgM e IgG).

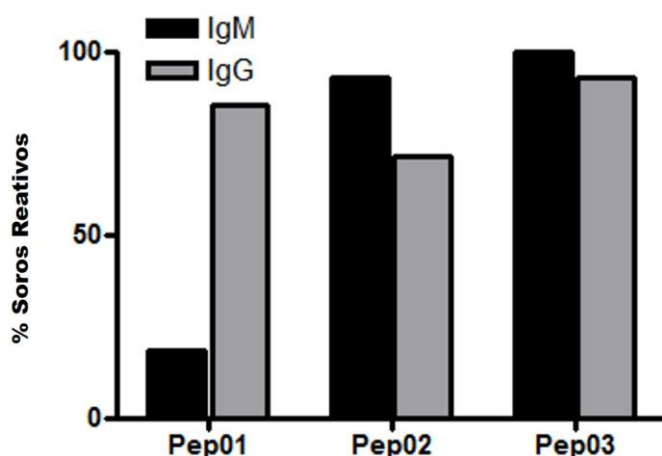


Figura 10 – Reatividade de amostras de soro humanas IgM/IgG positivas para dengue contra os peptídeos sintéticos.

Fonte: Do autor.

Nota: Soros humanos IgM (em preto) e IgG (em cinza) positivos para dengue (n=16) foram usados em ELISA para verificar a reatividade destas amostras contra PEP01, PEP02 e PEP03.

A imunogenicidade dos peptídeos sintéticos também foi testada em modelo murino por quantificação dos níveis de anticorpos específicos (IgM, IgG total e subtipos IgG1/IgG2a) no soro de camundongos previamente imunizados com os três peptídeos (Figura 10A). Os soros dos camundongos imunizados com PEP01, PEP02 e PEP03 apresentaram maior título de IgG do que IgM (Tabela 3). As médias dos títulos para IgM foram de 37 ± 17 para Pep01 e 300 ± 141 para PEP03. Não foi detectado a presença de IgM nos animais imunizados com Pep02. Os títulos IgG totais médios de PEP01, PEP02 e PEP03 foram de 96 ± 56 ; 133 ± 46 e 4800 ± 2262 , respectivamente (figura 10B). Os grupos de camundongos tratados com PBS e os grupos infectados com DENV-1 não produziram níveis detectáveis de anticorpos anti-peptídeos.

Tabela 3 - Títulos de anticorpos IgM e IgG total no soro de camundongos Swiss após imunização com os peptídeos sintéticos.

	PEP01	PEP02	PEP03
IgM	37 ± 17	ND	300 ± 141
IgG total	96 ± 56	133 ± 46	4800 ± 2262

Fonte: Do autor.

Nota: ND: Não detectado.

Para caracterizar os subtipos IgG produzidos por camundongos imunizados, um ensaio ELISA foi conduzido para a detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a contra os peptídeos. Os resultados mostraram um título semelhante de IgG1 aos observados para IgG total para camundongos imunizados com PEP01 e PEP03 e um título inferior para os camundongos imunizados com PEP02 (Figura 10C). Em contraste, todos os camundongos imunizados não produziram anticorpos IgG2a contra os peptídeos (Figura 10D).

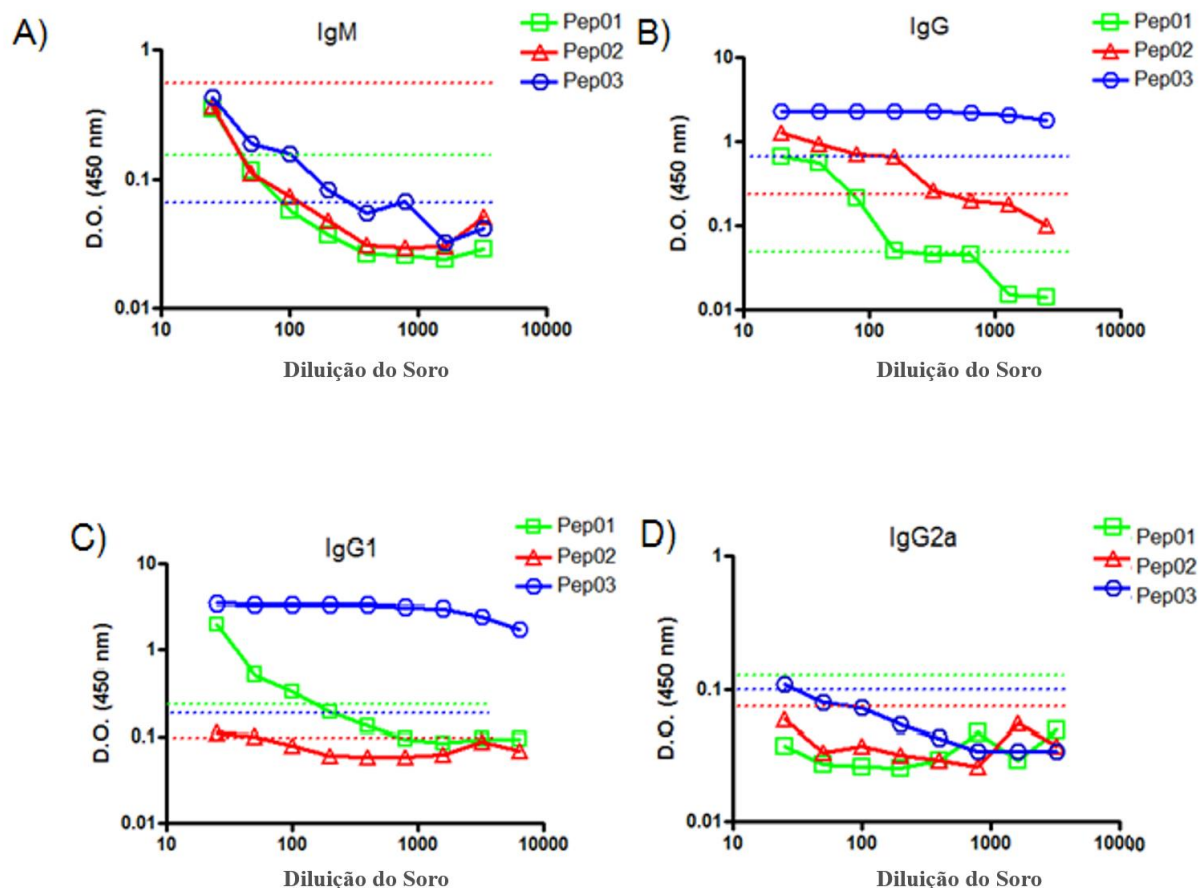


Figura 11 – Resposta de anticorpos em camundongos imunizados com PEP01, PEP02 e PEP03.

Fonte: Do autor.

Nota: Curvas de titulação representativas de diluição de anticorpos para análises de anticorpos IgM e IgG anti-peptídeos. Os soros dos animais imunizados foram misturados e titulados. Cada diluição foi feita em triplicata. (A) IgM específica para PEP01, PEP02 e PEP03. (B) IgG total específica para PEP01, PEP02 e PEP03. (C) Subtipo de anticorpos IgG1 específico para PEP01, PEP02 e PEP03. (D) Subtipo de anticorpos IgG2a específico para PEP01, PEP02 e PEP03. A linha pontilhada representa o valor de corte obtido a partir da análise do soro de animais não imunizados com o peptídeo (grupo controle negativo) para PEP01 (verde), PEP02 (vermelho) e PEP03 (azul).

Apesar de um nível relativamente elevado de anticorpos anti-peptídeos em camundongos imunizados, o teste de neutralização por redução de placa (PRNT₅₀) mostrou uma ausência ou um baixo título de atividade neutralizante no soro destes animais (Tabela 4). Os soros derivados de camundongos imunizados com PEP01 apresentaram um título de anticorpos neutralizantes ≤ 20 apenas para DENV-1 e os soros obtidos a partir de animais imunizados com PEP03 mostraram um título de anticorpos neutralizantes ≤ 20 para DENV-1 e DENV-3. Os soros de camundongos imunizados com PEP02 e os animais infectados com DENV-1 não apresentaram atividade neutralizante nas diluições testadas (PRNT₅₀ < 1/20).

Tabela 4 - Títulos de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos Swiss imunizados com peptídeos sintéticos ou infectados com DENV-1.

*Títulos de Anticorpos Neutralizantes (PRNT₅₀)				
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
PEP01	20	ND	ND	ND
PEP02	ND	ND	ND	ND
PEP03	20	ND	20	ND
DENV	ND	ND	ND	ND

Fonte: Do autor.

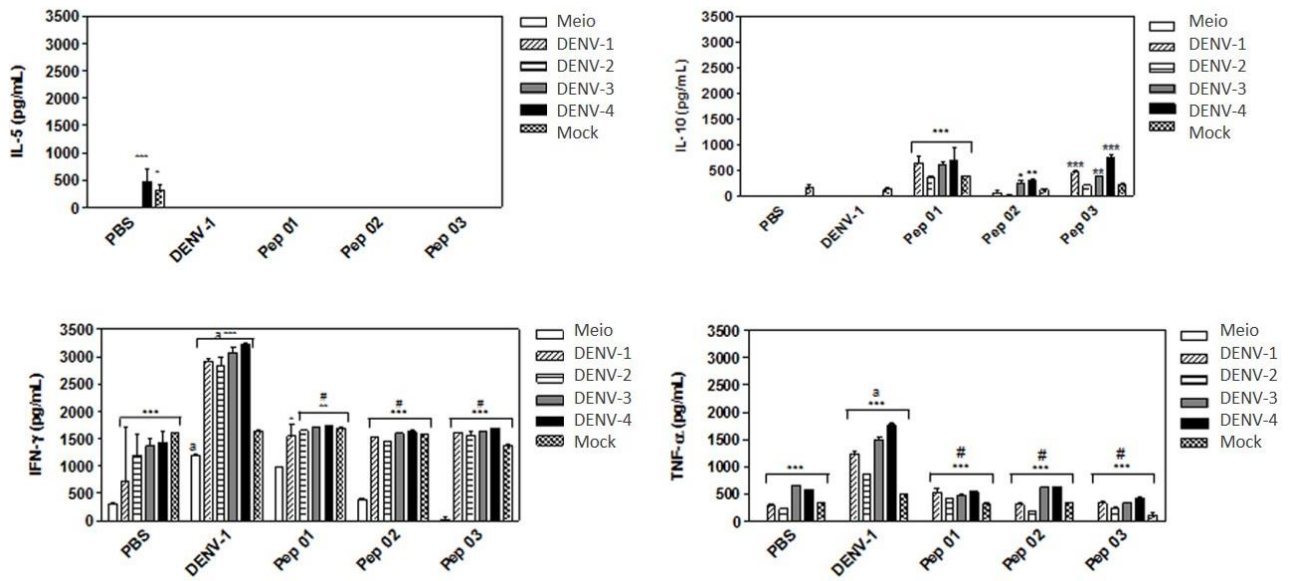
Nota: *: Títulos determinados de pool de soros obtidos 28 dias após a primeira imunização ou infecção.

ND: Não detectado.

A resposta antígeno-específica foi medida através da produção de diversas citocinas por esplenócitos derivados de camundongos imunizados com os peptídeos sintéticos e também por detecção da atividade citotóxica observada na cultura de células de baço após a infecção com sorotipos DENV. As células do baço derivadas de camundongos imunizados com os peptídeos mostraram uma alta produção de IL-10 ($p < 0,01$) e uma redução da produção do TNF- α e IFN- γ ($p < 0,001$) após a infecção com todos os sorotipos DENV se comparado ao controle positivo (figura 12A). A citocina IL-5 não foi detectada em nenhum dos grupos analisados (figura 12A).

