

Campus Realengo

Curso de Graduação em Farmácia

Laryssa Dias de Oliveira

**Vacinas gênicas contra a
dengue baseadas na
proteína do envelope viral:
uma revisão da literatura e
análises preliminares de
uma vacina de DNA
tetraivalente**

Rio de Janeiro

2021

LARYSSA DIAS DE OLIVEIRA

VACINAS GÊNICAS CONTRA A DENGUE BASEADAS NA PROTEÍNA DO
ENVELOPE VIRAL: UMA REVISÃO DA LITERATURA E ANÁLISES PRELIMINARES
DE UMA VACINA DE DNA TETRAVALENTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora Acadêmica: Prof^a Dr^a. Camila Alves Bandeira Falcão (IFRJ)

Orientadora Científica: Dr^a. Simone Morais da Costa (Fiocruz).

RIO DE JANEIRO

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Alane Elias Souza

Bibliotecária - CRB 7 n° 6321

O48

Oliveira, Laryssa Dias de.

Vacinas gênicas contra a dengue baseadas na proteína do envelope viral: uma revisão da literatura e análises preliminares de uma vacina de DNA tetravalente. / Laryssa Dias de Oliveira, 2021.

66f. ; il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2021.

Orientadoras: Camila Alves Bandeira Falcão, Simone Morais da Costa.

1. Dengue. 2. Vacinas gênicas. 3. Vacina de DNA. 4. Proteína E. 5. Tetravalente. I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Falcão, Camila Alves Bandeira. III. Costa, Simone Morais da. IV. Título.

COBIB/CReal

CDU 615

LARYSSA DIAS DE OLIVEIRA

VACINAS GÊNICAS CONTRA A DENGUE BASEADAS NA PROTEÍNA DO
ENVELOPE VIRAL: UMA REVISÃO DA LITERATURA E ANÁLISES PRELIMINARES
DE UMA VACINA DE DNA TETRAVALENTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
do Rio de Janeiro (IFRJ), como requisito parcial para
a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em ____ / ____ / ____.

Banca examinadora

Dra. Camila Alves Bandeira Falcão (Orientadora Acadêmica) - Doutora em Ciências
Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Dra. Simone Morais da Costa (Orientadora Científica) - Doutora em Biologia Celular e
Molecular, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Dra. Débora Leandro Rama Gomes (Banca Examinadora) - Doutora em Microbiologia
Médica Humana, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Dra. Renata Monteiro Maia (Banca Examinadora) - Doutora em Biologia Celular e
Molecular, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Ma. Andresa Borges de Araujo Fonseca (Banca Examinadora - Suplente) - Mestre em
Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Dedico este trabalho à minha família que
sempre me apoiou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me concedido a aprovação no Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), por força e resiliência para que eu pudesse trilhar esse longo caminho da graduação durante 5 anos.

À minha família, minha mãe Beatriz e minha avó Nilza, por todo apoio e por serem minha base desde sempre, por lembrarem todos os dias que sou o orgulho da casa e por me incentivarem a estudar cada vez mais. Certamente, eu não seria nada sem elas.

Às minhas orientadoras da Fiocruz, Ada Maria e Simone Costa, que acreditaram no meu potencial e me acolheram desde 2019 no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais (LABIFIV), e por toda paciência e dedicação para me auxiliar na elaboração deste trabalho. Também sou grata por todos os amigos que fiz no laboratório, por toda ajuda que recebi, principalmente, da Paola Beatriz, Beatriz Lopes, Agatha, Thiago e Pedro.

À minha orientadora interna e professora, Camila Falcão pelas excelentes aulas de imunologia/parasitologia e por toda ajuda neste trabalho.

Ao meu namorado, Wallace, por sempre me lembrar de que sou capaz de alcançar os meus objetivos, e aos meus amigos da faculdade, especialmente Leonardo, Milena e Maria, que foram essenciais para que eu pudesse estar aqui hoje e por embarcarem comigo em grandes desafios e conquistas desde a escrita de artigos científico, como a fundação de uma das primeiras ligas acadêmicas do IFRJ *campus* Realengo, a Liga Acadêmica de Farmacologia e Farmacotécnica (LAFF).

Aos meus professores, que sem dúvidas, marcaram a minha vida, especialmente, Débora Rama, Beatriz Patrício, Murilo Marinho, Ana Ribeiro, Eduardo Rodrigues, Lêda Glicério, Anne Caroline e Pamella Sampaio. Sou muito grata por todo aprendizado.

Agradeço também à banca, Débora Rama, Renata Maia e Andresa Fonseca, por aceitarem fazer parte deste momento tão especial na minha vida.

*“O sucesso é a soma de
pequenos esforços repetidos dia
após dia.”*

(Robert Collier)

OLIVEIRA, L. D. Vacinas gênicas contra a dengue baseadas na proteína do envelope viral: uma revisão da literatura e análises preliminares de uma vacina de DNA tetravalente. 66p. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Farmácia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *campus* Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

RESUMO

A dengue é uma arbovirose endêmica em regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil, cuja incidência de quadros graves é maior em pessoas que foram expostas a infecções secundárias por sorotipos heterólogos. Uma das principais dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue é a necessidade de indução de resposta protetora contra os quatro sorotipos virais (DENV 1-4). A glicoproteína E é o principal componente na superfície viral, e é capaz de induzir anticorpos neutralizantes que impedem a entrada do vírus na célula hospedeira. Em vista disso, tem sido alvo do desenvolvimento da maioria das vacinas contra a dengue. Atualmente, dentre as diferentes tecnologias, as vacinas gênicas têm representado uma importante inovação e protagonismo na tentativa de controle da doença.. Muitos grupos se dedicam à vacinas contendo apenas a proteína E, e ao seu domínio III (EDIII), devido a sua interação com receptores da célula alvo. Outros apostam na associação prM-E, uma vez que a proteína pré membrana possui um importante papel na conformação da proteína E durante a replicação viral. Ensaio pré-clínicos têm demonstrado que esses antígenos são capazes de induzir respostas imunes humoral e celular, além de proteção. Dessa forma, neste trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica sobre vacinas de DNA e RNA contra a dengue baseadas na proteína E. Ainda no presente estudo, foi iniciada a avaliação de uma formulação tetravalente composta por vacinas de DNA baseadas no ectodomínio da proteína E de DENV 1, 2, 3 e 4. Sendo assim, foram utilizadas as vacinas de DNA pE1D1, pE1D3 e pE1D4, as quais contêm as sequências que codificam a proteína E de DENV1, 3 e 4, respectivamente. Inicialmente, estes plasmídeos foram purificados, digeridos e sequenciados, confirmando os insertos clonados. As análises *in vitro* de células BHK-21 transfectadas com as vacinas de DNA indicaram que os quatro plasmídeos foram capazes de mediar a expressão das proteínas recombinantes dos quatro sorotipos virais. Além disso, camundongos BALB/c foram imunizados com os plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3 ou pE1D4 para a aquisição de soro imune que será utilizado futuramente nas análises da resposta imune humoral gerada por estas vacinas de DNA.

Palavras-chave: Dengue. Vacinas gênicas. Vacina de DNA. Proteína E. Tetravalente.

OLIVEIRA, L. D. Gene dengue vaccines based on the viral envelope protein: a literature review and preliminary analysis of a tetravalent DNA vaccine. 66p. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Farmácia. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *campus* Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

ABSTRACT

Dengue is an arbovirus endemic in tropical and subtropical regions, including Brazil, whose incidence of severe conditions is higher in people who have been exposed to secondary infections by heterologous serotypes. One of the main difficulties for the development of a vaccine against dengue is the need to induce a protective response against the four viral serotypes (DENV 1-4). The E glycoprotein is the major component of the virion surface and it is able to induce neutralizing antibodies that prevent the virus from entering the host cell. For this reason, this protein has been the target for development of most dengue vaccines. Currently, among the different technologies, gene vaccines represent an important innovation and protagonism in the fight against this disease. Thus, in this work a literature review on DNA and RNA vaccines against dengue was carried out. Many groups are dedicated to vaccines containing only the E protein, and its domain III (EDIII), due to its interaction with receptors on the target cell. Others bet on the prM-E association, since the pre-membrane protein plays an important role in the conformation of the E protein during viral replication. Preclinical trials have shown that these antigens are able to induce humoral and cellular immune responses, in addition to protection. Also in the present study, we started the evaluation of a tetravalent formulation composed of DNA vaccines based on the E ectodomain from DENV 1, 2, 3 and 4. Therefore, the DNA vaccines pE1D1, pE1D3 and pE1D4 were used, were used because they contain sequences that encode the sequences that encode the DENV1, 2, 3 E protein, respectively. Initially, these plasmids were purified, digested and sequenced, confirming the cloned inserts. *In vitro* analysis of BHK-21 cells transfected with the DNA vaccines indicated that the four plasmids were able to mediate the expression of recombinant proteins from the four viral serotypes. Furthermore, BALB/c mice were immunized with plasmids pE1D1, pE1D2, pE1D3 or pE1D4 for the acquisition of immune serum that will be used in the future analysis of the humoral immune response generated by these DNA vaccines.

Keywords: Dengue. Gene vaccines. DNA vaccine. Protein E. Tetravalent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global da dengue.....	16
Figura 2 - Distribuição da taxa de incidência de dengue por município no Brasil no ano de 2021 (03/01/2021-01/01/2022).....	17
Figura 3 - Representação do genoma viral do DENV e da poliproteína precursora das proteínas virais.....	18
Figura 4 - Representação esquemática do DENV.....	19
Figura 5 - Ciclo de replicação do DENV.....	21
Figura 6 - Representação da proteína E e seus domínios.....	22
Figura 7 - Representação esquemática dos plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3, pE1D4 e pcTPA.....	32
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4 com as enzimas de restrição EcoR V e Xba I.....	49
Figura 9 - Expressão in vitro das proteínas E recombinantes em células BHK-21 transfectadas com as vacinas de DNA pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Vacinas tetravalentes candidatas contra a dengue.....	26
Quadro 3 - Vacinas de RNA candidatas contra a dengue com base na proteína E e outros antígenos.....	38
Quadro 3 - Vacinas de DNA candidatas contra a dengue com base apenas na proteína do envelope viral.....	41
Quadro 4 - Vacinas de DNA candidatas contra a dengue com base em prM-E.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE: Do inglês *Antibody-dependent enhancement* (Aumento da replicação viral dependente de anticorpo)

Amp R: Gene que confere resistência à ampicilina

BHK-21: Célula de rim de hamster neonato

C: Proteína do capsídeo

CMV pro: Promotor derivado do citomegalovírus

COIE1 ori: Origem de replicação bacteriana

COVID-19: Do inglês *Corona Virus Disease 19* (Doença do Coronavírus 19)

DENV 1: Vírus da dengue sorotipo 1

DENV 2: Vírus da dengue sorotipo 2

DENV 3: Vírus da dengue sorotipo 3

DENV 4: Vírus da dengue sorotipo 4

DENV: Vírus da dengue

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSS: Síndrome do choque da dengue

E: Proteína do envelope

EDI: Domínio I da proteína do envelope

EDII: Domínio II da proteína do envelope

EDIII: Domínio III da proteína do envelope

FD: Febre da dengue

FHD: Febre hemorrágica da dengue

GSK: *Glaxo Smith Kline*

IFN- γ : Interferon gama

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

kb: kilobase

kDa: kiloDaltons

M: Proteína de Membrana

mRNA: RNA mensageiro

Neo R: Gene que confere resistência à neomicina

NIH: *National Institute of Health*

NS1: Proteína não-estrutural 1

NS2A: Proteína não-estrutural 2A

NS2B: Proteína não-estrutural 2B

NS3: Proteína não-estrutural 3

NS4A: Proteína não-estrutural 4A

NS4B: Proteína não-estrutural 4B

NS5: Proteína não-estrutural 5

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORF: Do inglês *Open reading frame* (Fase de leitura aberta)

Poly A SV40: Região de poliadenilação derivada do vírus símio 40

PolyA BGH: Região de poliadenilação derivada do citomegalovírus humano

prM: Proteína pré-Membrana

RNA: Ácido ribonucleico

SV40 pro: Promotor derivado do vírus símio 40

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

t-PA: Ativador de plasminogênio de tecido humano

VERO: Células epiteliais renais de macaco verde africano.