Em adição a esta produção diferencial de citocinas, foi também detectada uma diferença na viabilidade celular na cultura de células de baço dos diferentes grupos analisados após a infecção com os quatro sorotipos de DENV. As células do baço de animais tratados com PBS (controle negativo), infectadas com DENV-1 (controle positivo) e também imunizados com PEP01 não mostraram diminuição significativa da viabilidade celular após a infecção viral pelos diferentes sorotipos de DENV, em comparação com as células não infectadas e as células controle (Mock). No entanto, as células de baço derivadas de camundongos imunizados com PEP02 e PEP03 mostraram uma redução significativa na viabilidade das células após infecção com quatro sorotipos de DENV, quando comparadas com as células não infectadas e Mock (Figura 12B).

A)



B)

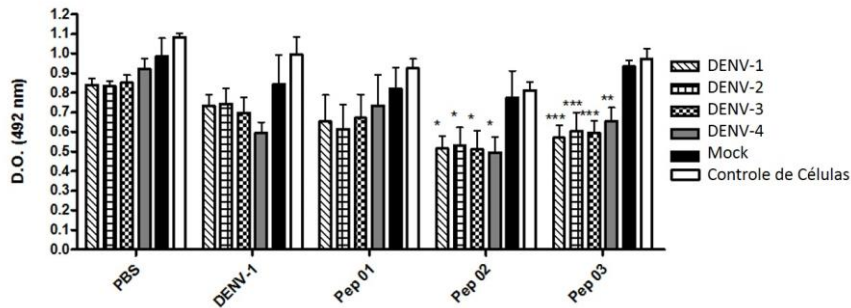


Figura 12 – Produção de citocinas e atividade citotóxica em esplenócitos infectados com todos os sorotipos de DENV.

Fonte: Do autor.

Nota: (A) Níveis de citocinas foram medidos nos sobrenadantes de esplenócitos por ELISA. Células do baço foram obtidas de camundongos tratados com PBS (n=4); infectados com 4×10^4 pfu de DENV-1 ou imunizados com PEP01 (n=4) ou PEP02 (n=4) ou PEP03 (n=4). Os esplenócitos foram infectados com todos os sorotipos de DENV ou infecção simulada com sobrenadantes derivados de células C6/36 não infectadas por 72 horas. As barras representam as médias \pm o desvio padrão. * Indica significância a $P < 0,05$ comparado com células tratadas com meio; ** Indica significância a $P < 0,01$ comparado com células tratadas com meio; *** Indica significância a $P < 0,01$ comparado com células tratadas com meio; # indica significância a $P < 0,05$ comparado com camundongos infectados com DENV-1 e (a) Indica significância a $P < 0,001$ comparado com animais tratados com PBS. (B) Atividade citotóxica diferencial em esplenócitos infectados com sorotipos de dengue. A atividade citotóxica foi medida em cultura de esplenócitos por ensaio de MTT. * Indica significância a $P < 0,05$ comparado com células não infectadas.

6.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Os resultados obtidos anteriormente demonstram que estes peptídeos apresentam potencial para o desenvolvimento de vacinas para a dengue e desta forma as sequências dos três peptídeos (PEP01, PEP02 e PEP03) foram utilizadas para construção de um gene sintético capaz de codificar uma única proteína contendo todos os três peptídeos avaliados e fusionados a uma sequência indutora de anticorpos neutralizantes conforme descrito anteriormente (Seção 5.10).

A amplificação da sequência codificadora da PEPDENV por meio de reação de PCR com oligos específicos, resultou na obtenção de um fragmento com o tamanho esperado (495 pb). O fragmento gerado foi utilizado para clonagem em vetor pTrcHis e posterior transformação de bactérias *E. coli* Top 10. A presença da sequência codificadora da PEPDENV em plasmídeo pTrcHis foi confirmada através da realização de PCR para seleção de clones recombinantes utilizando oligos específicos para o inserto (Figura 13).

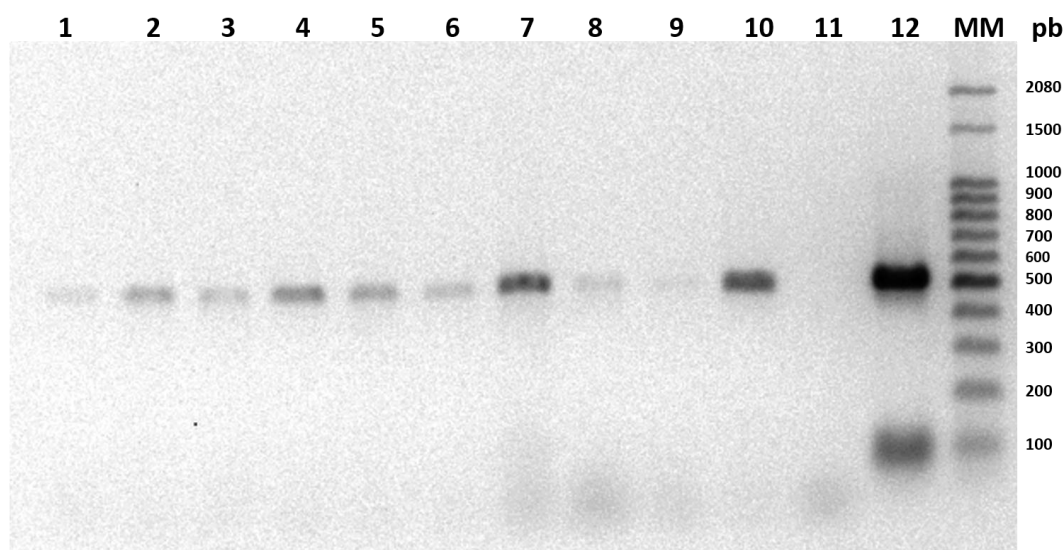


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose para verificação da presença da sequência codificadora da PEPDENV em plasmídeos pTrcHis inseridos em bactérias *E. coli* Top 10.

Fonte: Do autor.

Nota: As canaletas enumeradas de 1 a 10 mostram a presença do inserto em todos os clones analisados. O controle negativo e positivo estão representados pelo números 11 e 12, respectivamente. Em MM está representado o marcador molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil).

Um clone foi selecionado, crescido em meio LB contendo antibióticos e o plasmídeo pTrcHis/PEPDENV obtido. A presença do inserto foi confirmada por digestão do plasmídeo recombinante com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. O fragmento liberado foi

recortado do gel, purificado e clonado em vetor de expressão pQE 30. A reação de ligação foi utilizada para transformação de bactérias *E. coli* JM109 dada a sua alta eficiência de transformação, como pode ser observada pela presença de vários clones crescidos na placa. A figura 14 mostra a presença do fragmento recombinante na maioria das colônias selecionadas.

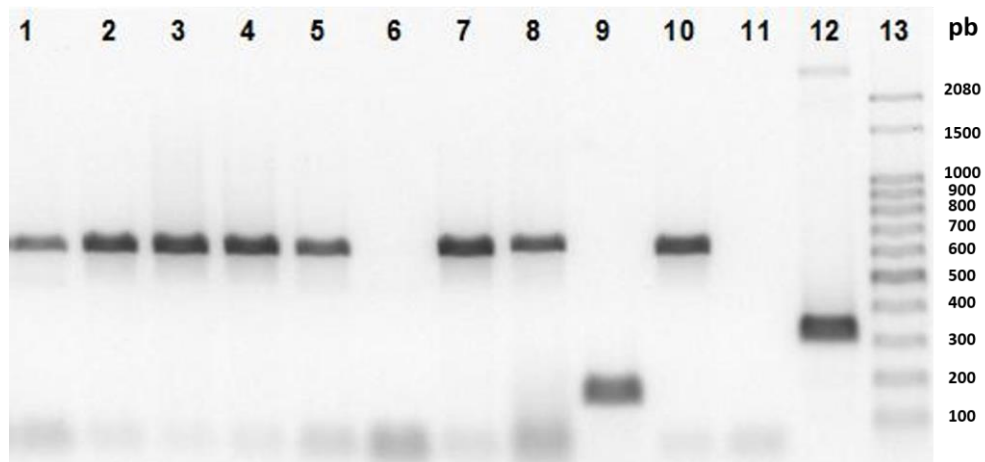


Figura 14 PCR utilizando os oligos pQE para verificação da presença do inserto (PEPDENV) em bactérias *E. coli* JM109 transformados com o vetor pQE30.

Fonte: Do autor.

Nota: As colônias enumeradas de 1 a 5, 7, 8 e 10 apresentaram banda referente ao fragmento clonado em pQE30. Em 6 verifica-se a ausência do vetor recombinante e em 9 a presença do vetor com ausência de inserto. Como controle positivo, utilizouse um plasmídeo pQE32 ligado a um fragmento de 198 pb. O controle negativo e o marcador molecular são apresentados em 11 e 13, respectivamente. Observação: Os oligos utilizados flanqueiam a sequência inserida no plasmídeo, adicionando ao amplificado mais 126 pb.

Para verificar a presença do inserto, três clones foram selecionados para obtenção dos plasmídeos recombinantes e posterior digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Com a digestão, houve a liberação do fragmento clonado de tamanho esperado (495pb) (Figura 15).

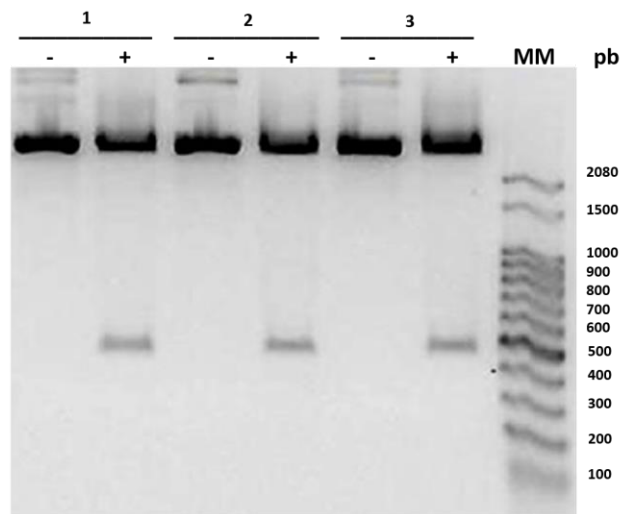


Figura 15 - Digestão do plasmídeo recombinante pQE30/PEPDENV com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III.

Fonte: Do autor.

Nota: Três clones (1, 2 e 3) foram selecionados para obtenção plasmídeos e posterior digestão. O marcador molecular de 100 pb está apresentado em MM.

Desta forma, para a confirmação da presença da sequência codificadora da proteína de interesse, os plasmídeos recombinantes foram sequenciados e os resultados revelaram que não houve modificações na janela de leitura do DNA e nenhuma mutação na sequência de nucleotídeo do gene sintético PEPDENV (Figura 16).