WRAIR: *Walter Reed Army Institute of Research*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 A DENGUE.....	15
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.2.1 Dengue no Mundo	16
1.2.2 Dengue no Brasil	17
1.3 O VÍRUS DA DENGUE.....	18
1.3.1 Ciclo replicativo	20
1.3.2 Proteína E	22
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	23
1.5 PATOGÊNESE.....	24
1.6 VACINAS CONTRA A DENGUE.....	25
1.7 OBJETIVOS.....	30
1.7.1 Objetivo Geral	30
1.7.2 Objetivos Específicos	30
2 DESENVOLVIMENTO	31
2.1 METODOLOGIA.....	31
2.1.1 Revisão Bibliográfica	31
2.1.2 Avaliação das vacinas de DNA baseadas na proteína E	31
2.1.2.1 Plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3, pE1D4 e pcTPA.....	31
2.1.2.2 Purificação dos plasmídeos recombinantes.....	33
2.1.2.3 Expressão <i>in vitro</i> das proteínas recombinantes.....	34
2.1.2.4 Imunização de camundongos.....	35
2.2 RESULTADOS.....	36
2.2.1 Revisão Bibliográfica: Vacinas gênicas contra a dengue baseadas na proteína do envelope viral	36
2.2.1.1 Vacinas de RNA.....	36

2.2.1.1.1 Vacinas de RNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína E.....	38
2.2.1.2 Vacinas de DNA.....	39
2.2.1.2.1 Vacinas de DNA contra a dengue baseadas apenas na proteína E.....	41
2.2.1.2.2 Vacinas de DNA baseadas em prM-E.....	44
2.2.1.2.3 Vacinas de DNA baseadas na proteína E e outros antígenos.....	47
2.2.1.2.4 Vacinas de DNA baseadas na proteína E e outras técnicas vacinais.....	47
2.2.2 Estudo experimental: Avaliação de uma vacina de DNA tetravalente contra a dengue baseada na proteína E.....	48
2.2.2.1 Análise da integridade e pureza dos DNAs plasmidiais pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4.....	48
2.2.2.2 Análise da expressão <i>in vitro</i> da proteína E dos quatro sorotipos de dengue em células BHK-21 transfectadas com as vacinas de DNA pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4.....	49
2.3 DISCUSSÃO.....	51
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DENGUE

A dengue é a arbovirose (doença transmitida por artrópodes) considerada um dos mais sérios problemas de saúde pública do mundo (LAUGHLIN *et al.*, 2012). Trata-se de uma doença sistêmica, de etiologia viral, cujo agente etiológico, o vírus da dengue (DENV), compreende quatro sorotipos antigenicamente distintos, mas geneticamente relacionados: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 (GUZMAN *et al.*, 2010; VASILAKIS, 2009; WEAVER; YUNG *et al.*, 2015).

O DENV é transmitido aos seres humanos pela picada do mosquito fêmea infectado do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor no continente americano. Sua disseminação ocorre em países tropicais e subtropicais, principalmente, em grandes centros urbanos e semiurbanos, onde as condições do meio ambiente favorecem a sua proliferação (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2006). Além do vírus da dengue, este vetor também pode transmitir os vírus da zika e chikungunya, arboviroses que também expressam relevância pública, uma vez que podem acarretar em sintomas graves (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

A disseminação da doença nas últimas décadas representa uma problemática de caráter mundial, sobretudo devido às dificuldades encontradas no controle de epidemias. Uma vez que apenas o controle ao vetor torna-se insuficiente e considerando a indisponibilidade de terapias medicamentosas para o manejo dos sintomas e cura da doença até o momento, medidas preventivas, como o desenvolvimento de vacinas, tornam-se de suma importância para a temática (RATHER *et al.*, 2017).

Atualmente, há uma vacina contra a dengue licenciada no Brasil e comercializada pela Sanofi Pasteur, a Dengvaxia (SCHWARTZ *et al.*, 2015). No entanto, estudos têm demonstrado que quando administrada em indivíduos que não tiveram contato prévio com o vírus, as chances de desenvolver a forma mais grave da doença são maiores caso os indivíduos sejam infectados posteriormente. Nesse sentido, passou-se a recomendar que indivíduos soronegativos não fossem vacinados com a Dengvaxia (MARTINEZ-VEGA *et al.*, 2017).

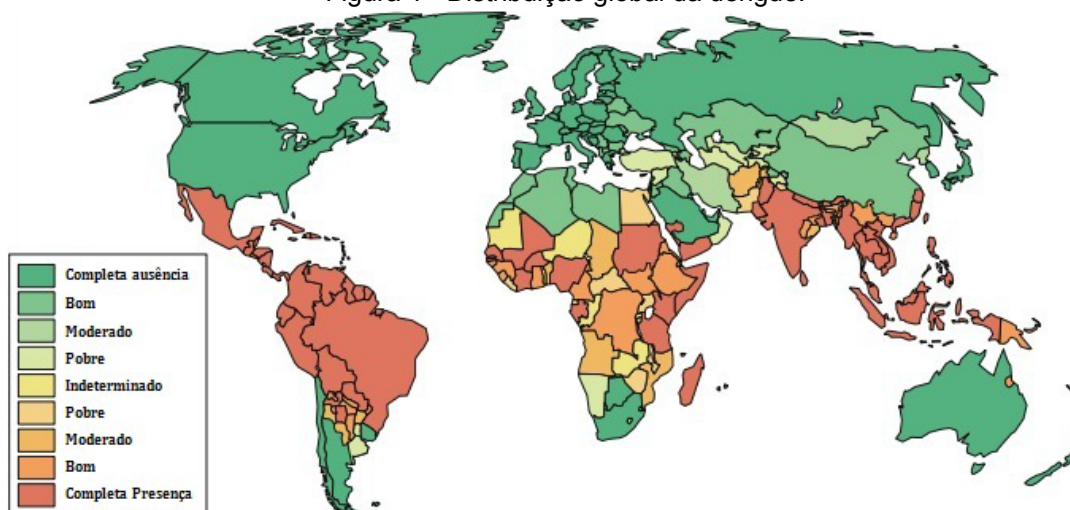
1.2 EPIDEMIOLOGIA

1.2.1 Dengue no Mundo

A Organização Mundial da Saúde (OMS) avalia que a incidência da dengue no mundo aumentou, aproximadamente, 30 vezes nos últimos 50 anos, atingindo mais de 110 países (WHO, 2016) (Figura 1). Estima-se que 390 milhões de pessoas sejam infectadas pelo vírus da dengue anualmente, e que, aproximadamente, metade da população mundial esteja em risco de contrair a doença (BHATT *et al.*, 2013; GUZMAN *et al.*, 2010).

Acredita-se que uma considerável parte desses episódios é fruto do aumento da urbanização e de constantes mudanças climáticas, além de questões relacionadas ao controle do *Aedes* - controles químico, biológico e físico - bem como a falta de políticas públicas que envolvam o abastecimento regular de água e coleta regular de lixo. Esses fatores acarretam um aumento da exposição, em virtude da distribuição geográfica dos vetores, tornando-a, assim, uma ameaça para regiões que não sofrem com a dengue endêmica frequentemente (LWANDE *et al.*, 2019).

Figura 1 - Distribuição global da dengue.



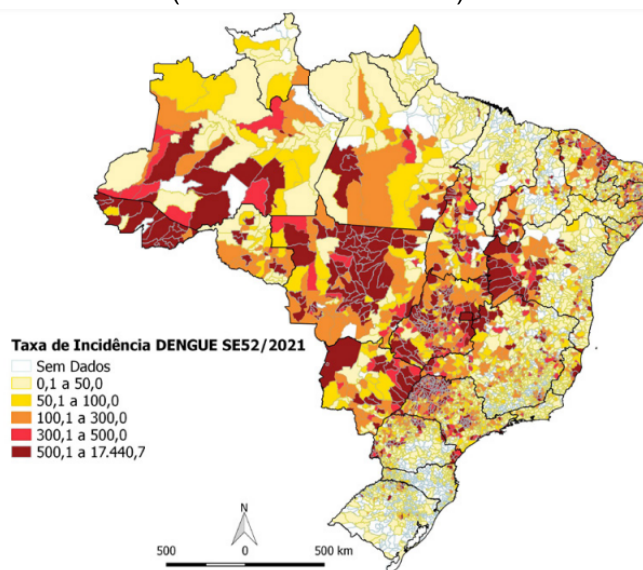
Legenda: Mapa construído com base em dados de estudos disponíveis e evidências consensuais, indicando desde a ausência até as altas incidências da dengue. A cor verde indica a ausência da dengue em determinado país, enquanto a cor laranja indica a presença dessa doença. Quanto mais escuras as cores, mais dados estão disponíveis, suportando a conclusão da ausência ou presença da dengue em determinado país. Fonte: Modificado de Flores e O'Neill, 2018.

1.2.2 Dengue no Brasil

O Brasil é um dos países que sofre com a situação de hiperendemicidade da doença, sendo alvo da co-circulação dos 4 sorotipos da dengue, o que propicia maiores riscos de desenvolvimento de casos considerados graves. Trata-se de um dos países responsáveis pelo maior número de pessoas infectadas pelo DENV desde 1908 (NOGUEIRA; EPPINGHAUS, 2011; RAMOS-CASTANEDA *et al.*, 2017). O registro de maior epidemia da doença no país ocorreu no ano de 2015, onde foram notificados 1.649.008 casos confirmados e 986 óbitos. Nesse mesmo ano, ainda foi possível ressaltar o agravante da introdução do vírus da zika, também transmitido pelo *Aedes* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Segundo o Ministério da Saúde, de 3 de janeiro de 2021 a 1 de janeiro de 2022, foram notificados 544.460 casos prováveis de dengue no país (taxa de incidência de 255,2 casos por 100 mil habitantes), o que representa uma redução de 42,6% de casos registrados em relação ao mesmo período de 2020 (Figura 2). No entanto, especialistas acreditam que essa diminuição pode ser uma consequência de uma subnotificação ou até mesmo um atraso nas notificações dos casos prováveis e óbitos, devido à pandemia da COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 19*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Figura 2 - Distribuição da taxa de incidência de dengue por município no Brasil no ano de 2021 (03/01/2021-01/01/2022).



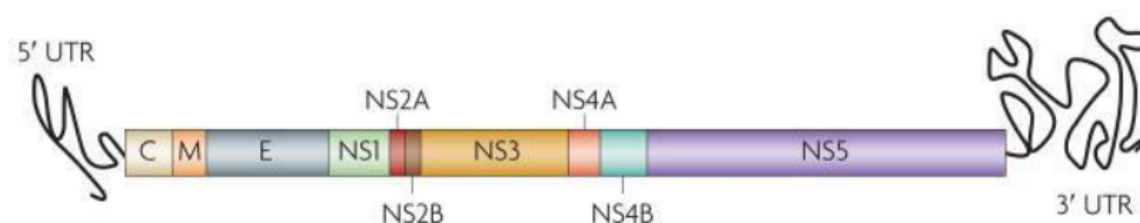
Fonte: Ministério da Saúde, 2022.

1.3 O VÍRUS DA DENGUE

O vírus da dengue é um arbovírus que pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Os quatro sorotipos virais são capazes de causar a doença no homem. Além disso, a infecção por um sorotipo proporciona imunidade permanente específica para o sorotipo infectante e imunidade cruzada em curto prazo para os outros sorotipos virais (HENCHAL; PUTNAK, 1990; YUNG *et al.*, 2015).

Esse vírus é caracterizado por ser uma partícula esférica, envelopada, com bicamada lipídica e possuir, aproximadamente, 50nm de diâmetro quando maduro (RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010). Seu genoma consiste em um RNA de fita simples de polaridade positiva com cerca de 11kb de extensão, o qual é traduzido através de uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês *Open reading frame*). A tradução do genoma viral resulta em uma poliproteína que, ao ser clivada por proteases da célula infectada e pela protease viral, gera três proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais, representadas na figura 3 (HEINZ; STIASNY, 2012; KUHN *et al.*, 2002).

Figura 3 - Representação do genoma viral do DENV e da poliproteína precursora das proteínas virais.

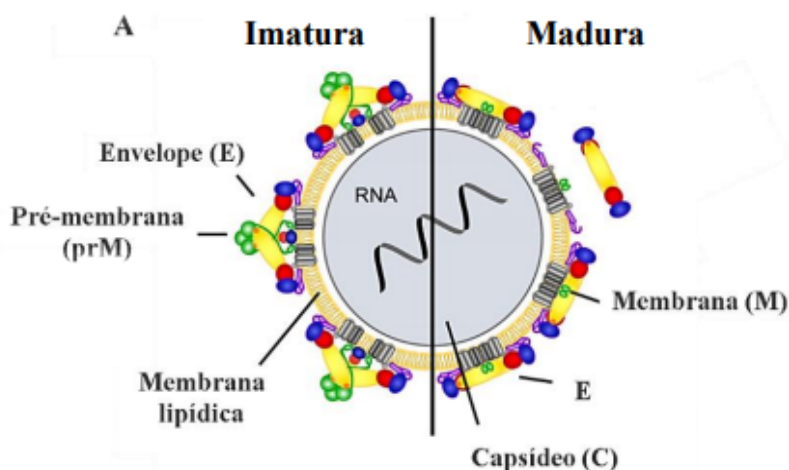


Legenda: O genoma, RNA de fita simples de polaridade positiva, possui apenas uma única fase de leitura aberta e sua tradução é direcionada para o Retículo Endoplasmático, gerando uma poliproteína precursora das proteínas virais estruturais (C, prM/M e E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) entre as regiões não codificantes 3'UTR e 5'UTR. Fonte: GUZMAN *et al.*, 2010.

As três proteínas estruturais são as proteínas do capsídeo (C), localizada no nucleocapsídeo, e as proteínas de pré membrana/membrana (prM/M) e do envelope (E), localizadas na bicamada lipídica, fundamentais para a estruturação viral (Figura 4). Já as sete proteínas não estruturais, denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5, são importantes no processo de replicação viral, montagem de

novas partículas e modulação da resposta imune do hospedeiro (ELONG NGONO; SHRESTA, 2018; KHETARPAL; KHANNA, 2016; ZEIDLER *et al.*, 2017).

Figura 4 - Representação esquemática do DENV.



Legenda: (A) Modelo esquemático de uma partícula de flavivírus. O capsídeo contém o RNA viral e múltiplas cópias da proteína C. A superfície das partículas é composta por heterodímeros das proteínas prM-E. As partículas maduras não possuem a porção pr da proteína M. Fonte: VRATSKIKH *et al.*, 2013.

A proteína E é um dos antígenos mais explorados para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue, porque encontra-se em abundância na superfície do vírus e trata-se de uma proteína mediadora da interação célula-vírus durante a infecção viral (DIAMOND, 2003; LINDENBACH, 2007; MODIS *et al.*, 2003). Considerando que a proteína E é foco deste trabalho, suas características serão detalhadas no item 1.3.2.

A proteína do capsídeo (C) compõe o nucleocapsídeo viral. Essa proteína se associa à bicamada lipídica e ao genoma viral, sendo portanto, fundamental para a construção de novas partículas virais (RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010). A proteína precursora da proteína M, a prM, funciona como chaperonina, impedindo que a proteína E sofra mudanças conformacionais drásticas durante a maturação viral (VÁZQUEZ *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2014).

Entre as proteínas não estruturais, a NS1 destaca-se estar envolvida na replicação viral, induzindo a liberação de anticorpos durante esse processo. Essa glicoproteína é encontrada tanto no interior das células infectadas pelo vírus como associada à membrana. Além disso, ela também é secretada em grandes

quantidades, sendo detectada no soro de pacientes na fase aguda da infecção (KASSIM *et al.*, 2011; YOUNG *et al.*, 2000). A proteína NS2A é outra proteína primordial para a replicação viral e para a montagem de novas partículas. Estudos abordam, inclusive, o seu papel em contribuir com a atuação da proteína NS1 (XIE *et al.*, 2013). Já a NS2B possui função indispensável na clivagem da poliproteína viral e atua como co-fator da protease viral, a NS3 (SHAFEE; ABUBAKAR, 2003).

A NS3 atua na replicação do vírus da dengue e no processamento da poliproteína precursora das proteínas virais através de atividades enzimáticas, como a de serino protease na porção N-terminal e as de helicase, Nucleosídeo 5' trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase 5' terminal (RTPase) na região C-terminal (SHAFEE; ABUBAKAR, 2003). As proteínas NS4A e NS4B auxiliam no processo de replicação por meio do reparo de membranas intracelulares e interação com o domínio helicase da proteína NS3, respectivamente (ZOU *et al.*, 2015). Por fim, a NS5, além de ser o maior componente proteico não estrutural do vírus, participa do capeamento e metilação da extremidade 5' do RNA, assim como da síntese de fitas molde negativas para a construção de fitas positivas de RNA, através da sua atividade RNA polimerase dependente de RNA (KROSCHEWSKI *et al.*, 2008).

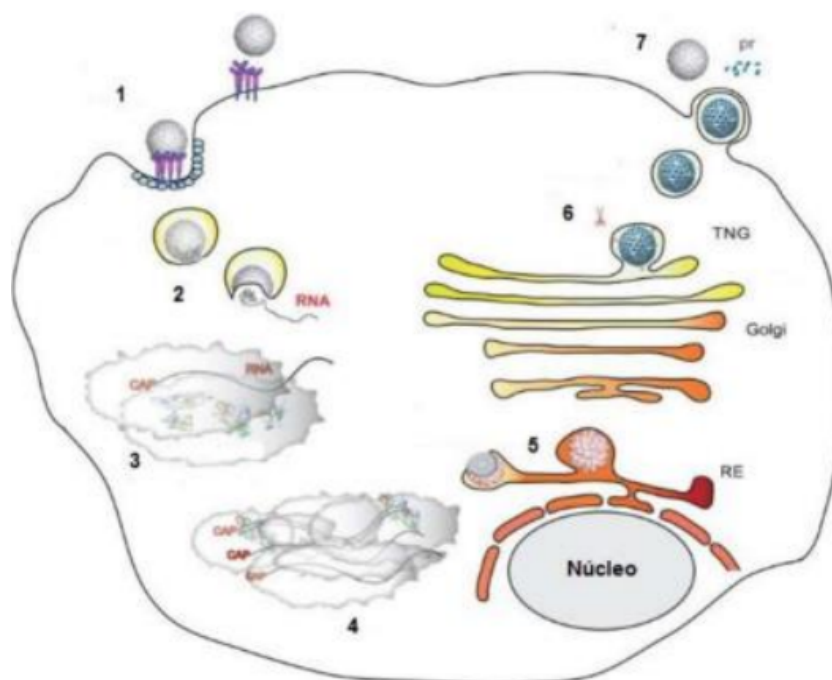
1.3.1 Ciclo replicativo

A transmissão do vírus se dá, inicialmente, pela picada do mosquito fêmea *Aedes aegypti* em um indivíduo infectado (MASSAD *et al.*, 2003; VASCONCELOS, 2003). No intestino do vetor, o vírus é replicado, culminando na disseminação do mesmo para diferentes tecidos, dentre eles as glândulas salivares, e com isso, os indivíduos tornam-se alvos da picada e consequente infecção (MORRISON *et al.*, 2008).

No indivíduo infectado, o ciclo de replicação tem início quando o vírus entra em contato com a superfície celular hospedeira através da interação da proteína E com receptores presentes na célula alvo, seguida pelo processo de endocitose (Figura 5) (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009). No endossoma, o meio ácido propicia uma mudança conformacional da proteína E, que leva à fusão do envelope

viral com a membrana do endossomo e, conseqüentemente, a liberação do RNA viral no citoplasma.

Figura 5 - Ciclo de replicação do DENV.



Legenda: 1- Ligação do vírus ao receptor celular e endocitose; 2 - Fusão à membrana endossomal e liberação do RNA no citoplasma; 3- Tradução do RNA viral na poliproteína; 4 - Replicação do RNA viral; 5- Montagem do vírion no retículo endoplasmático (RE); 6 - Maturação do virion no complexo de Golgi e clivagem da prM pela furina na rede trans-golgi (TNG); 7 - Fusão da vesícula à membrana plasmática e liberação de novas partículas por exocitose. Fonte: Adaptado de SAMPATH; PADMANABHAN, 2009.

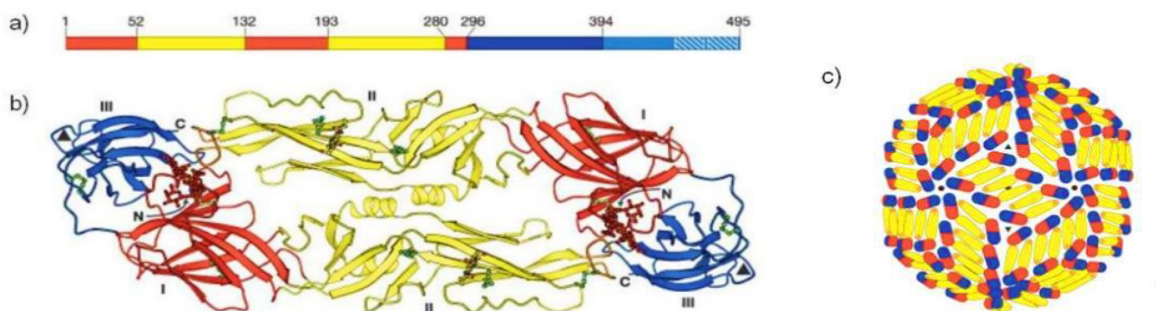
O genoma viral é traduzido em uma poliproteína que, posteriormente, é clivada por proteases celulares e viral, dando origem às proteínas do vírus. Ainda, há a transcrição da fita complementar de RNA de polaridade negativa, que atua como molde para a síntese de novas fitas positivas, dando continuidade à replicação do genoma viral (SMIT *et al.*, 2011). No retículo plasmático ocorre, então, a montagem da partícula viral, seguida da maturação no complexo de Golgi. Essa partícula é carregada para a superfície da célula por vesículas secretórias e é liberada por exocitose (BACK; LUNDKVIST, 2013; YACOUB *et al.*, 2016).

1.3.2 Proteína E

A proteína E, com peso molecular de, aproximadamente, 53 kDa, destaca-se por ser o maior componente glicoproteico presente na superfície do vírus (PICCINI *et al.*, 2015). Essa proteína está associada a alguns processos da infecção viral, atuando como proteína ligante ao receptor na membrana plasmática das células alvo da infecção com o vírus e mediando a endocitose do mesmo (CRILL; CHANG, 2004; DIAMOND, 2003).

Essa glicoproteína dispõe-se na partícula madura sob a forma de dímeros, onde cada monômero é composto por um domínio hidrofóbico transmembrana, que contém as regiões de haste e âncora, e um ectodomínio que compreende os domínios I, II e III (EDI, EDII e EDIII, respectivamente) e corresponde a 80% da proteína (Figura 6). O domínio III é responsável pela interação com os receptores das células alvo, enquanto o domínio II contém o peptídeo de fusão (LINDENBACH, 2007; MODIS *et al.*, 2003; ELONG NGONO; SHRESTA, 2018).

Figura 6 - Representação da proteína E e seus domínios.



Legenda: Os domínios I, II e III estão representados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. (a) Esquema dos aminoácidos que compõem o ectodomínio da proteína E. (b) Organização dos dímeros do ectodomínio da proteína E. (c) Conformação dimérica da proteína E presente na superfície das partículas virais. Fonte: MODIS *et al.*, 2003.

Além de possuir um papel importante na virulência, a proteína E é um dos principais alvos da resposta humoral contra o vírus da dengue, e contém os epítomos para os quais os anticorpos neutralizantes estão direcionados, e estes, por sua vez, impedem a entrada do vírus na célula hospedeira. Sendo assim, ela tem sido o

antígeno viral mais utilizado para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue (REY *et al.*, 2018; TOTTEY *et al.*, 2018).

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A infecção pelo vírus da dengue pode se manifestar na forma assintomática ou sintomática. A forma sintomática apresenta um amplo espectro de quadros clínicos, podendo exibir sinais e sintomas leves, como febre, podendo estar acompanhada por cefaléia, erupção cutânea, mialgia e artralgia (febre da dengue - FD), até manifestações clínicas graves que podem levar ao óbito, como a febre hemorrágica (FHD) e a síndrome do choque da dengue (DSS) (BARNIOL *et al.*, 2011; GARCÍA *et al.*, 2011; WHO, 2009).

Em 2014, a Organização Mundial da Saúde passou a classificar os casos de dengue em dengue com sinais de alerta, dengue sem sinais de alerta e dengue grave, para permitir o melhor controle dos casos graves da doença (CAVALCANTI *et al.*, 2015). Quanto aos sinais de alerta, é possível destacar dor abdominal, vômitos persistentes, altos níveis séricos de enzimas hepáticas, edema pulmonar, trombocitopenia e hepatomegalia. Já em relação à dengue grave, podem ser identificadas manifestações como febre hemorrágica, choque, hemorragias graves, extravasamento plasmático grave (resultante do aumento da permeabilidade vascular) e comprometimento de órgãos (KATZELNICK *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2016; WHO, 2014).

A evolução desta enfermidade pode variar de acordo com diversos fatores, como as características biológicas do vírus (cepa e sorotipo), do indivíduo infectado (idade, sexo, etnia, fatores genéticos, estado imune, comorbidade), assim como a infecção prévia por outro sorotipo do vírus da dengue, no caso de infecção secundária (ARIAS *et al.*, 2014; NEDJADI *et al.*, 2015; UNNIKRISSHANNAN *et al.*, 2015). Esse último fator se mostra muito importante, já que quadros classificados como graves são mais frequentes em pessoas que já tiveram dengue anteriormente por outro sorotipo (MALAVIGE *et al.*, 2004; WEAVER; VASILAKIS, 2009).

1.5 PATOGÊNESE

Na dengue, a infecção causada por um sorotipo induz imunidade duradoura ao sorotipo homólogo, no entanto, em caso de uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo, a proteção é limitante e temporária, além de aumentar as chances de desenvolvimento de formas mais graves da doença, como a dengue hemorrágica e a síndrome do choque (FRIED *et al.*, 2010; GUZMAN *et al.*, 2010; MALAVIGE *et al.*, 2004).

Uma explicação para esse agravamento da doença em uma infecção secundária é o mecanismo conhecido como ADE (do inglês *Antibody-dependent enhancement*), em que anticorpos heterólogos não neutralizantes ou em concentrações sub-neutralizantes, gerados em uma infecção primária com um sorotipo de DENV, podem se ligar a outros sorotipos de DENV durante uma infecção secundária e facilitar a entrada desse DENV nas células alvos via receptores Fcγ (FcγR), presentes em células, como macrófagos e células dendríticas. (HALSTEAD, 2003; KUCZERA, *et al.*, 2018). A entrada do vírus na célula resulta em aumento de partículas virais livres e secreção de citocinas pró-inflamatórias (SHUKLA *et al.*, 2020). A excessiva liberação de citocinas no plasma do indivíduo decorrente da ativação do sistema imune é conhecida como tempestade de citocinas (BUTTHEP, *et al.*, 2012), e pode levar ao aumento da permeabilidade vascular (FERREIRA *et al.*, 2015; KUCZERA, *et al.*, 2018; SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2017).

Além do determinante humoral, outra teoria para a manifestação de dengue grave em indivíduos em uma infecção secundária heteróloga é o pecado antigênico original, que se baseia na resposta imune celular. Neste caso, linfócitos T de memória gerados em uma infecção primária por um sorotipo do DENV podem ser ativados em uma infecção secundária por outro sorotipo. No entanto, acredita-se que essas células não sejam capazes de eliminar o vírus secundário por possuírem pouca afinidade aos epítomos, mas poderiam levar ao aumento exagerado de citocinas pró-inflamatórias (MATHEW; ROITMAN, 2008; MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003).

1.6 VACINAS CONTRA A DENGUE

A construção de uma vacina tetravalente contra a dengue, que seja segura e eficaz, é considerada uma das principais estratégias para a prevenção da doença. Atualmente, a única vacina disponível e licenciada para uso humano, a Dengvaxia, não é eficiente no quesito de proteção balanceada contra os quatro sorotipos virais (GUBLER; HALSTEAD, 2019).