A)

```

AATGCGCAAA AAGGATAGGC GACACGAATG TGATACTCAT ACTCTCTTTT CATATATGAG
CATTATACAG GGTATGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTGAA TGTATTTAGA AAAATAAAACA
AATAGGGGTT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT GACGTCTAAG AAACCATTAT
TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG TATCACGAGG CCCTTTCGTC TTCACCTCGA
GAAATCATAA AAAATTTATT TGCTTTGTGA GCGGATAACA ATTATAATAG ATTCAATTGT
GAGCGGATAA CAATTCACA CAGAATTCAT TAAAGAGGAG AAATTAACTA TGAGAGGATC
GATCAACCAT CACCATCAAG GATCCATGGT TGATCGTGGT TGGGGTAATG GTTGTGGTCT
GTTTGGTGGT GGTGGCATGG CAAAAGATAA ACCGACCCTG GATATTATGG CCAAAAACAA
ACCTACACTG GACATCATGG CAAAAACAA ACCAACGCTG GATTTTATGG CACAGGTAA
ACCGACACTG GACTTTGAAC TGGGTGGTGG CCGTTGGCTG GTTCATAAAC AGTGGTTTCT
GGATCTGCCG CTGCCGTGGT GGATGGTTCA TCGTCAGTGG TTTTGTGACC TGCCTCTGCC
TTGGTGGCTG GTGCACCGCC AATGGTTTCT GGACCTGCCT CTGCCATGGG GTGGTGGTGG
TCTGGTTACC TTTAAAACCG CACATGCAAA AAAACAAGAA CTGGTGACCT TCAAAAATGC
CCACGCCAAA AAACAAGAGC TGGTCACGTT TAAAAACCG CACGCGAAAA AACAGGATCT
GGTTACATTC AAAGTTCCGC ATGCAAAACG TCAGGATTA AAGCTTAATT AGCTGAGCTT
GGACTCCTGT TGATAGATCC AGTAATGACC TCAGAACTCC ATCTGGATTT GTTCAGAACG
CTCGGTTGCC GCCGGGCGTT TTTTATTGGT GAGAATCCAA GCTAGCTTGG CGAGATTTTC
AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA TGGAGAAAAA AATCACTGGA TATACCACCG TTGATATATC
CCAATGGCAT CGTAAAGAAC ATTTTGAGGC ATTTAGTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA
CCAGACCGTT CAGCTGGATA TTACGGCCTT TTTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAGCACAGT
TTTATCCGGC TTTATTACA TTCTGCCCGC TGATGATGCT CATCGGATTC GTATGCATGA
AAGACGTGAR CTGTGANTGG CATAGNTTCA CCTTGTTANC CGTTTCCAAT GAAGCCAACC
TGAAAC

```

 Início tradução
 Cauda 6 Histidinas
 Início e fim do gene

B)

```

MRGSHHHHHHGSMDVDRGWGNGCGLFGGGGMAKDKPTLDIMAKNKPTLDIMAKNKPTLDFMAQGKPT
LDFELGGGGWL VHKQWFLDLPLPWWMVHRQWFFDLPLPWWLVHRQWFLDLPLPWGGGLVTFKTAH
AKKQELVTFKNAHAKKQELVTFKPNPHAKKQDLVTFKVPKAKRQDKL

```

Figura 16 - Resultado do sequenciamento dos plasmídeos recombinantes.

Fonte: Do autor.

Nota: A) Em amarelo, verifica-se o códon de início da tradução, em vermelho as sequências que codificam a cauda de 6 histidinas adicionadas pelo plasmídeo pQE e em verde o início e fim do gene codificador do PEPDENV. B) Sequência de aminoácidos predita a partir da sequência nucleotídica do gene de interesse.

Assim, foi possível selecionar um vetor contendo o inserto de interesse para posterior inserção em bactérias *E. coli* M15 a fim de se expressar a proteína recombinante. A transformação bacteriana levou a obtenção de diversas colônias crescidas em placa com os antibióticos de seleção. Para a seleção dos clones recombinantes, algumas colônias foram coletadas da placa e induzidas à produção da proteína recombinante a partir da adição de IPTG ao meio de cultura.

Após o término do processo de indução da proteína recombinante, os extratos proteicos foram obtidos e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Conforme esperado, todas as colônias selecionadas apresentaram diferença no perfil eletroforético antes e após indução, pois os extratos proteicos obtidos a partir das bactérias induzidas com IPTG apresentaram uma banda diferencial de massa esperada (19,11 KDa).

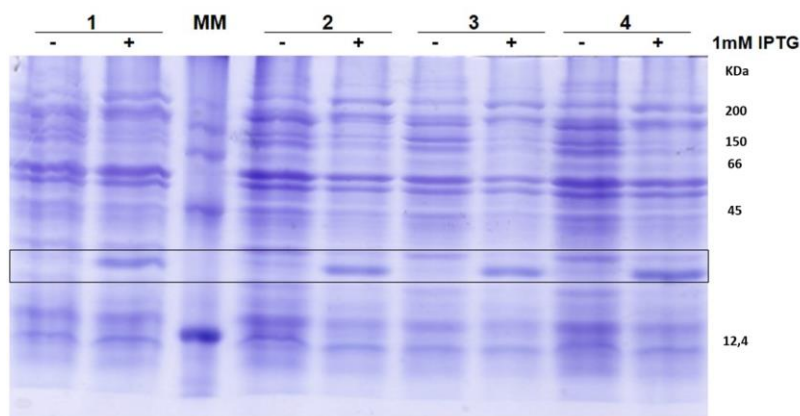


Figura 17 – Figura representativa da indução à expressão da proteína recombinante PEPDENV para clones 1, 2, 3 e 4.

Fonte: Do autor.

Nota: A indução se deu através da adição de 1mM de IPTG à cultura bacteriana por 4 horas. Os extratos proteicos obtidos a partir da cultura induzida com IPTG apresentam banda diferencial de aproximadamente 20 KDa quando se comparadas aos extratos proteicos obtidos de culturas não induzidas.

A adição de cauda de histidina pelo pQE à proteína recombinante, permitiu a purificação desta em coluna de Quelato de Níquel. A partir da aplicação de um gradiente de pH com solução de Uréia 8M (pH 8.0, pH 6.0 e pH 4.0), foi possível recuperar a proteína PEPDENV após eluição em solução de Uréia 8M pH 4.0 (Figura 18).

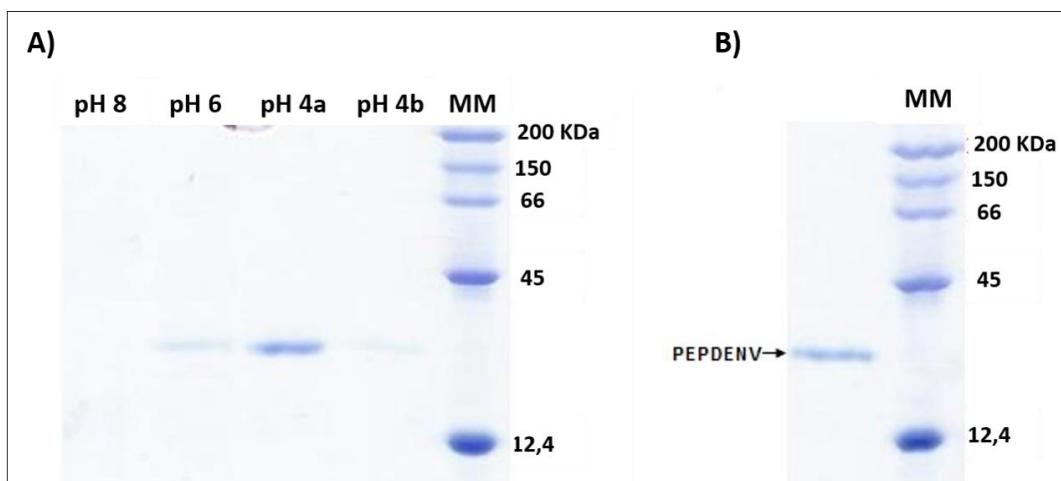


Figura 18 - Purificação da proteína recombinante PEPDENV em coluna de Quelato de Níquel.

Fonte: Do autor.

Nota: A) As canaletas representam a eluição com solução de Uréia 8M em diferentes pHs (8, 6, 4a e 4b, respectivamente). A Eluição em pH 4 foi coletada em duas frações, 4a e 4b. A proteína foi recuperada em maior grau de pureza em pH igual a 4. Em MM encontra-se o marcador de peso molecular. B) PEPDENV purificado.

6.3 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA PROTEÍNA RECOMBINANTE PEPDENV

A imunogenicidade da proteína PEPDENV foi avaliada em modelo de imunização utilizando camundongos Swiss. A partir da análise dos resultados de ELISA utilizando o soro dos animais imunizados foi possível verificar que a imunização com PEPDENV não induziu a produção de IgM. Já para os subtipos de IgG, foi detectada uma significativa produção de IgG1 nos animais imunizados com a proteína PEPDENV (Figura 19). O subtipo IgG2a não foi detectado em nenhum dos grupos analisados (dado não mostrado).

Os títulos de IgG1 anti-PEPDENV foram maiores ou iguais a 3200 (≥ 3200) para os animais imunizados. Apesar da imunização com a proteína PEPDENV induzir títulos de anticorpos anti-PEPDENV, o teste de neutralização por redução de placa mostrou ausência de atividade neutralizante no soro dos animais imunizados (Tabela 5). Somente foi detectada uma fraca atividade neutralizante no soro dos animais imunizados com a proteína PEPDENV para DENV-1 (título ≤ 20).

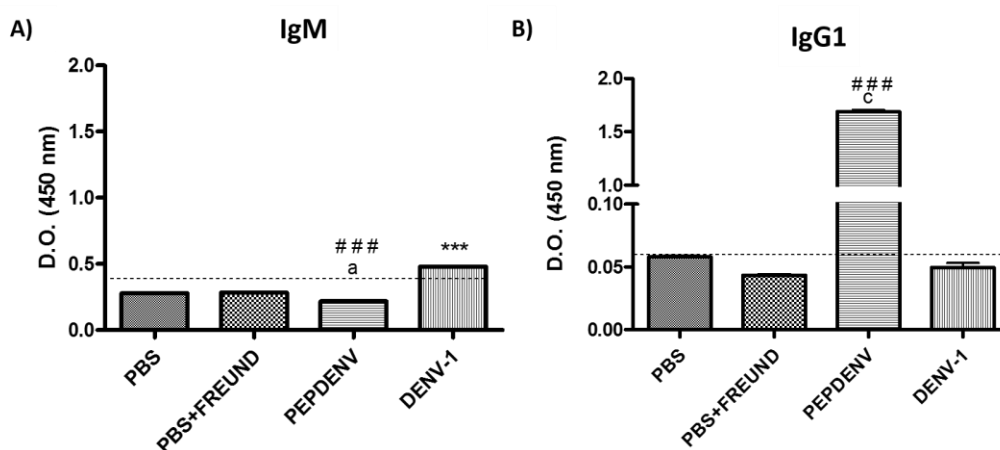


Figura 19 – Resposta de anticorpos em camundongos imunizados com PEPDENV.

Fonte: Do autor.

Nota: A imunogenicidade da proteína PEPDENV foi confirmada através de ensaios de imunização em modelo murino. A) Anticorpos IgM específicos para PEPDENV; B) Anticorpos IgG1 específicos para PEPDENV. *** Indica significância a $P < 0,001$ (PBS *versus* DENV-1). ^a Indica significância a $P < 0,01$ (PBS+FREUND *versus* PEPDENV). ^c Indica significância a $P < 0,001$ (PBS+FREUND *versus* PEPDENV). ### Indica significância a $P < 0,001$ (DENV-1 *versus* PEPDENV). A linha pontilhada representa o valor de corte obtido a partir da análise do soro de animais não imunizados.

Tabela 5 - Títulos de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos Swiss imunizados com a proteína PEPDENV ou infectados com DENV-1.

*Títulos de Anticorpos Neutralizantes (PRNT₅₀)				
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
PEPDENV	20	ND	ND	ND
DENV	ND	ND	ND	ND

Fonte: Do autor.

Nota: *: Títulos determinados de pool de soros obtidos 28 dias após a primeira imunização ou infecção.

ND: Não detectado.

Esta falha na atividade neutralizante, mesmo após a adição de uma sequência anteriormente caracterizada como indutora de atividade neutralizante pode ser resultado de uma produção significativa de anticorpos para outras regiões da molécula, que não seja a região descrita por DENG e colaboradores (2011). Assim, foram realizados testes de ELISA, utilizando os três peptídeos sintéticos como substrato. Os resultados mostraram que 50% dos soros de animais imunizados com PEPDENV reagiram com PEP01 e PEP02 e 75% dos soros reagiram com PEP03. Um outro fator importante, a ser considerado é que o teste de ELISA que utilizou o PEP03 como substrato, apresentou um maior valor de densidade óptica para as amostras de soro obtidas de animais imunizados com a proteína se comparado aos testes que utilizaram o PEP01 e PEP02 como substrato.

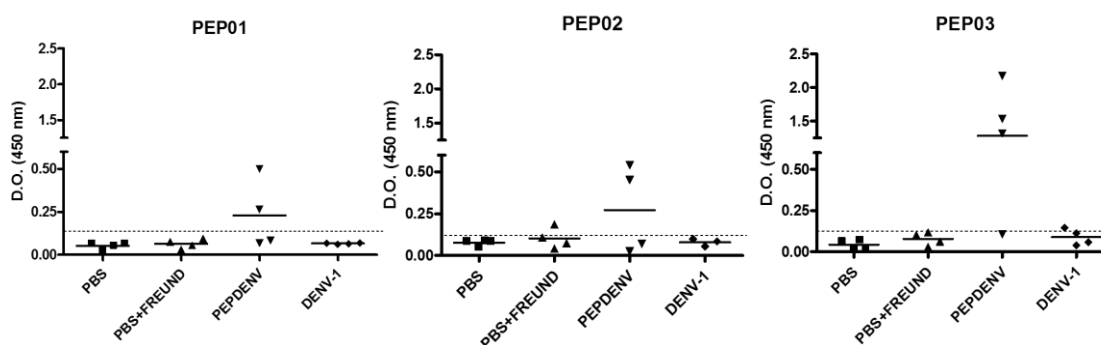


Figura 20 – Avaliação da reatividade dos soros dos animais imunizados (n=4) com PEPDENV com os peptídeos sintéticos (PEP01, PEP02 e PEP03).

Fonte: Do autor.

Nota: O ensaio ELISA apresentou reatividade de anticorpos presentes no soro de animais imunizados com PEPDENV com todos os peptídeos sintéticos. Cada ponto no gráfico é referente a densidade óptica (D.O.) de um animal. A linha pontilhada representa o valor de corte obtido a partir da análise do soro de animais não imunizados.

7 DISCUSSÃO

A busca de candidatos vacinais para dengue vem sendo dificultada devido à variação genética existente entre os quatro sorotipos do DENV, os quais compartilham uma identidade variando em torno de 60 a 75% de suas sequências de aminoácidos (GUZMAN e HARRIS, 2014). Essa divergência existente entre os sorotipos faz com que haja o reconhecimento de diferentes epitopos na geração de uma resposta imune, mas por outro lado, pode haver o desencadeamento de respostas imunes cruzadas quando se trata de uma segunda infecção com um sorotipo heterólogo, favorecendo o desenvolvimento das formas mais graves de manifestação da dengue.

A proteína E vem sendo utilizada em várias abordagens com fins vacinais devido a sua importância para a biologia do vírus, a qual desempenha um grande papel no ciclo de replicação e por ter uma notável participação na geração de resposta imune ao DENV sendo um dos maiores alvos da produção de anticorpos neutralizantes anti-DENV (MAZUMDER et al., 2007).

Desta forma, Mazumder e colaboradores em 2007, com intuito de contribuir para obtenção de novas plataformas na busca de candidatos vacinais para dengue, utilizou uma abordagem computacional para identificar locais importantes da proteína E. O estudo apresentou seis resíduos de aminoácidos (N37, Q211, D215, P217, H244 e K246) que são altamente conservadas entre os quatro sorotipos de DENV. Estes resíduos são preditos como os epitopos de célula T e estão expostos tanto nos dímeros ou trímeros na proteína E. Os resíduos N37 e P217 são expostos tanto no dímero quanto no trímero, Q211 e D215 são expostos apenas no dímero e H244 e K246 são expostos apenas no trímero.

Neste estudo, sintetizamos três peptídeos tetravalentes que cobrem todos os locais identificados por Mazumder e colaboradores. O peptídeo 1 (PEP01) apresenta a região do sítio N37 do domínio I da proteína E, o peptídeo 2 (PEP02) apresenta em sua sequência a região que compreende os sítios Q211, D215 e P217, pertencentes ao domínio II e o peptídeo 3 (PEP03) apresenta na sua sequência a região dos sítios H244 e K246 que também pertencem ao domínio II.

A fim de se verificar o potencial dos peptídeos, foram utilizadas amostras de soro humano IgM/IgG positivas para DENV para verificar se anticorpos produzidos em uma infecção natural pelo DENV são capazes de reconhecer os peptídeos. Todos os peptídeos sintéticos mostraram reatividade contra amostras de soro IgM/IgG positivas para dengue

(Figura 10). Estes dados indicam que em uma infecção natural por DENV ocorre a produção de anticorpos (IgM e IgG) que são capazes de se ligar aos peptídeos sintéticos, reforçando a ideia de que estas sequências de aminoácidos conservadas e identificadas por Mazumder e colaboradores são capazes de induzir uma resposta imune *in vivo*.

A imunogenicidade destes peptídeos foi confirmada em um modelo murino de imunização (Figura 11). A produção de anticorpos em modelo animal após a imunização com todos os peptídeos e a densidade óptica observada no ensaio ELISA utilizando soros humanos e PEP03 como substrato reforçam a ideia de que PEP03 é mais imunogênico que PEP01 e PEP02. Uma explicação provável para a maior imunogenicidade de PEP03 é a facilidade deste peptídeo de se ligar ao MHC e também ser apresentado às células T.

Estudos recentes indicam que a resposta dos anticorpos à infecção pelo DENV consiste em uma população menor de anticorpos fortemente neutralizantes e uma grande população de anticorpos não neutralizantes cruzados, com potencial de aumentar a infecção pelo vírus e conseqüentemente, a doença (BELTRAMELLO et al., 2010; DE ALWIS et al., 2011; SCHIEFFELIN et al., 2012). Estas observações estão de acordo com os resultados de ELISA e PRNT. Apesar de um nível relativamente elevado de anticorpos anti-peptídeos nos camundongos imunizados (mostrada nos resultados de ELISA), o PRNT mostrou uma atividade de neutralização fraca ($PRNT_{50} < 1/20$) apenas contra DENV-1 (Pep01) ou DENV-1 / DENV-3 (PEP03).

A patogênese da infecção por DENV é caracterizada por uma complexa interação viral e de fatores do hospedeiro. Os mecanismos pelos quais a infecção pelo DENV leva ao aumento da permeabilidade vascular, especialmente nas formas mais graves da doença ainda não são totalmente compreendidos (HALSTEAD, 2012). A patogênese da dengue poderia ser explicada pela teoria do aumento da infecção mediada por anticorpos (ADE) e também por reação cruzada a ativação de células T de memória. Muitos estudos têm mostrado uma elevada produção de TNF- α , IL-10, IFN- γ e IL-4, juntamente com várias outras citocinas em pacientes com FHD, quando comparada com a forma clássica da doença. Esta elevada reatividade à infecção do DENV é atribuída em parte às células T cruzadas que podem produzir altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α em uma infecção secundária (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; DONG et al., 2007; MONGKOLSAPAYA et al., 2006; MANGADA; ROTHMAN, 2005).

A infecção sequencial com diferentes sorotipos DENV pode alterar a resposta de citocinas de células T CD4 e CD8 de reatividade cruzada, o que resulta em maior produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α . Este evento é uma consequência da

presença de epitopos de reação cruzada que preferencialmente reativam as células T de memória, resultando em uma resposta imune ineficiente contra o sorotipo heterólogo (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; DONG et al., 2007; MONGKOLSAPAYA et al., 2006; MANGADA; ROTHMAN, 2005; ROTHMAN, 2011).

Assim, uma vacina contra a dengue ideal deveria ser capaz de induzir uma baixa secreção de citocinas pró-inflamatórias e também uma resposta celular eficaz contra todos os sorotipos de DENV em infecções secundárias por sorotipo heterólogo.

No presente estudo, foi mostrado que as células do baço derivadas de camundongos imunizados com os peptídeos tiveram uma menor produção de TNF- α e IFN- γ após infecção *in vitro* com todos os sorotipos de DENV e também uma diminuição da viabilidade celular significativa nas células do baço infectadas com DENV derivadas de imunizações com PEP02 e PEP03. A ausência de uma diminuição da viabilidade celular significativa dos outros grupos após infecção *in vitro* de todos os sorotipos de DENV, especialmente nos camundongos infectados com DENV-1 reforça o potencial destes peptídeos para induzir uma resposta de células T eficaz contra todos os sorotipos de DENV. Entretanto, métodos mais eficazes devem ser realizados para quantificar a atividade de células TCD8 como por exemplo, citometria de fluxo e ELISPOT para detecção de perforina/granzima (ZUBER et al., 2005; MALYGUINE et al., 2007).

De acordo com os dados descritos por Prestwood et al., (2012), as células do baço poderia ser um modelo adequado para avaliar reatividade cruzada de células T já que na cultura de células derivadas de animais infectados ou imunizados têm as células T primárias (TCD4 e TCD8) e também as células permissivas (macrófagos) para o DENV na infecção e replicação *in vitro*. Assim, a quantificação de viabilidade celular em esplenócitos infectados com DENV também pode indicar atividade citotóxica específica de células TCD8 contra as células infectadas pelo DENV.

Devido à baixa atividade neutralizante induzida pelos peptídeos, mas uma provável resposta de células T benéfica, produzimos uma proteína recombinante proveniente da fusão dos três peptídeos avaliados (PEP01, PEP02 e PEP03) e uma sequência indutora de anticorpos neutralizantes identificada por DENG e colaboradores (2011). Segundo o estudo, a sequência possui ampla atividade neutralizante contra vários *Flavivirus* e desta forma, esta construção poderia acrescentar melhores características aos peptídeos e contribuir para a obtenção de um melhor desempenho diante uma infecção pelo DENV.

A expressão da proteína recombinante em sistema procarioto foi satisfatória, apresentado bons níveis de rendimento após a purificação da proteína (2,5mg/mL). Os ensaios

de imunização mostraram que a proteína PEPDENV tem capacidade de induzir anticorpos (IgG1) em modelo animal. Porém, ao avaliarmos a atividade neutralizantes da partícula viral, observamos que o soro destes animais não apresentaram anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos do DENV.