A Dengvaxia (CYD-TDV), licenciada em diversos países da América Latina e Ásia, incluindo o Brasil, foi desenvolvida pelo laboratório Sanofi Pasteur (WHO, 2016). Trata-se de uma vacina tetravalente de vírus quiméricos vivos atenuados que utiliza como estrutura básica o esqueleto do vírus da febre amarela vacinal YFV-17D, outro flavivírus com genoma semelhante ao vírus da dengue, onde há a substituição dos genes que codificam as proteínas prM e E pelos mesmos genes dos quatro sorotipos do vírus da dengue (SABCHAREON *et al.*, 2012; THOMAS, YOON, 2019).

Como os estudos de acompanhamento de longo prazo dos indivíduos imunizados com esta vacina associaram o seu uso com um risco maior de manifestação das formas mais graves da doença em soronegativos infectados após a imunização, essa vacina passou a ser recomendada apenas para o uso em indivíduos soropositivos (SCHWARTZ *et al.*, 2015; MARTINEZ-VEGA *et al.*, 2017). Ainda assim, o imunizante superou grandes obstáculos devido à complexidade da dengue e, em vista disso, representa um grande avanço no curso de combate à doença (HADINEGORO *et al.*, 2015; HALSTEAD, 2017; LIU *et al.*, 2016).

Como visto, atualmente, ainda não há uma estratégia vacinal de prevenção universal contra a dengue, o que impulsiona a busca por vacinas mais efetivas. Com isso, diversas outras vacinas tetravalentes candidatas vêm sendo estudadas por meio de ensaios clínicos em estágios cada vez mais avançados (Quadro 1), tais como as baseadas em vírus vivo atenuado, vírus inativado purificado, baseadas em vetores virais, recombinantes de subunidade proteica, partículas semelhantes a vírus (VLPs) e vacina de DNA e de RNA (PANG; LOH, 2017; PEREIRA *et al.*, 2015; TORRESI *et al.*, 2017).

Quadro 1 - Vacinas tetravalentes candidatas contra a dengue.

Vacina	Estratégia	Laboratório	Fase clínica
Vírus vivo atenuado (quiméricos)			
Dengvaxia (CYD-TDV)	Esqueleto vírus da Febre Amarela vacinal YFV-17D contendo os genes prM e E de DENV1, 2, 3 ou 4	Sanofi Pasteur	Licenciada
TAK-003	DENV2 atenuado + DENV2/1, DENV2/3 e DENV2/4, em que os genes prM e E de DENV2 atenuado foram substituídos pelos mesmos dos outros sorotipos	Takeda	Fase III
TV003	Atenuação por remoção de nucleotídeos na porção 3'UTR (DENV1, DENV3 e DENV4) + DENV2/4, formado por genes prM e E de DENV2 no esqueleto de DENV4 atenuado	<i>National Institute of Health (NIH)</i>	Fase III
Vírus inativado purificado			
DPIV	DENV1-4 inativado + adjuvante	<i>Glaxo Smith Kline (GSK) e o Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)</i>	Fase I
Subunidade recombinante			
DEN-80E	Proteína E (80% da porção N-terminal) expressa em células de <i>Drosophila</i>	Merck	Fase I

Fonte: ALVES *et al.*, 2021.

As vacinas compostas por vírus vivos atenuados são estratégias que buscam gerar uma ativação da resposta imune do indivíduo vacinado com a inoculação do vírus enfraquecido, mimetizando uma infecção natural (STAPLES *et al.*, 2015). Uma vacina de vírus vivo atenuado em progresso é a TAK-003, produzida pelo laboratório Takeda. Essa vacina é baseada no DENV2 atenuado por passagens em células de mamífero, e por vírus quiméricos, onde os genes prM e E de DENV 1, 3 e 4 foram inseridos por substituição desses genes no esqueleto do DENV 2 atenuado (BISWAL *et al.*, 2020; SWAMINATHAN; KHANNA, 2019).

Estudos de fase 3 para avaliação desse imunizante em diferentes países da Ásia e na América Latina demonstraram uma eficácia de 76% em pessoas

previamente soropositivas para DENV e 66% em pessoas soronegativas. As respostas foram mais eficientes para DENV 1 e 2 em relação a DENV 3 e DENV 4, sugerindo eficácia variada de acordo com cada sorotipo. Os efeitos dessa vacina apontaram uma redução no número de internações em casos graves da doença, em que se observou 94% de proteção para hospitalização e 86% para FHD (BISWAL *et al.*, 2020).

Outra vacina de vírus vivo atenuado em fase avançada de desenvolvimento é a TV003, desenvolvida pelo *National Institute of Health* (NIH) e produzida pelo Instituto Butantan, onde sorotipos como DENV 1, 3 e 4 foram atenuados por deleção de 30 nucleotídeos na região 3' não traduzida (3' UTR). No caso do DENV2, foi feita uma quimera de DENV4/2 em que os genes prM e E de DENV2 foram trocados pelos mesmos genes do DENV4 atenuado (DURBIN, WHITEHEAD, 2011; WHITEHEAD, 2016). Os testes clínicos de fase 2 exibiram resultados de indução de anticorpos, com 76% a 92% de soroconversão, dependendo do sorotipo, além da indução da resposta de células T para as proteínas não estruturais de DENV tanto em indivíduos soronegativos e como aqueles expostos ao vírus (KALLAS *et al.*, 2020).

Uma outra abordagem trata das vacinas de vírus inativado purificado, em que o vírus é alterado por agentes químicos ou físicos, de forma que se torna incapaz de causar infecção (SCHMIDT *et al.*, 2017). Quando comparadas com as atenuadas, são consideradas mais seguras, pois os seus componentes vacinais não estão vivos e, com isso, são mais acessíveis, por exemplo, para pessoas com imunodeficiências (SUN *et al.*, 2003).

Como exemplo de vacina tetravalente contra a dengue baseada em vírus inativado em desenvolvimento, destaca-se a DVIP, que vem sendo avaliada, em testes clínicos de fase 1, conjuntamente pela *Glaxo Smith Kline* (GSK) e o *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) (DIAZ *et al.*, 2018; WATANAVEERADEJ, *et al.*, 2011). Todavia, o aperfeiçoamento dessa estratégia vacinal sofre impasses já que, apesar dos indivíduos vacinados terem desenvolvido uma resposta de anticorpos tetravalente 1 mês após a segunda dose, somente em 29% dos vacinados foram detectados anticorpos após 1 ano da vacina (IDRIS *et al.*, 2021).

Já as vacinas baseadas em subunidade recombinante são construídas a partir de antígenos de proteínas definidos que podem ser produzidos em sistemas de

expressão, tais como bactérias (*E. coli*, por exemplo), leveduras, células de insetos, linhagens de células de mamíferos ou plantas (YAP; SMITH, 2010). Dentre tais estratégias, em estágios clínicos mais avançados destaca-se a DEN-80E, uma vacina de subunidade recombinante contra a dengue com base em 80% da proteína do envelope, produzida em células de *Drosophila*, desenvolvida pela Merck (CASSETTI; HALSTEAD, 2014; COLLER, *et al.*, 2011). Ensaios clínicos de fase 1 demonstraram a indução da resposta de anticorpos neutralizantes e produção de IFN- γ nas combinações com dois adjuvantes diferentes. Entretanto, a maior imunogenicidade esteve aliada a reações adversas (MANOFF *et al.*, 2019).

As vacinas baseadas em ácido nucleico, vacinas de DNA e vacinas de RNA, por sua vez, são estratégias inovadoras que vêm sendo cada vez mais exploradas. Essas vacinas se baseiam na inoculação do gene de interesse, através de um plasmídeo de expressão ou de uma molécula de RNA, na célula do indivíduo. A partir dessa informação, a célula produz a proteína codificada que pode, então, induzir uma resposta imune (REINHARDT *et al.*, 2017).

Diversos grupos vêm avaliando vacinas de DNA contra a dengue, baseadas em diferentes antígenos virais. O Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais (LABIFIV) tem trabalhado na elaboração de vacinas de DNA contra o vírus da dengue. Dentre essas, destaca-se a vacina pE1D2 que possui a sequência que codifica o ectodomínio (DI, II e III) da proteína E de DENV2, cepa Nova Guiné. Esta vacina de DNA já foi testada anteriormente e mostrou-se capaz de gerar altos níveis de proteção contra o desafio com DENV2 em camundongos BALB/c. Além disso, o plasmídeo pE1D2 foi capaz de induzir nestes camundongos tanto uma resposta imune humoral, com produção de anticorpos neutralizantes, quanto a ativação de células T específicas (AZEVEDO *et al.*, 2011).

Considerando que as vacinas gênicas contra a dengue são o foco deste trabalho, mais detalhes serão abordados no item 2.2.1.

É consenso que um dos principais pilares para o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue é a necessidade de indução de resposta imune equilibrada e protetora contra os quatro sorotipos virais (DENV 1-4). Entretanto, ainda não há uma vacina que alcance esse objetivo plenamente. A proteína do envelope viral vem sendo vista como um antígeno promissor na construção de uma vacina eficaz contra a

dengue, já que é responsável por mediar a ligação e fusão do vírus à membrana celular do hospedeiro e, conseqüentemente, é alvo de anticorpos neutralizantes. Dessa forma, essa proteína vem sendo empregada em diferentes estratégias de imunização (MODIS *et al.*, 2003).

Com isso, o estudo das estratégias em desenvolvimento para a construção de uma vacina contra a dengue baseado, principalmente, na proteína E, e a avaliação da eficácia dessas vacinas em gerar uma resposta imune protetora robusta contra os 4 sorotipos virais é de suma importância. Entre essas estratégias, se destacam as vacinas gênicas, que se mostram uma boa alternativa para a indução de uma resposta imune humoral e celular equilibrada contra os 4 sorotipos virais (MOTA *et al.*, 2005).

Em busca de avaliar estratégias vacinais eficazes e protetoras contra os quatro sorotipos virais, neste trabalho, foi realizada uma revisão das vacinas gênicas, baseadas na proteína do envelope, que estão em desenvolvimento. Além disso, também serão apresentadas as avaliações preliminares de uma vacina de DNA tetravalente contra a dengue baseada na proteína E.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura científica acerca de vacinas gênicas contra a dengue baseadas na proteína do envelope viral e avaliar a construção de uma vacina de DNA tetravalente contra a dengue baseada na proteína do envelope.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Realizar levantamento bibliográfico em publicações científicas na base de dados *Pubmed* sobre vacinas de DNA e RNA contra a dengue baseadas na proteína do envelope;
- Produzir e purificar os plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4 em grande escala;
- Avaliar a expressão *in vitro* das proteínas recombinantes codificadas pelos plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4;
- Inocular camundongos BALB/c com as vacinas de DNA para as futuras avaliações da resposta imune humoral;

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Revisão Bibliográfica

Foi realizado um levantamento bibliográfico na base de dados *Pubmed* para a pesquisa de artigos científicos, informações e documentações indiretas da literatura científica, no período de 2000 a 2022, utilizando palavras-chave, combinadas entre si ou não, como: *dengue, vaccine, DNA vaccine, RNA vaccine, gene vaccine, envelope, E protein*.

Além dos estudos encontrados na base de dados, também foram consultadas outras bibliografias que se demonstraram importantes para a elaboração deste trabalho, como livros, dissertações e revisões. Após breve leitura, foram desconsiderados artigos que não se aplicavam à temática proposta, como critério de exclusão.

2.1.2 Avaliação das vacinas de DNA baseadas na proteína E

2.1.2.1 Plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3, pE1D4 e pcTPA

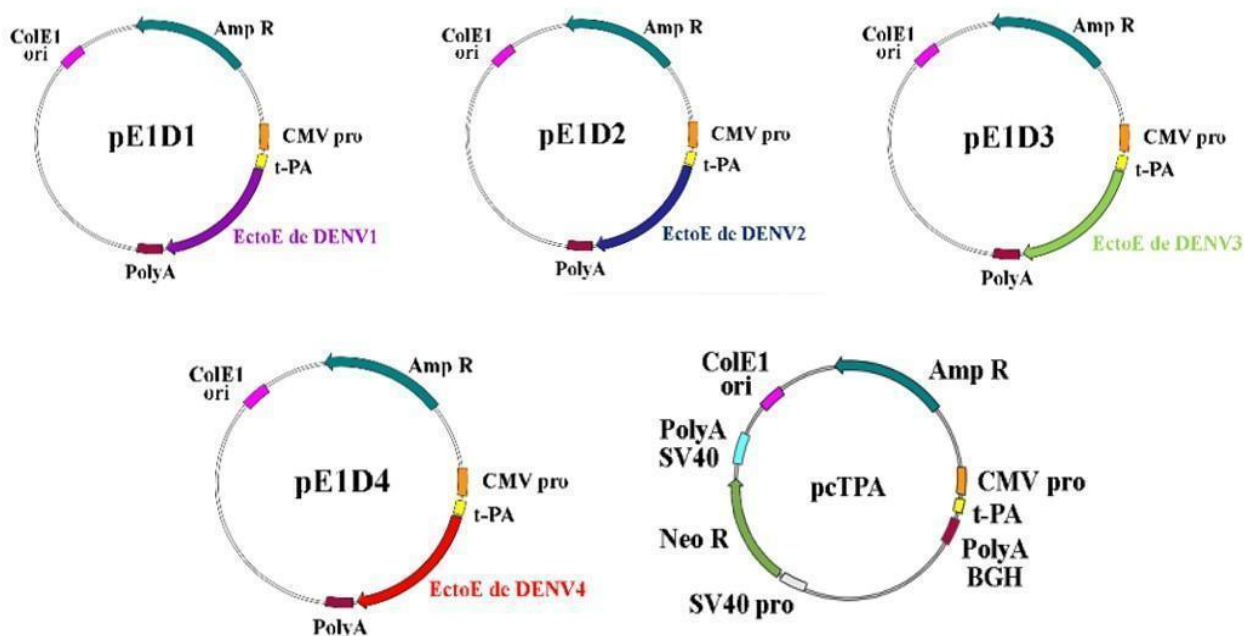
Os plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4 contêm as sequências que codificam os ectodomínios (domínios I, II e III) das proteínas do envelope de DENV 1, 2, 3 e 4, respectivamente, fusionadas ao peptídeo sinal t-PA (ativador de plasminogênio de tecido humano) e sob controle da região promotora do citomegalovírus humano (CMV).

Os plasmídeos pE1D2 e pcTPA já foram utilizados em trabalhos anteriores do grupo (AZEVEDO *et al.*, 2011; 2013). O plasmídeo pE1D2, especificamente, foi construído pelo grupo do laboratório a partir da clonagem do gene que codifica a proteína E do vírus da dengue sorotipo 2, cepa Nova Guiné, utilizando o vetor de expressão em células eucarióticas pcDNA3 (Invitrogen). O gene E foi fusionado à sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA, que direciona a proteína para a via de

secreção celular. O plasmídeo pcTPA (controle negativo) possui apenas a sequência que codifica o t-PA.

Já para a construção dos plasmídeos pE1D1, pE1D3 e pE1D4, as sequências que codificam os ectodomínios das proteínas E dos respectivos sorotipos 1, 3 e 4 do vírus da dengue foram selecionados por meio de uma análise bioinformática no banco de dados *GenBank*. A empresa GenScript foi responsável pela síntese de genes sintéticos, os quais foram otimizados para expressão tanto em células de camundongos quanto de humanos e pela clonagem no plasmídeo pcTPA e a sequência TPA também foi otimizada para a expressão em células humanas e murinas. A sequência do pE1D1 foi sintetizada a partir da cepa brasileira BR42735-ZC. A do pE1D3 trata-se de uma sequência consenso das cepas brasileiras FJ850092 e EF629368, enquanto que a sequência do pE1D4 foi sintetizada a partir da cepa venezuelana FJ182016. Os plasmídeos estão representados na figura 7.

Figura 7 - Representação esquemática dos plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3, pE1D4 e pcTPA.



Legenda: Amp R - gene que confere resistência à ampicilina; CMV pro - promotor derivado do citomegalovírus; SV40 pro - promotor derivado do vírus símio 40; Neo R - gene que confere resistência à neomicina; Poly A SV40 - região de poliadenilação derivada do vírus símio 40; EctoE - sequência que codifica o ectodomínio (domínios I,II e III) da proteína E; Poly A BGH - região de poliadenilação derivada do citomegalovírus humano; ColE1 ori - origem de replicação bacteriana.

2.1.2.2 Purificação dos plasmídeos recombinantes

Para a produção de grande quantidade de DNA plasmidial, bactérias *Escherichia coli*, cepa DH5- α , que foram previamente transformadas com os plasmídeos recombinantes pE1D1, pE1D2, pE1D3, pE1D4 ou pcTPA, foram crescidas em meio LB (*Luria Bertani* - 10 g de Luria-Bertani: triptona, 5 g de extrato de levedura, 10g de NaCl, água deionizada para completar 1 L) contendo 100 μ g/mL de ampicilina, a partir dos estoques congelados. As culturas foram incubadas a 37°C, sob agitação, durante a noite. No dia seguinte, foi realizado um inóculo dessas culturas em meio TB (*Terrific Broth* - 12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 4 mL de glicerol e 100 mL de solução 0,17 M de KH_2PO_4 e 0,72 M de K_2HPO_4 /L, água deionizada para completar 1L) contendo 100 μ g/mL de ampicilina e estas foram mantidas novamente à 37°C, sob agitação, durante a noite.

Após este período, os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e purificados através de colunas de troca iônica, utilizando *Qiagen Endofree Plasmid Giga Kit* (Qiagen) tip 10.000, segundo as instruções do fabricante. Foram utilizados 3L de cultura bacteriana para cada coluna Giga. Os plasmídeos foram eluídos em água deionizada e suas concentrações foram quantificadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm. O DNA foi armazenado a 20°C até o devido uso.

A integridade e a pureza dos DNAs plasmidiais foram confirmadas por digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante, por 1 h a 37°C. Posteriormente, foi adicionado tampão de amostra 6X (*Blue/Orange loading Dye*, Promega) às amostras, e estas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (4,84g de Tris, 1,142mL de ácido acético, 2mL de EDTA 0,5M, água deionizada para completar 1 L, pH 8,0), corados com Nancy-520 (Sigma-Aldrich), o qual foi visualizado e fotografado em um transiluminador de luz ultravioleta (UV). As concentrações dos plasmídeos também foram confirmadas em gel de agarose. Além disso, foi realizado o sequenciamento dos genes na plataforma de sequenciamento da Rede de Plataformas Fiocruz. O material foi armazenado a -20°C para futuras imunizações de camundongos e avaliações das respostas imunes geradas.

Cabe salientar que a manipulação das bactérias DH5 α e a purificação dos plasmídeos recombinantes foi realizada de acordo com as normas de Biossegurança (CQB nº 105/99) para atividade de pesquisa com organismos geneticamente modificados.

2.1.2.3 Expressão *in vitro* das proteínas recombinantes

Para avaliar a produção das proteínas recombinantes, células da linhagem BHK-21 (fibroblastos renais de Hamster neonato) foram transfectadas com os plasmídeos contendo os genes dos diferentes sorotipos de DENV. As células foram mantidas em meio DMEM (Sigma) (10g de meio DMEM, 2,2g de Ca(HCO₂)₂, 2g de HEPES/L, pH 7,4) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), a 37°C, sob atmosfera úmida e 5% de CO₂. Para a propagação da cultura, a monocamada celular foi lavada a cada dois dias com solução salina tamponada BSS (8g de NaCl, 0,4g de KCl, 0,012g de CaCl₂, 0,154g de MgSO₄.7H₂O, 0,39g de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,15g de KH₂PO₄, 1,1g de glicose, 0,0025g de vermelho de fenol, água deionizada para completar 1L, pH 7,4). Já para a obtenção de suspensão celular, a monocamada foi lavada com solução salina tamponada CMF (8g de NaCl, 0,4g de KCl, 0,1g de Na₂SO₄, 0,39g de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,15g de KH₂PO₄, 1,1g de glicose, 0,0025g de vermelho de fenol e água deionizada para completar 1 L, pH 7,4) e posteriormente dissociada com tripsina (Invitrogen).

Para a transfecção, 2,5 x 10⁴ células por poço foram plaqueadas em lâminas contendo 8 câmaras (Lab-Tek, NUNC) e incubadas durante a noite sob as mesmas condições de manutenção do cultivo. No dia seguinte, as células BHK-21 foram transfectadas com 0,8 µg/poço dos diferentes plasmídeos, combinados a 2 µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen), em 400 µL de meio OPTIMEM (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após 4h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, o meio foi trocado por DMEM com 5% de SFB e as células foram incubadas novamente sob as mesmas condições.

No dia seguinte, a expressão da proteína E foi analisada por imunofluorescência indireta. As células foram fixadas com paraformaldeído 4,0% v/v

em tampão fosfato de sódio 1M (77,4mL de Na_2HPO_4 1M, 22,6mL de NaH_2PO_4 1M e água deionizada para completar 1L, pH 7.4), permeabilizadas com saponina 0,6% v/v também em tampão fosfato de sódio, adicionado de albumina bovina (BSA, Sigma) a 1% p/v por 15 min, a temperatura ambiente. Para a detecção da expressão das proteínas recombinantes, as células foram incubadas em tampão fosfato com anticorpos policlonais de macaco (anticorpo primário) específicos contra a proteína E dos diferentes sorotipos de dengue por 1h, a 37°C, Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo anti-IgG humano conjugado a FITC (Sigma) (anticorpo secundário). Por fim, as células foram visualizadas com o auxílio do microscópio de fluorescência modelo Nikon Eclipse 50i.

2.1.2.4 Imunização de camundongos

Camundongos BALB/c machos (n=5), com cerca de 4 semanas de idade foram imunizados com duas doses das vacinas de DNA, que correspondem a 100 µg de DNA /100 µl de PBS (tampão fosfato-salino – 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na_2HPO_4 , 0,24g de KH_2PO_4 , pH 7.3, água deionizada para completar 1L) dos diferentes plasmídeos (pE1D1, 2, 3 e 4) ou com o plasmídeo controle (pcTPA). Os animais foram inoculados em intervalos de duas semanas, por via intramuscular (IM), nos quadríceps posteriores (100 µg de DNA/dose, sendo 50 µg/pata) com o auxílio de uma seringa de insulina com agulha 30 G (Becton Dickinson).

Duas semanas após a segunda imunização com as vacinas de DNA, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina em 100 µL de PBS e sangrados por punção cardíaca para obtenção do sangue total. O sangue foi centrifugado duas vezes a 6.000 rpm por 10 minutos, em microcentrífuga, para obtenção do soro imune e estes foram armazenados a -70°C até o seu devido uso. Vale ressaltar que antes da imunização os animais foram sangrados por via retro orbital para obtenção do soro pré-imune para ser utilizado como controle em outros experimentos, como os ensaios de soroneutralização viral e ELISA. Os experimentos com os camundongos foram realizados de acordo com os princípios éticos aprovados

pelo Comitê de Ética do Uso de Animal do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC), licenças L039/2015 e L022/2019.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Revisão bibliográfica: Vacinas gênicas contra a dengue baseadas na proteína do envelope viral

As vacinas gênicas são vacinas que se baseiam na inoculação do gene que codifica a proteína de interesse no organismo hospedeiro, diferindo assim, das tecnologias clássicas de inocular organismos vivos ou inativados, ou subunidades desses microrganismos. Nessa abordagem, que compreende as vacinas de DNA e RNA, um ou mais genes que codificam a(s) proteína(s) de interesse são entregues à célula, que produz o antígeno codificado nessa informação. Tanto a vacina de DNA quanto a de RNA são capazes de induzir uma resposta imune ampla, com ativação da resposta imune humoral e celular (REINHARDT *et al.*, 2017).

Avanços recentes na tecnologia das vacinas de DNA e RNA têm estimulado o desenvolvimento de vacinas gênicas direcionadas aos flavivírus, incluindo o vírus da dengue (ALVES *et al.*, 2020; WOLLNER; RICHNER, 2021). A maioria dos estudos que avaliam vacinas gênicas direcionadas para o DENV, utilizam a estratégia de vacinas de DNA, contudo, recentemente, alguns grupos vêm analisando vacinas de RNA baseadas tanto na proteína E, quanto em proteínas virais não estruturais.

2.2.1.1 Vacinas de RNA

As vacinas baseadas em ácido ribonucleico, vacinas de RNA, são constituídas de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) produzidas *in vitro*, e inoculadas, geralmente, em nanopartículas lipídicas (LNP). A formulação em nanopartícula lipídica proporciona maior estabilidade ao mRNA, protegendo-o de RNases, assim como, favorecendo a interação desta formulação com a célula do indivíduo vacinado, facilitando a entrada do mRNA na célula (DEFRANCESCO, 2017; HINZ *et al.*, 2017; RAUCH *et al.*, 2017).

O princípio dessa abordagem se dá pela utilização da maquinaria da célula do hospedeiro para a produção do antígeno codificado pelo mRNA sintético. Ou seja, o mRNA codifica um antígeno de interesse, que é traduzido pela célula. Essa proteína, quando reconhecida pelo sistema imune induz uma resposta imune humoral e celular específica (CHAHAL *et al.*, 2016). O mRNA sintético é geralmente projetado seguindo o esquema do mRNA eucariótico, e contém um quadro de leitura aberto que codifica o antígeno de interesse, as regiões não traduzidas (UTRs) 5' e 3', flanqueando o quadro de leitura aberto, além do Cap 5', e da cauda poli(A), na região 3', que são necessários para estabilizar o mRNA no citosol e para uma tradução eficiente (HOLTKAMP *et al.*, 2006; WOLLNER; RICHNER, 2021).

O pioneirismo dos estudos com vacinas de RNA, assim como as de DNA, envolvendo modelos animais se deu na década de 1990. Por meio dessa tecnologia, pesquisadores puderam observar a indução de respostas imunes mediadas pela expressão de proteínas quando moléculas de mRNA eram inoculadas, pela via intramuscular em camundongos (KALLEN; THEB, 2014; PASCOLO, 2006).

Este modelo de imunizante possui vantagens em relação a outras tecnologias vacinais, como fácil e rápida produção em larga escala; a facilidade de alterar a molécula de mRNA, deixando suas características físico-químicas praticamente inalteradas, sem que precise mudar o processo de produção estabelecido. Além disso, essas vacinas têm a capacidade de indução de respostas celulares e humorais, sem os riscos de uma vacina viva atenuada (GEALL *et al.*, 2013; SCHLAKE *et al.*, 2012). Como desvantagem, essas vacinas geralmente necessitam de acondicionamento específico de baixa temperatura, o que o torna mais custoso e menos acessível se comparado a outras tecnologias (LIMA *et al.*, 2021). Até o surgimento da pandemia da COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2 (Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave), ainda não existiam vacinas de RNA aprovadas para uso humano. No entanto, tal calamidade gerou grandes impactos sobre a comunidade científica e acelerou o processo de pesquisa de medicamentos e vacinas (CAMPOS *et al.*, 2020). Para tanto, foram aprovadas e seguem em uso as vacinas de RNA da Pfizer-BioNTech, aprovada pela primeira vez no Reino Unido, e da Moderna/NIH, aprovada pela primeira vez nos Estados Unidos (LEDFOURD, 2020; PACHECO *et al.*, 2020; MAHASE, 2020).