Para avaliarmos a reatividade das amostras de soro dos animais imunizados com PEPDENV contra os peptídeos sintéticos, um ensaio de ELISA foi realizado utilizando os peptídeos como substrato. Os resultados apresentaram uma interação entre os anticorpos presentes no soro dos animais imunizados com PEPDENV com todos os peptídeos. Estes resultados sugerem que a resposta imune após imunização com PEPDENV foi, provavelmente, mais caracterizada por uma resposta direcionada para as sequências dos peptídeos em relação à sequência indutora de anticorpos neutralizantes. Dentre os peptídeos usados, foi observado uma maior reatividade dos soros dos animais para o PEP03, confirmando desta forma, o potencial imunogênico desta sequência.

Apesar da ausência de atividade neutralizante dos anticorpos produzidos a partir da imunização com os peptídeos e especialmente com a PEPDENV, estudos futuros para a avaliação da resposta de células T induzida a partir da imunização principalmente com a proteína PEPDENV devem ser realizados para a melhor caracterização desta molécula como candidato vacinal para dengue.

8 CONCLUSÃO

Os peptídeos estudados, especialmente o PEP03, são capazes de induzir uma resposta de anticorpos com baixa atividade neutralizante e, provavelmente, uma resposta de células T que poderia ser benéfica para induzir uma resposta imune eficaz contra todos sorotipos DENV. Estes dados reforçam uma potencial utilização destes peptídeos em uma formulação vacinal para dengue. A proteína PEPDENV não apresentou resposta satisfatória para indução da produção de anticorpos neutralizantes. No entanto, mais estudos que visam modificar a sequência peptídica serão necessários para induzirem a produção de anticorpos neutralizantes contra todos os quatro sorotipos de DENV e também para melhorar a imunogenicidade destes candidatos vacinais.

REFERÊNCIAS

- APTE-SENGUPTA , S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Curr Opin Virol**, v. 9C, p. 134-142, 2014.
- BACK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses: an overview. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 3, 2013.
- BELTRAMELLO, M. et al. The human immune response to *Dengue virus* is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 3, p. 271–283, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/04/2015-016---Boletim-Dengue-SE15-2015.pdf>>. Acesso em: 08 Maio. 2015.
- CHAMBERS, T. J. et al. Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organization meeting. **Vaccine**, v. 15, n. 14, p. 1494-1502, 1997.
- CHEN, H.W. et al. A consensus envelope protein domain III can induce neutralizing antibody responses against serotype 2 of dengue virus in non-human primates. **Arch Virol**, v. 158, n. 7, p. 1523-1531, 2013.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, v. 80, n. 4 Suppl, p. 11418-11431, 2006.
- DE ALWIS, R. et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e11188, 2011.
- DEL ANGEL, R. M.; REYES-DEL VALLE, J. Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003551, 2013.
- DENG, Y. Q. et al. A Broadly Flavivirus Cross-Neutralizing Monoclonal Antibody that Recognizes a Novel Epitope within the Fusion Loop of E Protein. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. e16059, 2011.

DONG, T. et al. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, p. e1192, 2007.

FERREIRA, B. J. et al. Evolução histórica dos programas de prevenção e controle da dengue no Brasil. **Cienc Saude Coletiva**, v. 14, n. 3, p. 961-972, 2009.

GARCIA-RIVERA, E. J.; RIGAU-PEREZ, J. G. Encephalitis and dengue. **Lancet**, v. 20, p. 360-361, 2002.

GREGSON, A.; EDELMAN, R. Dengue virus infection. **Pediatr Infect Dis J**, v.22, n. 2, p.179-181, 2003.

GUBLER, D.J. Emerging vector-borne flavivirus diseases: are vaccines the solution? **Expert Rev Vaccines**, v. 10, n. 5, p. 563–565, 2011.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol** , v. 8, n. 12 Suppl.), p. S7–16, 2010.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, p. 453-465, 2014.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

_____. Dengue vaccine development: a 75% solution? **Lancet**, v. 380, n. 9853, p.1535-1536, 2012.

HEINZ, F. X.; STIASNY K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, p. 4301–4306, 2012.

HOLMAN, D. H. et al. Two complex, adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 2, p. 182-189, 2007.

HUANG, C. Y. H. et al. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v. 396, n. 2, p. 305-315, 2010.

INSTITUTO BUTANTAN. **Vacina da Dengue**. 2013. Disponível em:
<<http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-4538.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2013.

KING, C. A.; ANDERSON, R.; MARSHAL, J. S. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. **J Virol**, v. 76, n. 16, p. 8408-8419, 2002.

KLINMAN, D. M. et al. DNA vaccines: safety and efficacy issues. **Springer Semin Immunopathol**, v. 19, n. 2, p. 245-256, 1997.

LENG, C. et al. A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 288-295, 2009.

LEO, Y. S. et al. Immunogenicity and safety of recombinant tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in individuals aged 2–45 years Phase II randomised controlled trial in Singapore. **Hum Vaccin Immunother**, v. 8, n. 9, p. 1259–1271, 2012.

LINDBÄCK, H. et al. Dengue fever in travelers to the tropics 1998 and 1999. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 4, p. 438-442, 2003.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23-61, 2003.

MALYGUINE, A. et al. New approaches for monitoring CTL activity in clinical trials. **Adv Exp Med Biol**. v. 601, p. 273-284, 2007.

MANGADA, M.M.; ROTHMAN, A.L. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. **J. Immunol.**, v. 175, n. 4, p. 2676–2683, 2005.

MARTINA, B.E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A.D. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 22, n. 4, p. 564–581, 2009.

MAZUMDER, R. et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. **Virus Genes**, v. 35, p. 175-186, 2007.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal?. **J. Immunol.**, v. 176, n. 6, p. 3821–3829, 2006.

NATURE EDUCATION. Dengue viruses. 2011. Disponível em:
<http://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/22401481/2_1.jpg>.
Acesso em: 17 ago. 2015.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415, 2013.

OSORIO, J. E. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naïve healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. **Lancet Infect Dis**, v. 14, n. 9, p. 830-838, 2014.

PASTRANA, M. E. et al. Spatial and statistical methodologies to determine the distribution of dengue in Brazilian municipalities and relate incidence with the Health Vulnerability Index. **Spat Spatiotemporal Epidemiol**, v. 11, p. 143-151, 2014.

PAWITAN, J. A. Dengue Virus Infection: Predictors for Severe Dengue. **Acta Med Indones-Indones J Intern Med**, v. 43, n. 2, p. 129-135, 2011.

PERERA, R; KUHN, R J. Structural proteomics of dengue virus. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.

POOJA, C.; AMRITA, Y.; VINEY, C. Clinical implications and treatment of dengue. **Asian Pac J Trop Med**, v. 7, n. 3, p. 169-178, 2014.

PRESTWOOD, T.R. et al. Trafficking and replication patterns reveal splenic macrophages as major targets of dengue virus in mice. **J. Virol.**, v. 86, n. 22, p. 12138–12147, 2012.

RAMAKRISHNAN, L.; PILLAI, M. R.; NAIR, R. R. Dengue vaccine development: strategies and challenges. **Viral Immunol**, v. 28, n. 2, p. 76-84, 2015.

REY, F. A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, v. 375, p. 291-298, 1995.

ROBERTS, C. H.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON G. New opportunities for control of dengue virus. **Curr Opin Infect Dis**, v. 26, n. 6, p. 567-574, 2013.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 67, p. 2773–2786, 2010.

ROEHRIG, J. T. Current status of dengue vaccine development. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/april/2_Roehrig_Dengue_SAGE_April2013.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2013.

ROTHMAN, A.L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat. Rev.**, v. 11, n. 8, p. 532–543, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SCHIEFFELIN, J.S. et al. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. **Viol. J.**, v. 7, p. 28, 2012.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A.
Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, p. S22-S35, 2007.

SUN, P.; KOHEL T. J. The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis. **Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2520, 2013.

URBANOWSKI, M. D.; ILKOW, S.; HOBMAN, T. C. Modulation of signaling pathways by RNA virus capsid proteins. **Cellular signalling**, v. 20, n. 7, p. 1227-1236, 2008.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 7, p. 518-28, 2007.

World Health Organization (WHO). Geneva, Switzerland: WHO: Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

_____. Dengue Control. Disponível em: < <http://www.who.int/denguecontrol/en/> >. Acesso em: 19 de Dez. 2014.

ZUBER, B. et al. Detection of human perforin by ELISpot and ELISA: ex vivo identification of virus-specific cells. **J Immunol Methods**, v. 302, n. 1-2, p. 13-25, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
(CEUA-UNIFAL) – 2012.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 06 de agosto de 2012.

Prof. Luiz Felipe Leomil Coelho

Prezado Professor,

O projeto sob sua coordenação, registro nº 419/2012, intitulado “Avaliação da produção de anticorpos neutralizantes anti-dengue vírus 1, 2, 3 e 4 em camundongos imunizados com peptídeos tetravalentes” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG

ANEXO B - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) – 2014.



Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 595/2014, sob responsabilidade de Luiz Felipe Leomil Coelho, referente ao projeto “Avaliação da resposta imune humoral em camundongos imunizados com uma proteína tetravalente sintética constituída a partir de regiões conservadas da proteína do envelope do Dengue vírus”, está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL) em reunião ordinária de 20 de outubro de 2014.

Alfenas, 22 de outubro de 2014.


Prof. Dr. Estela R. Oliveira
Presidente

Prof. Dr. Thales de A. e Tréz
Vice Presidente

ANEXO C – ARTIGO PUBLICADO

Virus Research 188 (2014) 122–127



Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

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

Evaluation of tetravalent and conserved synthetic peptides vaccines derived from Dengue virus Envelope domain I and II



Raissa Prado Rocha^a, Márcia Cristina Livonesi^b, Marcilio Jorge Fumagalli^a,
 Naiara Ferreira Rodrigues^a, Lauro César Felipe da Costa^a,
 Michelle Cristina Silva Gomes dos Santos^a, Eliseu Soares de Oliveira Rocha^c,
 Erna Geessien Kroon^c, Luiz Cosme Cotta Malaquias^a, Luiz Felipe Leomil Coelho^{a,*}

^a Laboratório de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brazil

^c Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 December 2013

Received in revised form 10 April 2014

Accepted 14 April 2014

Available online 21 April 2014

Keywords:

Dengue virus

Peptides

Vaccine

Envelope protein

ABSTRACT

Dengue is a major worldwide public health problem, especially in the tropical and subtropical regions of the world. Primary infection with a single Dengue virus (DENV) serotype causes a mild, self-limiting febrile illness called dengue fever. However, a subset of patients experiencing a secondary infection with a different serotype progress to the severe form of the disease, called dengue hemorrhagic fever. In this study, the vaccine potential of three tetravalent and conserved synthetic peptides derived from DENV envelope domain I (named Pep01) and II (named Pep02 and Pep03) was evaluated. Human dengue IgM/IgG positive serum ($n = 16$) showed reactivity against Pep01, Pep02 and Pep03 in different degrees. Mice immunization experiments showed that these peptides were able to induce a humoral response characterized by antibodies with low neutralizing activity. The spleen cells derived from mice immunized with the peptides showed a significant cytotoxic activity (only for Pep02 and Pep03), a high expression of IL-10 ($P < 0.01$) and a reduced expression of TNF- α and IFN-gamma ($P < 0.001$) compared to DENV-1 infected splenocytes. Thus these peptides, and specially the Pep03, can induce a humoral response characterized by antibodies with low neutralizing activities and probably a T cell response that could be beneficial to induce an effective immune response against all DENV serotypes and do not contributed to the immunopathogenesis. However, further studies in peptide sequence will be required to induce the production of neutralizing antibodies against all four DENV serotypes and also to improve immunogenicity of these peptides.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dengue virus (DENV) is a major worldwide public health problem, especially in the tropical and subtropical areas with around 3.6 billion people living in risk areas (Simmons et al., 2012). The disease is caused by a positive sense, single-stranded RNA virus that belongs to genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. The viral genome contains one open reading frame which codes for a large polyprotein that should be cleaved by viral and cellular proteases in order to generate three structural proteins (capsid, membrane and

envelope proteins) and seven non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b and NS5) (Rodenhuis-Zybert et al., 2011).

An infection with one of the DENV serotypes (DENV-1, 2, 3 or 4) can cause a mild, self-limiting febrile illness called dengue fever (DF) and in few cases of primary infection and after secondary infection, a small subset (~0.5%) can develop the severe forms of the disease named dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) (Simmons et al., 2012; Kyle and Harris, 2008). The DHF/DSS development can be linked to the presence of non-neutralizing antibodies against the envelope glycoprotein (E protein). In this case, these non-neutralizing antibodies can bind to the DENV surface and enhance DENV entry and replication in Fc receptor bearing cells, which leads to a higher viremia and a more severe disease (Rothman, 2011).

The DHF and DSS forms are characterized by spontaneous bleeding and plasma leakage after excessive immune activation of T cells and macrophages. These activated cells have been shown to

* Corresponding author at: Laboratório de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro, 700 Centro Alfenas–Minas Gerais–Brazil CEP: 37130-000. Tel.: +55 35 3299 1418; fax: +55 35 3299 1067.

E-mail addresses: coelho@unifal-mg.edu.br, luleomil@yahoo.com (L.F.L. Coelho).

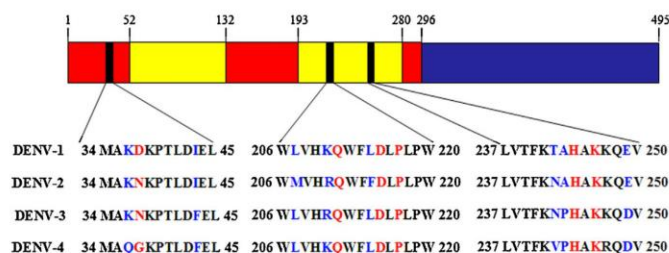


Fig. 1. Selected regions from envelope glycoprotein domains I and II used to construct the synthetic peptides. Domain I is red, domain II is yellow and domain III is blue. The selected regions used to construct the synthetic peptides are black. The amino acids in red correspond to residues N/D37, Q211, D215, P217, H244 and K246. Amino acids marked in blue correspond to residues that differ between the four serotypes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

produce several cytokines in large quantities, which in turn can increase vascular permeability and also cause endothelial dysfunction (Martina et al., 2009; Murphy and Whitehead, 2011). The mounted T cell response, after an initial infection is unable to totally eliminate heterologous serotype infected-cells in a second infection and can also lead to increased cytokine production that can act on the vascular endothelium, contributing to DHF (Murphy and Whitehead, 2011; Rothman, 2011).

While vaccines could potentially prevent the DENV infection or the disease in humans, none are currently licensed despite decades of intensive research (Wan et al., 2013). Until now, several approaches have been developed such as live-attenuated strains, inactivated strains, plasmid vaccines, and also recombinant proteins. Among the DENV proteins, the E protein is the most promising candidate. The E protein has three distinct domains and it is very important in DENV biology. The Domain I is located at the center of the protein; the domain II has an internal fusion loop and participates in membrane fusion and dimerization of E protein and the Domain III participates in receptor binding and is also the main target of the neutralizing antibodies against DENV (Guzman et al., 2010).

Mazumder et al. (2007) employed bioinformatics methods to identify specific conserved regions in the E protein with potential to be used as vaccine for DENV. Using the data described by the study of Mazumder, we designed three tetravalent and conserved synthetic peptides derived from DENV Envelope domain I and II and evaluated the potential of these peptides to induce an effective immune response against DENV.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis

Three peptides were constructed using the previous amino acid sequences identified by Mazumder et al. (2007). In this study, the authors identified six important sites in the E protein present in some conserved sequences in all serotypes using a computational approach. These six sites are conserved among the serotypes of DENV, and are predicted as consensus T cell epitopes and also are exposed in the dimer or trimer of envelope protein. The Pep01 is a synthetic peptide which spanning a conserved region of domain I (residues 34–45). Pep02 and Pep03 are synthetic peptides that spanning conserved regions of domain II (residues 206–220 and 237–250, respectively) (Fig. 1). To cover the differences in these regions between all serotypes, the individual sequence was joined to the next using a glycine tetramer. The sequence of Pep01 is MAKDKPTLDIELGGGMAKMKPTLDIELGGGMAKKNKPTLDFELGGG GMAQGGKPTLDFEL, Pep02 is WL VHKQ WFLDL PLPWGGGGWVMVHRQ WFFDL PLPWGGGGWLVHRQ WFLDL PLPWGGGGWLVHKQ WFLDL PL

LW and Pep03 is LVTFKTAHAKKQEVGGGLVTFKNAHAKKQEVGGGLVTFKKNPHAKKQDVGGGLVTFKVP HAKKQDV. All peptides were synthesized on an Automatic Peptide Synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, California) and were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) at final concentration of 5 mg/mL and filtered using a 0.22 μ m pore filter.

2.2. Cell culture and virus production

C6/36 *Aedes albopictus* cells were grown in L-15 medium (Cultilab, Brazil) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil), 100 μ g/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin at 28 °C. The clinical isolates of DENV-1, 2, 3 and 4 were propagated in C6/36 cells and were isolated from dengue infected patients in Brazil. The propagation of each serotype of DENV was carried out in separate C6/36 cell cultures flasks. The cells were infected with DENV-1, 2, 3 or 4 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 and incubated at 28 °C for a week. After the development of cell syncytia, the supernatants were harvested, and titrated by standard plaque assay using BHK-21 cells.

2.3. Detection of anti-peptide antibodies in Dengue positive human serum samples

Briefly, 96-well microtiter plates were coated with Pep01, Pep02 or Pep03 (2 μ g/well) in carbonate buffer (pH 9.6 0.1 M), incubated overnight at 4 °C and then washed with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST). Subsequently, the plates were blocked with 200 μ L/well of blocking buffer (5% dry milk in PBST) for 2 h at 37 °C. After three washes, 100 μ L of IgM/IgG dengue positive human serum (diluted 1:25) ($n = 16$) were added in duplicate and incubated for 1 h at 37 °C. Human IgM/IgG dengue negative sera ($n = 5$) was used as negative control. All human sera used in this study were also checked for the presence of IgG against *Yellow fever virus* using an *in house* immunoenzymatic assay (Niedrig et al., 1999). After three washes, the plates were incubated for 1 h at 37 °C with 100 μ L/well of horseradish-peroxidase-labeled anti-human IgM (Sigma Aldrich, USA) diluted 1:5000 in PBST or 100 μ L/well of horseradish-peroxidase-labeled anti-human IgG (Sigma Aldrich, USA) diluted 1:8000 in PBST. After four additional washes, the plates were incubated for 15 min with 0.1 mL of 0.045% H_2O_2 and 0.4 mg/mL of o-phenylenediaminedihydrochloride (OPD) in phosphate-citrate buffer (0.1 M citric acid, 0.2 M sodium phosphate dibasic, pH 5.0). The optical densities were read at 450 nm with a microplate reader. The cut-off point was the mean absorbance reading of the negative controls (negative IgM dengue serum) plus two-times the standard deviation.

2.4. Immunization protocol and quantification of total IgG, IgG1 and IgG2a

Six week old male Swiss Webster mice were maintained with free access to sterile food and water and all experimental protocols were approved by the local Animal Experimentation Ethics Committee. Mice were immunized via the subcutaneous route using 50 μ g of Pep01 ($n=9$), Pep02 ($n=9$), Pep03 ($n=9$) or PBS in the presence of incomplete Freund adjuvant (v/v) ($n=6$) on days 0, 7 and 14. The mice were sacrificed 14 days after the last immunization (at day 28). Additional mice were infected once with 4×10^4 plaque forming units (pfu) of DENV-1 ($n=5$) and also sacrificed 28 days after the infection. For all animals, blood and spleens were collected. Blood was collected by cardiac puncture and sera were separated.

To determine the IgM, total IgG, IgG1 and IgG2a titers, an ELISA was performed exactly as described above for quantitation of anti-peptide antibodies, using in this case a serial two-fold dilution of pooled serum as the primary antibody. Furthermore, anti-murine IgM, total IgG, IgG1 or IgG2a (Sigma Aldrich, USA) conjugated with horseradish-peroxidase were used for the IgG subtype determination. The cut-off point was the mean absorbance reading of the negative control (PBS treated animals) plus two-times the standard deviation. The recorded titer was considered to be the greatest dilution of each serum sample that showed reactivity above the cut-off point (Rodrigues et al., 2013).

2.5. Plaque reduction neutralization test (PRNT)

Briefly, heat-inactivated mouse sera were serially diluted two-fold from 1:20 to 1:320 in media and then mixed with a single DENV serotype (50 PFU/well) and incubated for 1 h at 37 °C. The mixture was inoculated onto BHK-21 cells in 24-well plates. Plates were incubated for 1 h before media was aspirated and replaced with 0.5 mL of 0.8% carboxymethylcellulose medium (with 2% FBS). The plates were incubated at 37 °C (5% CO₂) for five days. At that time, cells were stained with a crystal violet solution (0.5% crystal violet, 10% ethanol and 1% paraformaldehyde) for 20 min, washed again, and the viral plaques were counted. The positive-control serum sample was derived from a human patient and the antibody titers were 1:40 for DENV-1 and 1:20 for DENV-2, 3 and 4. Experiments were performed in duplicate.

2.6. Spleen cells culture and DENV infection

The spleen cells from all mice were prepared by gently disrupting spleens using forceps in 5 mL of RPMI 1640 medium with L-glutamine (Sigma Aldrich, USA) and then isolated via centrifugation (500 \times g). The cell pellet was incubated for 4 min with red blood cells lyses buffer (one part of 0.17 mol/L Tris to nine parts of 0.16 mol/L ammonium chloride). The cells were washed again and suspended to a concentration of 1×10^6 cells/mL in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum and antibiotics (100 μ g/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin). The cells were cultured in flat-bottomed 96-well plates at 1×10^5 cells/well with medium for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. After, the spleen cells were infected with 0.01 multiplicity of infection (MOI) of each serotype in separate (DENV-1, 2, 3 or 4) or mock-infected with supernatant derived from C6/36 non-infected cells (20 μ L). After 72 h the supernatants were collected (100 μ L) and used for cytokine quantification and the cell culture were used for cytotoxicity analysis using colorimetric MTT (tetrazolium) assay.

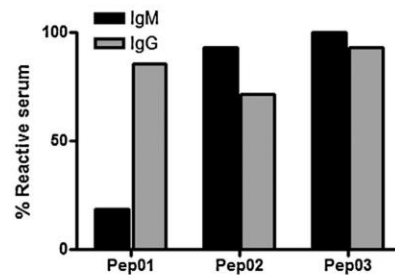


Fig. 2. Reactivity of human IgM/IgG dengue positive serum samples against the synthetic peptides. Human dengue IgM/IgG positive sera ($n=16$) were used in ELISA to verify the reactivity of these samples against Pep01, Pep02 and Pep03.