2.2.1.1.1 Vacinas de RNA contra o vírus da dengue baseadas na proteína E

Recentemente, três grupos vêm avaliando vacinas de RNA contra a dengue (WOLLNER; RICHNER, 2021). Um desses estudos, não utilizou a proteína E como antígeno. Roth e colaboradores (2019) avaliaram uma vacina de mRNA-LNP contendo epítomos de células T das proteínas não estruturais NS3, NS4B e NS5 de DENV1. Essa vacina induziu respostas celulares em camundongos imunizados e levou à redução da carga viral nos animais desafiados com DENV1 (ROTH *et al.*, 2019).

Zhang e colaboradores (2020) desenharam e caracterizaram três vacinas de mRNA para DENV2 baseadas não somente na proteína E, mas também na proteína NS1: prME-mRNA, E80-mRNA e NS1-mRNA. A análise dessas vacinas em camundongos imunocompetentes evidenciou que a imunização com a vacina baseada no ectodomínio da proteína E sozinho, E80-mRNA, induziu altos níveis de anticorpos neutralizantes e respostas de células T antígeno-específicas.

Quadro 2 - Vacinas de RNA candidatas contra a dengue com base na proteína E e outros antígenos.

Vacina	Antígeno	Resposta Imune	Proteção	Referência
DENV2				
prME-mRNA, E80-mRNA e NS1-mRNA	prM, E e NS1	E80-mRNA induziu altos níveis de anticorpos neutralizantes e respostas de células T antígeno-específicas. E80-mRNA + NS1-mRNA gerou um aumento nos níveis da resposta de células T. prME-mRNA foi pouco imunogênica	Proteção contra desafio com DENV2	Zhang <i>et al.</i> (2020)
DENV1				
prM/E mRNA-LNP	prM-E	Induziu altos níveis de títulos de anticorpos neutralizantes e células T CD4+ e T CD8+ específicas para DENV1	Camundongos AG129 imunocomprometidos foram protegidos de um desafio letal de DENV	Wollner <i>et al.</i> (2021)

A combinação de E80-mRNA e NS1-mRNA gerou um aumento nos níveis da resposta de células T. Além disso, essas vacinas conferiram proteção contra o desafio

com DENV2. Por outro lado, a vacina prME-mRNA foi pouco imunogênica. Já em um outro estudo de uma vacina de mRNA que codifica as proteínas prM/E de DENV1 foi observada a produção de anticorpos neutralizantes em camundongos imunocompetentes. Essa vacina também foi capaz de induzir células T CD4+ e T CD8+ específicas para DENV1 (WOLLNER; RICHNER, 2021).

Além do vírus da dengue, outro flavivírus que tem sido alvo do desenvolvimento de vacinas de mRNA é o Vírus Zika. Entre essas análises de vacinas baseadas na proteína E, é possível destacar o estudo de Richner e colaboradores (2017), os quais construíram uma vacina de mRNA contra a ZIKV, que codifica os genes estruturais prM-E desse vírus, encapsulado em nanopartículas lipídicas. Essa vacina foi capaz de induzir anticorpos de reação cruzada contra o vírus da Dengue (RICHNER *et al.*, 2017).

Devido à similaridade dos aminoácidos que compõem a proteína E de ZIKV e dos quatro sorotipos do DENV, um epítipo de reação cruzada imunodominante presente no domínio II da proteína do envelope (E-DII-FL) foi deletado desse mRNA. Isso porque anticorpos de reação cruzada, derivados da infecção natural por Zika, dirigidos ao DII da proteína do envelope aumentaram a infecção do DENV em culturas de células e em modelos murinos, como relatado por Dejnirattisai e colaboradores (2016) e Stettler e colaboradores (2016). Esses mRNAs induziram respostas protetoras de anticorpos contra o vírus da Zika em camundongos e minimizaram a geração de anticorpos de reação cruzada. Contudo, estudos epidemiológicos são necessários para desvendar o efeito da imunidade humoral do ZIKV na patogenia do DENV e a necessidade de abordagens vacinais que reduzam o risco de indução de resposta cruzada e do surgimento de quadros mais graves de dengue (RICHNER *et al.*, 2017).

2.2.1.2 Vacinas de DNA

Dentre os diferentes métodos vacinais em estudo, uma outra abordagem promissora é a utilização de vacinas de DNA, que consistem em um plasmídeo de expressão contendo genes que codificam antígenos de interesse. A inoculação desse vetor nas células eucarióticas leva à tradução da proteína e à indução de uma

resposta imune específica contra essa proteína nos indivíduos vacinados (ALVES *et al.*, 2021; KHAN, 2013; LIU, 2011; SAADE; PETROVSKY, 2012).

Assim como as vacinas de RNA, a tecnologia vacinal baseada em DNA teve início nos anos de 1990, ambas descritas como capazes de induzir respostas imunes celulares e humorais (LIU, 2011). No entanto, inicialmente as vacinas de DNA plasmidial ganharam maior destaque no cenário científico devido aos problemas de instabilidade das moléculas de mRNA e ao seu custo mais alto de produção. Posteriormente, novos estudos proporcionaram a resolução desses problemas relacionados ao mRNA (KALLEN; THEB, 2014).

Além da vantagem de simular uma infecção viral natural e induzir tanto a resposta imune humoral quanto celular, as vacinas de DNA são mais seguras que as vacinas vivas por não haver a inoculação direta do agente infeccioso, como um vírus atenuado, por exemplo, possibilitando que indivíduos imunocomprometidos sejam vacinados (LIU, 2011; MEUNIER, *et al.*, 2016). Outro benefício desta estratégia diz respeito ao seu desenvolvimento. Essas vacinas são de fácil manipulação, comparada a outros tipos de vacinas, podendo ser alterado o gene alvo com certa facilidade, sem alterar a sua forma de produção. Além disso, são vacinas estáveis em temperatura ambiente e têm baixo custo de produção, sendo essas características cruciais em tempos de epidemias (WILLIAMS, 2014).

Esforços têm sido feitos por parte da comunidade científica para que vacinas de DNA contra a dengue baseadas tanto em antígenos estruturais quanto não estruturais sejam cada vez mais aprimoradas. Algumas abordagens apostaram em proteínas, como NS1, visando a indução de respostas celulares, como de células TCD4+, assim como em proteínas NS3, NS4B e NS5, direcionadas às respostas de células TCD8+, devido à participação da proteína E no ADE (RIVINO *et al.*, 2013). Entretanto, a proteína E e o seu domínio III são objeto da maior parte dos trabalhos acerca do tema, devido à interação dessa proteína e desse domínio com receptores na superfície da célula hospedeira e a indução de anticorpos neutralizantes (TOTTEY *et al.*, 2018; ALVES *et al.*, 2021).

2.2.1.2.1 Vacinas de DNA contra a dengue baseadas apenas na proteína E

Mota e colaboradores (2005) desenvolveram uma formulação tetravalente baseada no domínio III da proteína do envelope, composta pelas vacinas pDIII-D1, pDIII-D2, pDIII-D3 e pDIII-D4. A formulação tetravalente foi inoculada pela via intramuscular (IM) em camundongos BALB/c, os quais produziram níveis significativos de anticorpos IgGs contra DENV 1-4, entretanto com restrita capacidade neutralizante (MOTA *et al.*, 2005). Para análise da proteção, camundongos recém-nascidos foram inoculados com soro de camundongos adultos vacinados com a vacina de DNA e depois desafiados com DENV2. Foi observado que 87% desses animais neonatos sobreviveram. Entretanto, é necessário realizar mais experimentos em que se possa avaliar a proteção aos outros sorotipos virais (Quadro 2) (MOTA *et al.*, 2005).

Quadro 3 - Vacinas de DNA candidatas contra a dengue com base apenas na proteína do envelope viral.

Vacina	Plasmídeo (Via de inoculação)	Estratégia	Resposta imune	Proteção	Referência
EDIII/ DENV1-4					
pDIII-D1, pDIII-D2, pDIII-D3 e pDIII-D4	pcDNA3 (IM)	Plasmídeos que codificam EDIII de DENV1-4	Produção de IgGs NAb anti-DENV1-4 em um ensaio de CPE de células BHK-21 a 50%: formulação tetravalente apenas contra DENV2	87% de proteção em camundongos BALB/c recém-nascidos inoculados i.c com soros de camundongos imunizados e desafiados com DENV2 NGC	Mota <i>et al.</i> (2005)
pDV-U-DIII	pVAX1 (IM + EP)	Plasmídeo codifica EDIII de DENV1-4 como um único quadro de leitura aberto	Produção de IgGs anti EDIII DENV1-4 NAb contra DENV1-4 no ensaio de inibição de TCID50-CPE Células B produtoras de anticorpos específicos após incubação com proteínas EDIII de DENV1-4	Não realizado	Ramanathan <i>et al.</i> (2009)

DIII-CH3 monovalente e tetravalente	pVAX (ID)	Plasmídeo codifica EDII de DENV1-4 (sequências otimizadas) fusionado com γ -CH3	Produção de anti-EDIII de DENV1, 2, 3 (vacinação monovalente e tetravalente) PRNT 70 positivo: formulações monovalentes e tetravalentes contra todos os 4 sorotipos de DENV	Não realizado	Poggianella <i>et al.</i> (2015)
EDIII DNA vaccine	pVAC1-mcs (IM)	Plasmídeo codifica EDIII de DENV1-4 como um único quadro de leitura aberto	NAb positivo contra DENV1-4 no ensaio de inibição de TCID50-CPE	83,3% de proteção em camundongos contra o desafio de DENV1, 3 e 4 i.c e 50% de proteção contra o desafio de DENV2	Kulkarni <i>et al.</i> (2017)
EDIII/ DENV2					
pE2D2	pcDNA3 (IM)	Plasmídeo codifica o peptídeo de sinal t-PA e EDIII	Ensaio PRNT 50 negativo	Taxas de sobrevivência de 45% e morbidade de 65% em camundongos contra desafio i.c com DENV2	Azevedo <i>et al.</i> (2011)
scDEC-EDIII	pcDNA3 (IM + EP)	Plasmídeo codifica EDIII fusionado a scFv aDEC205	ELISA positivo: títulos de IgG anti-EDIII IFN- γ positivo (ELISPOT: específico para DENV2)	Não realizado	Zaneti <i>et al.</i> (2019)
E/ DENV2					
pCID2Et	pCI (IM)	Plasmídeo codifica 94% do gene E de DENV2	Produção de IgG anti-DENV não detectada Produção de IFN- γ e IL-4 não detectada	20% de proteção em camundongos contra i.c	Jimenez e Fonseca (2000)
pE1D2	pcDNA3 (IM)	Plasmídeo codifica o peptídeo sinal t-PA e 80% da E	Ensaio PRNT 50 positivo Respostas positivas de IFN- γ e TNF- α (ELISPOT específico para DENV2)	Taxas de sobrevivência de 90-100% e 10% de morbidade em camundongos contra desafio i.c com DENV2	Azevedo <i>et al.</i> (2011); Azevedo <i>et al.</i> (2013); Pinto <i>et al.</i> , 2019)

NAb: anticorpo neutralizante, PRNT: ensaio de soroneutralização por plaque. Fonte: ALVES *et al.*, 2021.

Ramanathan e colaboradores (2009) também investiram em uma vacina de DNA tetravalente baseada no EDIII, a PDV-U-DIII, contendo somente um único quadro de leitura aberto que codifica sequências consenso sintéticas do domínio III de DENV1-4 otimizadas para expressão em células humanas, clonadas no vetor pVAX1.

A formulação foi inoculada em camundongos BALB/c por eletroporação. O grupo observou a produção significativa de anticorpos neutralizantes contra todos os sorotipos, no entanto experimentos de proteção *in vivo* não foram realizados (RAMANATHAN *et al.*, 2009).

Kulkarni e colaboradores (2017) também projetaram a vacina tetravalente, denominada EDIII DNA, contendo um único quadro de leitura aberto que codifica o domínio III da proteína E de DENV 1-4. A inoculação dessa vacina pela via intramuscular (IM) em camundongos BALB/c induziu e respostas de anticorpos neutralizantes contra todos os sorotipos, bem como proteção contra DENV 1-4 inoculados por desafios intracerebrais (IC), com proteção de 83% para DENV1, 3 e 4 e 50% para DENV2 (KULKARNI *et al.*, 2017).

Já Poggianella *et al.* (2015) construíram a vacina de DNA DIII-CH3 tetravalente, que compreende o domínio III da proteína do envelope, clonado plasmídeo pVAX, onde sequências de DENV1-4 foram otimizadas para expressão em células de mamíferos e fusionadas ao domínio constante 3 da cadeia pesada de IgG humana (γ CH3). Contudo, a formulação tetravalente, que foi administrada em camundongos BALB/c pela via intradérmica (ID), resultou em uma indução desequilibrada de anticorpos neutralizantes (POGGIANELLA *et al.*, 2015).