2.7. Colorimetric MTT (tetrazolium) assay

The cytotoxic activity of T cells present in the splenocyte culture was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method (DIAS et al., 2012). After 72 h post-infection, it was added to the cell culture 10 μ L of MTT dye (5 mg/mL) and the cells were incubated again for an additional 4 h period. Then, the medium was carefully removed and added to 100 μ L of DMSO for solubilization of formazan crystals. The plates were shaken for 5 min and absorbance for each sample was measured in a spectrophotometric microplate reader at 560 nm.

2.8. Cytokine determination

Levels of interleukin-5 (IL-5), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ) in serum and in supernatants were determined by standard sandwich ELISA (PeproTech, USA).

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using analysis of variance followed by the parametric Tukey–Kramer test (INSTAT software, GraphPad, San Diego, CA). A P value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

3. Results

A panel of Dengue IgM/IgG positive human serum ($n=16$) was used to determine their ability to recognize the synthetic peptides (Pep01, Pep02 and Pep03) using an indirect ELISA assay. Of a total of 16 dengue IgM/IgG positive serum, only 3 (18.75%) showed IgM against Pep01; 15 (93.75%) against Pep02 and 16 (100%) against Pep03. The presence of IgG against the peptides was evaluated and 14 sera (87.5%) reacted against Pep01; 11 (68.75%) against Pep02 and 15 (93.75%) against Pep03 (Fig. 2). None of dengue IgM/IgG negative serum showed reactivity against the synthetic peptides in both assays (IgM and IgG).

The immunogenicity of the tetravalent and conserved synthetic peptides was also tested in a murine model by measuring peptide-specific antibody levels (IgM, total IgG, IgG1 and IgG2a subtypes) in the serum from mice previously immunized with the three peptides. Sera from Pep01, Pep02 and Pep03 vaccinated mice had more IgG than IgM. The IgM mean titers were 37 ± 17 for Pep01 and 300 ± 141 for Pep03 (Fig. 3A). Sera from Pep02 immunized animals showed absence of IgM. The mean total IgG titers of Pep01, Pep02 and Pep03 were 96 ± 56 ; 133 ± 46 and 4800 ± 2262 , respectively

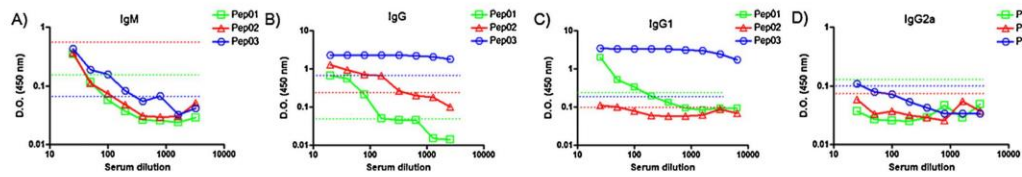


Fig. 3. Humoral immune response in Pep01, Pep02 and Pep03 vaccinated mice. Representative titration curves of antibody dilution for analysis of anti-peptide IgM and IgG antibodies. The sera from immunized animals were pooled and titrated against the tetraivalent peptides. Each dilution was measured in triplicate. (A) IgM specific for Pep01, Pep02 and Pep03. (B) Total IgG specific for Pep01, Pep02 and Pep03. (C) IgG1 subtype specific for Pep01, Pep02 and Pep03 antibodies. (D) IgG2a subtype specific for Pep01, Pep02 and Pep03 antibodies. The dotted lines represent the cut-off values for Pep01 (green), Pep02 (red) and Pep03 (blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

(Fig. 3B). PBS treated and DENV-1 infected mice did not produce detectable levels of anti-peptides antibodies (data not showed). To characterize the IgG subtypes produced by immunized mice, ELISA was conducted to detect IgG1 and IgG2a antibodies against the peptides. The results showed a similar titer for IgG1 compared with that observed for total IgG for Pep01 and Pep03 immunized mice and a lower titer in the Pep02 vaccinated mice (Fig. 3C). In contrast, all immunized mice did not produce any IgG2a antibodies against the peptides (Fig. 3D).

Despite a relatively high level of anti-peptide antibodies in the immunized mice, the PRNT₅₀ showed an absence or a low titer of neutralizing activity in the serum of these animals (Table 1). Serum derived from mice immunized with Pep01 had a neutralizing titer ≤ 20 only for DENV-1 and the serum derived from Pep03 vaccinated animals showed a neutralizing titer ≤ 20 for DENV-1 and DENV-3. Sera from Pep02 immunized mice and DENV-1 infected animals had no detected neutralizing activity (PRNT₅₀ < 1/20).

Analyze of serum showed a significant production of IL-5 in DENV-1 infected animals and also in the Pep01 and Pep02 immunized mice when compared to PBS treated mice (Fig. 4A). In contrast, the Pep03 immunized animals showed a lower IL-5 production and this level was very similar to PBS treated animals and lower than DENV-1 infected animals ($P \leq 0.01$). When IFN- γ levels were analyzed, both the DENV-1 infected animals and the Pep02 immunized mice had a significant production of this cytokine compared to PBS treated animals. However, all mice that were immunized with the synthetic peptides showed a significant lower expression of IFN- γ than DENV-1 infected animals (Fig. 4B). The cytokines IL-10 and TNF- α were not detected in the blood of all groups analyzed (data not showed).

The antigen-specific response was measured through the release of several cytokines by spleen cells derived from mice immunized with the synthetic peptides and also by measuring the cytotoxic activity observed in the spleen cells culture after infection with DENV serotypes. Spleen cells derived from peptides immunized mice showed a high expression of IL-10 ($P < 0.01$) and a lower expression of TNF- α and IFN- γ ($P < 0.001$) after infection

with all DENV serotypes if compared to positive control (Fig. 5A). The cytokine IL-5 was not detected in any analyzed group (Fig. 5A).

In addition to this differential expression of cytokines, also was detected a differential cytotoxicity activity in spleen cells culture after infection with the four DENV serotypes. Spleen cells from animals treated with PBS (negative control), infected with DENV-1 (positive control) and also immunized with Pep01 showed no significant decrease in cell viability after viral infection as compared

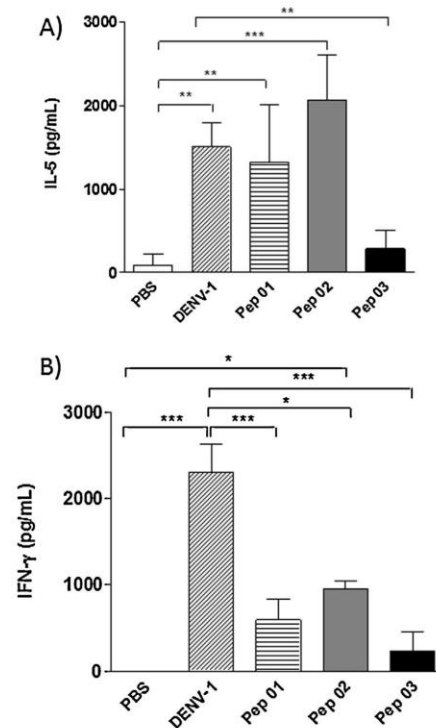


Fig. 4. Serum cytokine levels in Swiss mice infected with DENV-1 are different from mice immunized with the synthetic peptides. Groups of mice were infected with 4×10^4 pfu of DENV-1; inoculated with PBS or immunized with the synthetic peptides via the subcutaneous route. The serum cytokine levels were assessed 21 days post infection or seven days after the last immunization. The scale bars represent the means \pm standard error of four mice per group. * Indicates significance at $P < 0.05$; ** indicates significance at $P < 0.01$ and *** indicates significance at $P < 0.01$.

Table 1
Serum neutralizing antibody titers of Swiss mice immunized with synthetic peptides or infected with DENV-1.

	Neutralizing antibody titers (PRNT ₅₀) ^a			
	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
Pep01	20	ND	ND	ND
Pep02	ND	ND	ND	ND
Pep03	20	ND	20	ND
DENV	ND	ND	ND	ND

^a Titers determined for pool sera obtained at day 21 after last immunization. ND: not detected.

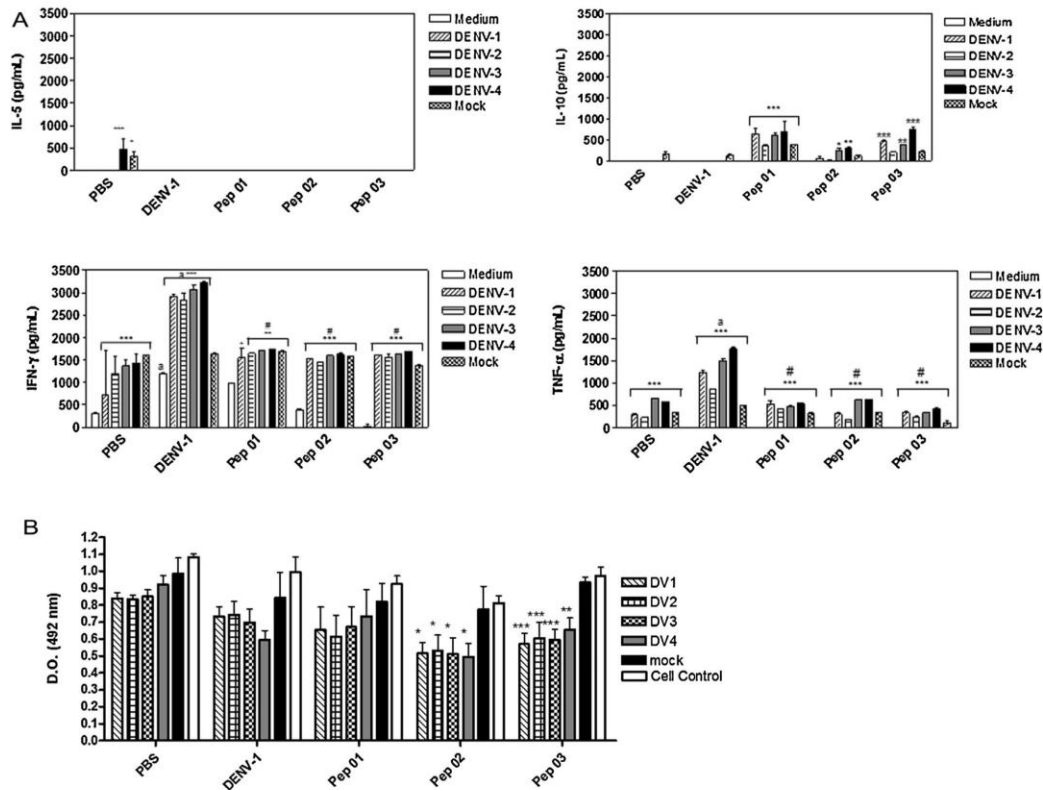


Fig. 5. Cytokine production and cytotoxicity activity in spleen cells infected with all DENV serotypes. (A) Cytokine levels were measured in spleen cell supernatants by sandwich ELISA. Spleen cells were obtained from the mice treated with PBS ($n=4$); infected with 4×10^4 pfu of DENV-1 ($n=4$) or immunized with Pep01 ($n=4$) or Pep02 ($n=4$) or Pep03 ($n=4$). The spleen cells were infected with all DENV serotypes or mock-infected with supernatant derived from C6/36 non-infected cells for 72 h. The scale bars represent the means \pm standard error. * Indicates significance at $P < 0.05$ compared cells treated with medium; ** indicates significance at $P < 0.01$ compared with cells treated with medium; *** indicates significance at $P < 0.001$ compared with cells treated with medium; # indicates significance at $P < 0.05$ compared with DENV-1 infected mice and (a) indicates significance at $P < 0.001$ compared with cells from PBS-treated animals. (B) Differential cytotoxic activity in spleen cells infected with DENV serotypes. The cytotoxic activity was measured in spleen cell cultures by MTT assay. The scale bars represent the means \pm standard error. * Indicates significance at $P < 0.05$ compared non-infected cells.

to uninfected cells and mock infected cells. However, the spleen cells derived from mice immunized with Pep02 and Pep03 showed a significant reduction in cell viability after infection with DENV serotypes when compared to uninfected cells and mock infected cells (Fig. 5B).