Zaneti e colaboradores (2019) também desenharam uma vacina de DNA, a scDEC-EDIII, baseada no plasmídeo de expressão pcDNA3, onde foi clonada a sequência do domínio II de DENV2 associada a sequência de anticorpo Fv de cadeia simples (scFv), específico para o receptor de células dendríticas DEC205. A imunização de camundongos BALB/c, via eletroporação, gerou uma resposta humoral robusta, com produção de anticorpos neutralizantes e resposta celular, com ativação de células T (ZANETI *et al.*, 2019). Contudo, os experimentos de avaliação de proteção não foram realizados.

Outros autores voltaram sua pesquisa para abordagens utilizando a proteína E completa. Jamenez e Fonseca (2000) construíram um plasmídeo baseado no pCI que codifica a proteína E de DENV2 (94% do gene E). A vacina, denominada pCID2Et, quando administrada em camundongos BALB/c pela via intramuscular, não foi capaz de induzir respostas imunes humorais e celulares detectáveis nesse modelo animal. Além disso, foram observados apenas 20% de proteção contra o desafio

intracerebral. Esses achados sugerem a necessidade de um peptídeo sinal eficiente para secretar a proteína E recombinante, devido à ausência da proteína prM (JIMENEZ; FONSECA, 2000).

Nos últimos anos, o grupo do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais (LABIFIV), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC - Fiocruz), tem trabalhado na construção de vacinas de DNA contra o vírus da dengue. Dentre essas, destaca-se a vacina pE1D2 que possui a sequência que codifica o ectodomínio (ED1, II e III) da proteína E de DENV2, correspondendo a 80% da proteína E, fusionada ao peptídeo sinal do ativador do plasminogênio tecidual humano (t-PA) (AZEVEDO *et al.*, 2011). Essa sequência foi clonada no vetor pcDNA3 para que a proteína recombinante pudesse ser secretada. Esta vacina de DNA mostrou-se capaz de gerar proteção contra o desafio intracerebral (IC) letal com DENV2 em camundongos BALB/c, com taxas de sobrevivência de 90-100% e 10% de morbidade. Além disso, o plasmídeo pE1D2, inoculado via intramuscular (IM), foi capaz de induzir nestes camundongos tanto uma resposta imune humoral, com produção de anticorpos neutralizantes, quanto a ativação de células T específicas e com produção de IFN- γ e TNF- α (AZEVEDO *et al.*, 2011, PINTO *et al.*, 2019).

Esse mesmo grupo ainda construiu uma vacina de DNA pE2D2 baseada apenas no domínio III da proteína E de DENV2 fundido à sequência sinal t-PA, utilizando o pcDNA3 também como plasmídeo de expressão. No entanto, essa estratégia se mostrou menos eficiente em relação à pE1D2, uma vez que induziu baixos níveis de anticorpos neutralizantes, bem como proteção parcial após desafio viral em camundongos, com 45% de taxa de sobrevivência e 65% de morbidade (AZEVEDO *et al.*, 2013).

2.2.1.2.2 Vacinas de DNA baseadas em prM-E

Ainda, cabe aqui abordar estratégias de vacinas de DNA baseadas na proteína E combinadas a outros antígenos. De fato, há uma maior pluralidade de estudos científicos e ensaios pré-clínicos e clínicos envolvendo a proteína prM em conjunto com a E (ALVES *et al.*, 2021). Isso se deve, principalmente, ao papel da proteína

pré-membrana ao atuar evitando o envelhecimento incorreto da proteína do envelope durante a maturação viral (MODIS *et al.*, 2003).

Muitos autores observaram que vacinas baseadas em prM-E são capazes de gerar resposta imune humoral, com produção de anticorpos neutralizantes, e a resposta celular em modelos animais, tanto em formulações monovalentes quanto tetravalentes. Em camundongos, tais resultados puderam ser vistos pelas vacinas p1012D2ME + pUC 19; pD2MEL; pcD1ME, pcD2ME, pcD3ME e pcD4ME; e TetraME (JIMENEZ; FONSECA, 2000; RAVIPRAKASH *et al.*, 2001; ZANETI *et al.*, 2019). Destes estudos, Zaneti e colaboradores (2019) puderam avaliar níveis de proteção nos animais imunizados, com taxas de 100%, como demonstrado no quadro 3 (ZANETI *et al.*, 2019).

Quadro 4 - Vacinas de DNA candidatas contra a dengue com base em prM-E.

Vacina	Plasmídeo / Via de inoculação	Estratégia	Modelo animal	Resposta Imune	Proteção	Referência
prM + E / DENV2						
pD2MEL	pVR1012 + VR1701	Plasmídeo que codifica prM e 92% de E fundidos à LAMP-1 e + plasmídeo GM CSF (VR1701)	Camundongo	Produção de anticorpos anti DENV 2 PRNT50 positivo Respostas de anticorpos maiores com vacina prM/E/LAMP-DNA + grupo VR1701	Não realizado	Raviprakash <i>et al.</i> (2001)
prM + E / DENV1						
D1ME100 (Ensaio Clínico)	pVR1012 / IM	Plasmídeo que codifica prM e 92% de E	44 voluntários saudáveis soronegativos à dengue	Produção de anticorpos IgM e IgG contra DENV1 PRNT50 positivo IFN-γ positivo (ELISPOT)	Não realizado	Beckett <i>et al</i> (2011)
prM + E / DENV1-4						
pcD1ME, pcD2ME, pcD3ME e pcD4ME	pcDNA3 / IM	Plasmídeo que codifica prM e E de DENV1-4	BALB/c	Produção de IgGs contra DENV1-4 PRNT70 positivo: formulações monovalentes e tetravalentes contra DENV1-4	Não realizado	Jimenez e Fonseca (2000)

TVDV VAX	pVR1012 / IM	Plasmídeo que codifica DENV1, 3 e 4 prM e 92% de E + plasmídeo que codifica DENV2 prM e 92% de E fundido a LAMP-1	Macacos rhesus	PRNT50 positivo: anticorpos neutralizantes contra DENV1-4 Resposta IFN- γ positiva (ELISPOT específico para DENV1 e DENV2)	Ausência ou níveis mais baixos de viremia em macacos após desafio SC com DENV2	Porter <i>et al.</i> (2012)
TVDV VAX Tetravalente (Ensaio Clínico)	pVR1012 / IM	Plasmídeo que codifica prM de DENV1, 3 e 4 e 92% de E + plasmídeo que codifica prM e 92% de E de DENV2 fundido a LAMP-1	40 voluntários adultos saudáveis soronegativos à dengue	ELISA negativo ou títulos de anticorpos muito baixos PRNT50 negativo	Não realizado	Danko <i>et al.</i> (2018)
TetraME	pVAX / IM + EP	Plasmídeo que codifica prM e E	BALB/c	Produção de IgGs contra DENV1-4 PRNT50 positivo: Nab contra DENV1-4 Respostas positivas de IFN- γ e IL-2 (ELISPOT)	100% de proteção em camundongos contra o desafio IC com DENV 1-4 130 semanas após a imunização	Zaneti <i>et al.</i> (2019)

Nab: anticorpo neutralizante, PRNT: ensaio de soroneutralização por plaque. Fonte: ALVES *et al.*, 2021.

Os estudos de Porter e colaboradores (2012) levaram ao desenvolvimento da vacina tetravalente TVDV VAX, em que se observou a indução de resposta imune bem como proteção em modelos de primatas não humanos, como macacos *Rhesus*. Os desfechos desse trabalho mostraram resultados satisfatórios, com produção de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos da dengue, respostas de células T específicas para os sorotipos de DENV1 e DENV2, além de proteção por ausência ou níveis baixos de viremia em desafios subcutâneos provocados por DENV2 (PORTER *et al.*, 2012).

Os estudos da TVDV VAX progrediram para ensaios clínicos. Atualmente, trata-se da vacina de DNA contra a dengue que se encontra em estágios mais avançados. Essa vacina de DNA, produzida pelo *Naval Medical Research Center* (NMRC), codifica as proteínas prM e E dos quatro sorotipos do DENV expressas sob o controle do promotor do citomegalovírus humano do vetor de plasmídeo VR1012,

(PORTER, *et al.*, 2012). A formulação tetravalente dessa vacina foi testada em ensaios clínicos de fase 1 em indivíduos soronegativos sob administração de três doses. Os resultados mostraram baixa produção de anticorpos neutralizantes e estudos que pudessem avaliar a proteção desses indivíduos não foram realizados. No entanto, as análises revelaram a ativação de respostas celulares em 80% dos voluntários (DANKO *et al.*, 2018).

Uma outra estratégia vacinal desenvolvida por Beckett e colaboradores (2011) e baseada em prM e E de DENV1, denominada D1ME100, foi avaliada em ensaios clínicos com voluntários sadios e soronegativos. A proteção não foi avaliada, mas a eficácia em produzir resposta imune, tanto humoral quanto celular, pôde ser vista pela geração de IgM e IgG contra o sorotipo e respostas de IFN- γ (BECKETT *et al.*, 2011).

2.2.1.2.3 Vacinas de DNA baseadas na proteína E e outros antígenos

Há ainda alguns trabalhos que combinam a proteína E com proteínas não estruturais, como NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, mas, principalmente, com a proteína NS1. No trabalho de Lu e colaboradores (2003) foram construídas vacinas de DNA com base na associação dos antígenos prM, E e NS1, e testados em camundongos BALB/c, com diferentes plasmídeos. A vacina pCAG-D1/E/NS1, que codifica prM-E-NS1 de DENV1 e a vacina pCAG-DV1-GM, que codifica prM-E-NS1 com o adjuvante GM-CSF induziram respostas de anticorpos IgG de longo tempo e celulares específicas, bem como 100% de proteção contra desafio viral. O mesmo grupo dedicou-se a outras vacinas, baseadas em DENV2: a pCAG-prM/E, contendo prM e E, a pCAG-prM/E/NS1, contendo prM, E e NS1, e a pCAG-DG, contendo prM, E e NS1 fusionadas a GM-CSF, que geraram proteção parcial de 30%, 40% e 60%, em camundongos após desafio com DENV2 (LU *et al.*, 2013). Nesse trabalho, a maior produção de anticorpos neutralizantes, não correlacionou com maior proteção, indicando a participação da resposta imune celular.

2.2.1.2.4 Vacinas de DNA baseadas na proteína E e outras técnicas vacinais

Outras abordagens vêm sendo investigadas através da combinação de vacinas de DNA baseadas na proteína E com outras técnicas vacinais, como é o caso da

estratégia de Azevedo e colaboradores (2013), em que o DNA plasmidial denominado pE1D2, que codifica o ectodomínio da proteína do envelope de DENV2, foi combinado a uma vacina viva atenuada, a YF17D-D2, que é um vírus quimérico baseado na vacina da febre amarela, com a substituição dos genes prM e E de DENV2. Essa combinação induziu respostas imunes celulares e humorais robustas, além de proteção contra desafios virais em camundongos imunocompetentes. Na verdade, foi observado que a combinação dessas duas metodologias teve um efeito sinérgico na resposta de anticorpos, levando a um aumento nos níveis de anticorpos neutralizantes, quando comparado com a inoculação das duas vacinas isoladamente (AZEVEDO *et al.*, 2013).

2.2.2 Estudo experimental: Avaliação de uma vacina de DNA tetravalente contra a dengue baseada na proteína E

No presente estudo, também foram realizadas análises preliminares de vacinas de DNA contendo o ectodomínio da proteína E dos quatro sorotipos do vírus da dengue, que foram construídas anteriormente no LABIFIV (AZEVEDO *et al.*, 2011; 2013).

2.2.2.1 Análise da integridade e pureza dos DNAs plasmidiais pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4

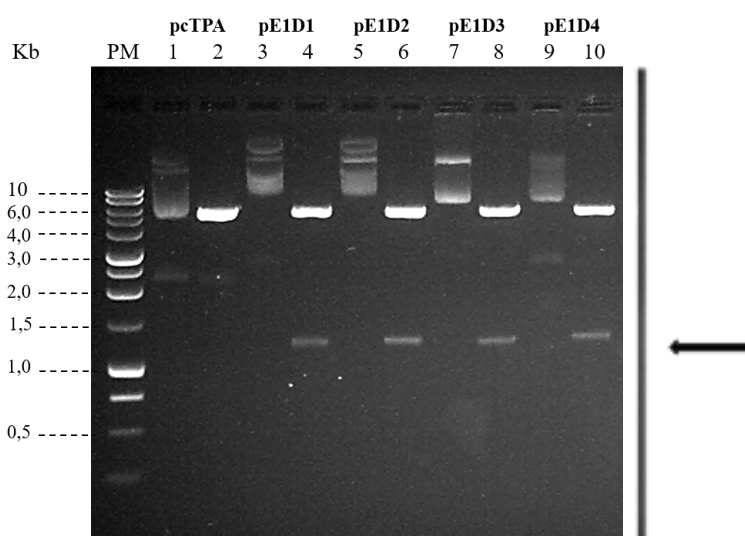
Como já citado anteriormente, os plasmídeos pE1D1, pE1D3 e pE1D4 foram extraídos por lise alcalina e purificados através de colunas de troca iônica. O sequenciamento dos genes clonados nesses plasmídeos confirmou o quadro aberto de leitura compreendendo o peptídeo sinal t-PA e as sequências que codificam as proteínas E dos diferentes sorotipos de dengue.

Após este processo, a integridade e pureza dos DNAs foram analisadas por meio de digestão com as enzimas de restrição *EcoR V* e *Xba I*, que flanqueiam os genes que codificam as proteínas E recombinantes. Sendo assim, os DNAs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e comparados ao controle pCTPA, digerido com as mesmas enzimas de restrição. Vale salientar que, ainda que o grupo

do laboratório possui resultados pertinentes quanto à integridade do pE1D2, este também foi digerido para visualização concomitante dos 4 DNAs plasmidiais.