4. Discussion

All synthetic peptides were designed based in data described by Mazumder et al. (2007). Using a computational approach, the authors identified six important sites in some conserved sequences of E protein. These previous amino acid sequences are highly conserved among the four serotypes of DENV, are predicted as T cell epitopes and also are exposed in the dimer or trimer of E protein. In our study we designed and synthesized three tetravalent peptides that harbor all sites identified by Mazumder et al. (2007) (Fig. 1).

To determine whether the peptides could be recognize by antibodies elicited by natural DENV infection in humans, serum samples from patients with laboratory confirmed DENV infection were evaluated. All synthetic peptides showed reactivity against

dengue IgM/IgG positive serum samples (Fig. 2). These data indicate that in natural infection by DENV there is a production of some antibodies (IgM and IgG) that are able to bind to the synthetic peptides and this strengthens the idea that these conserved amino acid sequences identified by Mazumder et al. (2007) are able to induce an immune response.

The immunogenicity of these peptides was confirmed in a murine model of immunization (Fig. 3). The antibody production in animal model after immunization with all peptides and the optical density observed in ELISA assay using human sera and Pep03 as substrate (see supplementary figure) strengthens the idea that Pep03 is more immunogenic than Pep01 and Pep02. One probable explanation for the higher immunogenicity of Pep03 is the facility of this peptide to bind to MHC and also be presented to T cells.

Recent studies indicate that the antibody response to DENV infection consists of a minor population of strongly neutralizing antibody and a major population of cross-reactive, non-neutralizing antibodies with potential for enhancement of virus infection and disease (de Alwis et al., 2011; Schieffelin et al., 2012; Beltramello et al., 2010). These observations were in

agreement with the ELISA and PRNT results. Despite a relatively high level of anti-peptides antibodies in the immunized mice (showed in the ELISA results), the PRNT showed a weak neutralizing activity (PRNT₅₀ < 1/20) only against DENV-1 (Pep01) or DENV-1/DENV-3 (Pep03).

The pathogenesis of DENV infection is characterized by a complex interplay of viral and host factors. The mechanisms whereby DENV infection leads to increased vascular permeability, especially in the severe forms of the disease are yet not fully understood (Halstead, 2012). The pathogenesis of DENV could be explained by the antibody enhancement theory and also by cross-reactive memory T cells activation. In these two theories is observed an over production of cytokine release. Many studies have shown that TNF- α , IL-10, IFN- γ and IL-4 along with several other cytokines were elevated in patients with DHF when compared to the classical form of disease and this high reactivity to DENV infection is attributed in part to cross-reactive T cells that can produce high concentrations of pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ and TNF- α in a secondary infection (Martina et al., 2009; Dong et al., 2007; Mongkolsapaya et al., 2006; Mangada and Rothman, 2005).

The sequential infection with different DENV serotypes may alter the cytokine response of cross-reactive CD4 and CD8T cells, resulting in a high production of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α . This event is a consequence of the presence of cross-reactive epitopes that preferentially reactivate the T cells, resulting in an inefficient immune response to the heterologous serotype (Martina et al., 2009; Dong et al., 2007; Mongkolsapaya et al., 2006; Mangada and Rothman, 2005; Rothman, 2010; 2011). Therefore, an ideal dengue vaccine should be able to induce a low secretion of pro-inflammatory cytokines and also an effective cellular response to all DENV serotypes in secondary infections made by heterologous serotype.

We showed that spleen cells derived from peptide immunized mice had a lower expression of TNF- α and IFN- γ after in vitro infection with all DENV serotypes and also a significant cytotoxic activity in the DENV infected spleen cells derived from Pep02 and Pep03. The absence of a significant cytotoxic activity in the other groups after in vitro infection of all DENV serotypes, especially in the DENV-1 infected mice, strengthens the potential of these peptides to induce an effective T cell response against all DENV serotypes. According to the data described by Prestwood et al. (2012), the spleen cells could be an appropriate model to evaluate the T cell cross-reactivity because the cell culture derived from infected or immunized animals would have the primed T cells (TCD4 and TCD8) and also the permissive cells (macrophages) for the DENV in vitro infection and replication. Therefore, the quantification of cell viability in spleen cells infected with DENV could also indicate the specific cytotoxic activity of TCD8 cells against the DENV infected cells.

5. Conclusions

Thus, these peptides, and specially the Pep03, are able to induce a humoral response characterized by antibodies with low neutralizing activities and probably a T cell response that could be beneficial to induce an effective immune response against all DENV serotypes. These data strengthens the potential use of these peptides in a dengue vaccine formulation. However, further studies in peptide sequence will be required to induce the production of neutralizing antibodies against all four DENV serotypes and also to improve immunogenicity of these peptides.

Acknowledgements

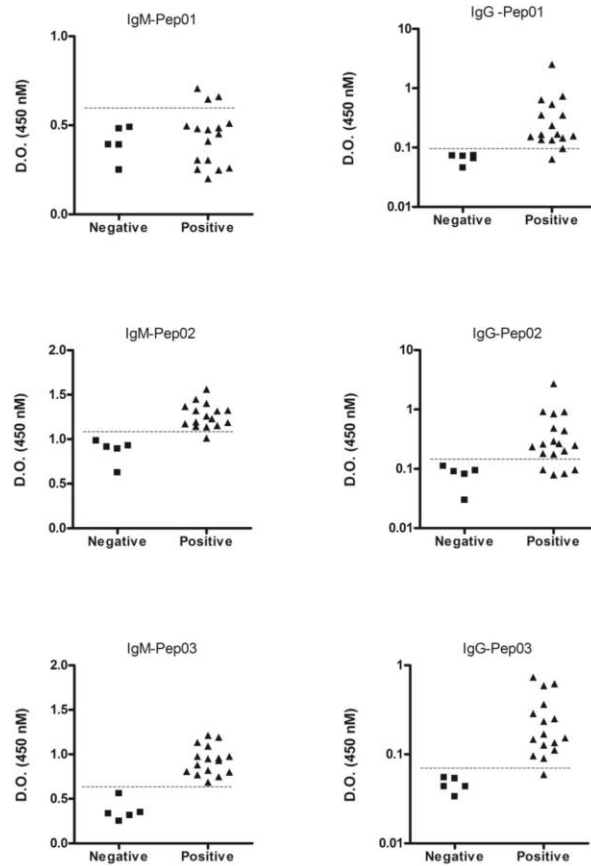
Financial support was provided by The Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) grant APQ-04684-10.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.009>.

References

- Beltramello, M., Williams, K.L., Simmons, C.P., Macagno, A., Simonelli, L., Quyen, N.T., Sukupolvi-Petty, S., Navarro-Sanchez, E., Young, P.R., de Silva, A.M., Rey, F.A., Varani, L., Whitehead, S.S., Diamond, M.S., Harris, E., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2010. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 8 (3), 271–283.
- de Alwis, R., Beltramello, M., Messer, W.B., Sukupolvi-Petty, S., Wahala, W.M., Kraus, A., Olivarez, N.P., Pham, Q., Brien, J.D., Tsai, W.Y., Wang, W.K., Halstead, S., Kliks, S., Diamond, M.S., Baric, R., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., de Silva, A.M., 2011. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (6), e1188.
- Dong, T., Moran, E., Vinh Chau, N., Simmons, C., Luhn, K., Peng, Y., Wills, B., Phuong Dung, N., Thi Thu Thao, L., Hien, T.T., McMichael, A., Farrar, J., Rowland-Jones, S., 2007. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PLoS ONE* 2 (12), e1192.
- Guzman, M.G., Hermida, L., Bernardo, L., Ramirez, R., Guillen, G., 2010. Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. *Expert Rev. Vaccines* 9 (2), 137–147.
- Halstead, S.B., 2012. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr. Int. Child. Health* 32 (Suppl. 1), 5–9.
- Kyle, J.L., Harris, E., 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 71–92.
- Mangada, M.M., Rothman, A.L., 2005. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J. Immunol.* 175 (4), 2676–2683.
- Martina, B.E., Koraka, P., Osterhaus, A.D., 2009. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin. Microbiol. Rev.* 22 (4), 564–581.
- Mazumder, R., Hu, Z.Z., Vinayaka, C.R., Sagripanti, J.L., Frost, S.D., Kosakovsky Pond, S.L., Wu, C.H., 2007. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus Genes* 35 (2), 175–186.
- Mongkolsapaya, J., Duangchinda, T., Dejinrattisai, W., Vasanawathana, S., Avirutnan, P., Jairungsri, A., Khemnu, N., Tangthawornchaikul, N., Chotiyarnwong, P., Sae-Jang, K., Koch, M., Jones, Y., McMichael, A., Xu, X., Malasit, P., Screaton, G., 2006. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J. Immunol.* 176 (6), 3821–3829.
- Murphy, B.R., Whitehead, S.S., 2011. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 587–619.
- Niedrig, M., Lademann, M., Emmerich, P., Lafrenz, P., 1999. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop. Med. Int. Health* 4, 867–871.
- Prestwood, T.R., May, M.M., Plummer, E.M., Morar, M.M., Yauch, L.E., Shresta, S., 2012. Trafficking and replication patterns reveal splenic macrophages as major targets of dengue virus in mice. *J. Virol.* 86 (22), 12138–12147.
- Rodenhuis-Zybert, I.A., Wilschut, J., Smit, J.M., 2011. Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus? *Trends Microbiol.* 19 (5), 248–254.
- Rodrigues, N.F., van Tilburg Bernardes, E., Rocha, R.P., da Costa, L.C., Coutinho, A.C., dos Santos Muniz, M., Pereira, A.A., da Silva, P.H., Malaquias, L.C., Coelho, L.F., 2013. Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Vaccine* 31 (44), 5062–5066.
- Rothman, A.L., 2010. Cellular immunology of sequential dengue virus infection and its role in disease pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 338, 83–98.
- Rothman, A.L., 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat. Rev. Immunol.* 11 (8), 532–543.
- Schieffelin, J.S., Costin, J.M., Nicholson, C.O., Orgeron, N.M., Fontaine, K.A., Isern, S., Michael, S.F., Robinson, J.E., 2012. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virol. J.* 7, 28.
- Simmons, C.P., Farrar, J.J., Nguyen, V., Wills, B., 2012. Dengue. *N. Engl. J. Med.* 366 (15), 1423–1432.
- Wan, S.W., Lin, C.F., Wang, S., Chen, Y.H., Yeh, T.M., Liu, H.S., Anderson, R., Lin, Y.S., 2013. Current progress in dengue vaccines. *J. Biomed. Sci.* 13, 20–37.



Supplementary Figure: Presence of IgM and IgG antibodies against synthetic peptides in human IgM/IgG dengue positive and negative serum samples. Human dengue IgM/IgG positive sera (n=16) and negative (n=5) were used in ELISA to verify the reactivity of these samples against Pep01, Pep02 and Pep03. The dotted lines represent the cut-off values in each assay.