Conforme esperado, a digestão dos plasmídeos recombinantes com as enzimas de restrição liberou os fragmentos de peso molecular de 1,2 Kb, correspondente ao peso esperado para a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E. A digestão do pcTPA linearizou o plasmídeo e produziu somente uma banda de peso molecular de 5,4 Kb, conforme esperado, como mostra a figura 8. Portanto, após a análise do gel e do sequenciamento, foi possível concluir que os DNAs plasmidiais encontravam-se íntegros e com o fragmento correto.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4 com as enzimas de restrição *EcoR V* e *Xba I*.



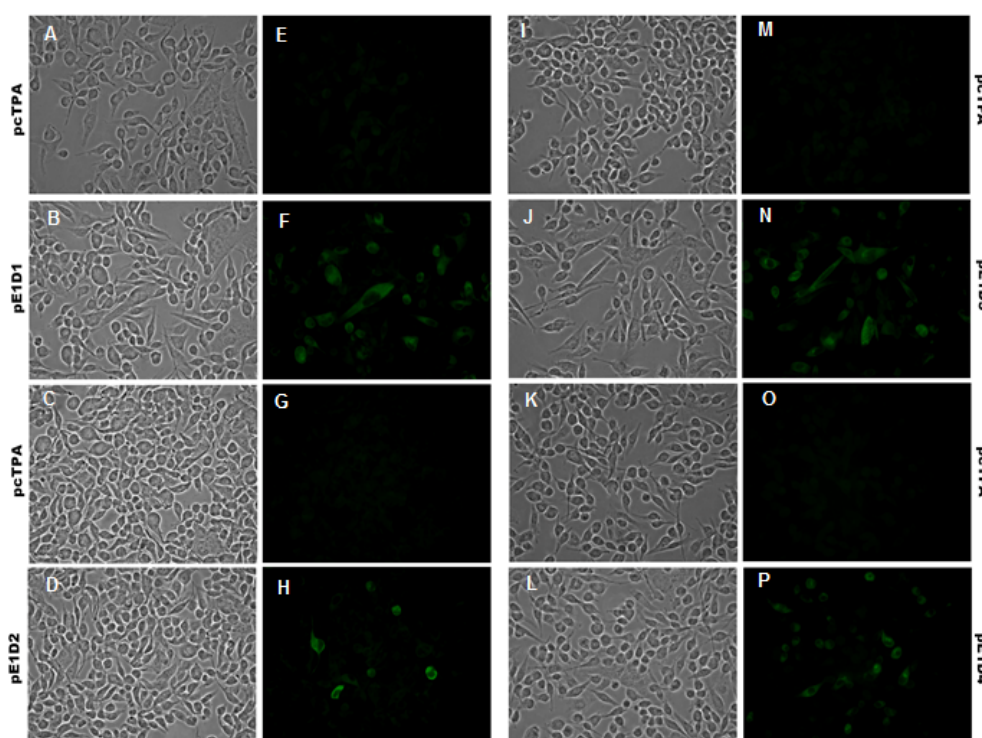
Legenda: PM: peso molecular 1Kb DNA (Promega); Linha 1: pcTPA não digerido; Linha 2: pcTPA digerido; Linha 3: pE1D1 não digerido; Linha 4: pE1D1 digerido; Linha 5: pE1D2 não digerido; Linha 6: pE1D2 digerido; Linha 7: pE1D3 não digerido; Linha 8: pE1D3 digerido; Linha 9: pE1D4 não digerido; Linha 10: pE1D4 digerido. A seta indica os fragmentos de 1,2 kb, que correspondem aos insertos clonados.

2.2.2.2 Análise da expressão *in vitro* da proteína E dos quatro sorotipos de dengue em células BHK-21 transfectadas com as vacinas de DNA pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4

A expressão *in vitro* das proteínas recombinantes foi analisada em células BHK-21 transfectadas com as vacinas de DNA pE1D1, pE1D3 e pE1D4, bem como

com o plasmídeo controle pcTPA. As células transfectadas foram incubadas com anticorpos específicos anti-E seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado a FITC, permitindo a visualização dos resultados em microscópio de fluorescência (Figura 9).

Figura 9 - Expressão *in vitro* das proteínas E recombinantes em células BHK-21 transfectadas com as vacinas de DNA pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4.



Legenda: Células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pE1D1 (B, F), pE1D2 (D, H), pE1D3 (J, N), pE1D4 (L, P) ou com controle negativo pcTPA (A, E, C, G, I, M, K, O), utilizando Lipofectamina 2000. As proteínas recombinantes foram detectadas com anticorpos primários policlonais de macaco anti-E de DENV1 (E, F), DENV2 (G, H), DENV3 (M, N) ou DENV4 (O, P) e anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado a FITC. Contraste de fase (A-D; I-L); Fluorescência das células incubadas com anticorpos anti-E (E-H; M-P). Aumento de 40x.

Os resultados revelaram a expressão das proteínas do envelope dos 4 sorotipos virais: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 nas células BHK-21 transfectadas com as vacinas pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4, respectivamente (Figura 9F, H, N, P). Conforme esperado, não foi detectada marcação positiva nas células transfectadas com o controle pcTPA, utilizando estes mesmos anticorpos (Figura 9E, G, M, O). Estes dados confirmam a capacidade das quatro vacinas de DNA mediar a expressão das proteínas recombinantes em células de mamíferos.

2.3 DISCUSSÃO

A dengue é um problema de saúde pública mundial, principalmente nos países tropicais e subtropicais (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). As estratégias de prevenção e controle da incidência da doença incluem a contenção da proliferação do principal vetor transmissor do vírus da dengue, o *Aedes aegypti*, e o desenvolvimento de vacinas. Esse segundo fator é considerado o mais eficaz a curto prazo e, conseqüentemente, primordial para casos emergenciais, como o controle de epidemias (MARTINEZ-VEGA *et al.*, 2017).

Uma vacina ideal contra a dengue precisa induzir ambos os braços do sistema imunológico: a resposta humoral, com produção de anticorpos neutralizantes e a resposta de células T contra os 4 sorotipos, concomitantemente e de forma equilibrada, com produção de memória de longo prazo (GUBLER; HALSTEAD, 2019). Isso porque, respostas desequilibradas tendem a favorecer um maior risco de casos graves da doença quando há uma infecção secundária (SCHWARTZ *et al.*, 2015).

Nessa perspectiva, existem diversos estudos sobre vacinas contra a dengue em ensaios pré-clínicos e clínicos, principalmente, baseados em vírus vivo atenuado, vírus inativado purificado, subunidade recombinante e vacinas de DNA (PEREIRA *et al.*, 2015; TORRESI *et al.*, 2017). Como já mencionado, a única vacina licenciada para o controle da doença, a Dengvaxia, baseada em vírus atenuado, não se trata de uma estratégia de prevenção universal, devido à impossibilidade de ser administrada em indivíduos soronegativos, já que estes possuem maiores risco de manifestar formas graves da doença quando infectados posteriormente à vacinação (SABCHAREON *et al.*, 2012).

Sendo assim, cada vez mais esforços têm sido feitos por parte da comunidade científica para a promoção de pesquisas que resultem na elaboração de uma vacina tetravalente segura e eficaz. Dentre as diferentes estratégias vacinais em desenvolvimento atualmente, as vacinas gênicas têm mostrado resultados promissores em ensaios pré-clínicos e clínicos, promovendo indução de respostas duradouras de células T em grande parte em modelos murinos, bem como ativação de anticorpos neutralizantes. Além disso, essa abordagem vacinal possibilita maior

facilidade em balancear a resposta imune contra os 4 sorotipos virais, do que as vacinas vivas atenuadas, que também induzem os dois braços da resposta imune (ALVES *et al.*, 2020).

Os primeiros estudos de vacinas de DNA e RNA compreendendo experimentos com modelos animais tiveram início na década de 1990 (PASCOLO, 2006). Nos últimos anos, as vacinas baseadas em RNA ganharam grande destaque após a revolução científica impulsionada pela urgente demanda por estudos de vacinas, como consequência da pandemia da COVID-19 (CAMPOS *et al.*, 2020), visto que, pela primeira vez, vacinas de RNA foram aprovadas para uso humano (PACHECO *et al.*, 2020).

Em relação à dengue, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos. Recentemente, grupos se debruçaram em pesquisas envolvendo o uso de RNA para a construção de uma formulação vacinal contra a dengue e obtiveram resultados prósperos quanto à proteção e respostas imunes celulares e de anticorpos contra sorotipos isolados (RICHNER *et al.*, 2017; ROTH *et al.*, 2019; WOLLNER; RICHNER, 2021). No entanto, são necessários mais estudos que envolvam estratégias tetravalentes e que garantam eficácia contra os quatro sorotipos de DENV de forma a evitar a indução de quadros graves da doença.

Já em relação às vacinas baseadas em DNA, foi possível observar que existem mais estudos científicos em desenvolvimento, com vacinas já em ensaios clínicos, devido à facilidade de manipulação, baixo custo, e a dificuldade inicial em utilizar a molécula de RNA como vacina devido à sua instabilidade (WILLIAMS, 2014). Sendo assim, estão disponíveis vacinas de DNA contra a dengue baseadas tanto em proteínas estruturais, quanto não estruturais. As proteínas não estruturais, como NS1, NS3, NS4B e NS5, são capazes de induzir resposta imune celular e escapam do risco de levar ao mecanismo de ADE (RIVINO *et al.*, 2013). Entretanto, a maioria das vacinas de DNA contra a dengue codifica proteínas estruturais, como a proteína do envelope, a qual medeia a interação do vírus com a célula hospedeira, e que é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (ALVES *et al.*, 2021; TOTTEY *et al.*, 2018).

Algumas vacinas em progresso baseiam-se apenas na proteína E ou em um de seus domínios, principalmente, o domínio III, por ser responsável por interagir com

receptores de células hospedeiras (DIAMOND, 2003; MOTA *et al.*, 2005). Outras abordagens compreendem a combinação prM/E, uma vez que a proteína pré membrana é importante para propiciar a melhor conformação da proteína E durante a maturação viral (LINDENBACH, 2007; MODIS *et al.*, 2003; PORTER *et al.*, 2012).

Muitos autores que avaliaram vacinas de DNA contendo o antígeno EDIII, em formulações tetravalentes ou não, observaram a indução respostas de anticorpos neutralizantes robustas (KULKARNI *et al.*, 2017; MOTA *et al.*, 2005; POGGIANELLA *et al.*, 2015; RAMANATHAN *et al.*, 2009). Vacinas de DNA desenvolvidas por Ramanathan e colaboradores (2009), e Zaneti e colaboradores (2019) foram capazes de induzir, além de anticorpos neutralizantes e respostas de células T. Da mesma forma, vacinas baseadas no domínio III foram capazes de gerar proteção contra desafios virais, em modelos murinos, como observado por Mota e colaboradores (2005), bem como por Kulkarni e parceiros (2017).

Outros evidenciaram a eficácia de vacinas de DNA baseadas apenas na proteína E, quando produzida de forma a ser secretada pela célula alvo (AZEVEDO *et al.*, 2011; JIMENEZ; FONSECA, 2000). Entretanto, os estudos mais avançados sobre vacinas de DNA baseadas no antígeno E compreendem vacinas que combinam prM e E, em que foi observada a indução de resposta imune humoral e celular em camundongos (JIMENEZ; FONSECA, 2000; RAVIPRAKASH *et al.*, 2001; ZANETI *et al.*, 2019), em macacos (PORTER *et al.*, 2012) e em humanos (BECKETT *et al.*, 2011; DANKO *et al.*, 2018).

As avaliações clínicas de uma vacina tetravalente contendo prM/E, a TVTD, despertaram interesse por parte da comunidade científica (PORTER, *et al.*, 2012). A formulação tetravalente dessa vacina em ensaios clínicos de fase 1 mostraram inicialmente baixa produção de anticorpos. No entanto, a vacina foi capaz de ativar respostas celulares em 80% dos voluntários (DANKO *et al.*, 2018). Esses dados confirmam a necessidade de maiores esforços para melhoria da resposta imune humoral.

Ainda, uma estratégia que pode otimizar a resposta imune das vacinas de DNA baseadas na proteína E é combiná-la com outras abordagens e técnicas vacinais. Como observado por Azevedo *et al.* (2013), a combinação da vacina de DNA com base na proteína do envelope viral (pE1D2), com uma vacina viva quimérica contendo

prM/E gerou um efeito sinérgico, aumentando a resposta de anticorpos (AZEVEDO *et al.*, 2013).

No presente trabalho, além da revisão bibliográfica realizada que evidenciou a necessidade de mais estudos sobre vacinas gênicas, foram realizadas análises preliminares de uma formulação tetravalente contra a dengue composta por vacinas de DNA baseadas nas proteínas E de DENV 1, 2, 3 e 4, em busca de uma estratégia vacinal eficaz e protetora contra os quatro sorotipos virais. O investimento nessa formulação tetravalente se deve a vacina monovalente, pE1D2, ter se mostrado eficaz na indução da resposta imune humoral e celular, assim como capaz de induzir altos níveis de proteção em modelo murino (AZEVEDO *et al.*, 2011).

Foram utilizadas, então, as vacinas de DNA pE1D1, pE1D3 e pE1D4 contendo sequências que codificam a proteína E dos sorotipos 1, 3 e 4 do vírus da dengue, respectivamente. Os plasmídeos utilizados apresentaram-se íntegros e puros após a avaliação por digestão com enzimas de restrição e eletroforese, bem como por sequenciamento. Além disso, a análise da expressão das proteínas recombinantes do envelope viral em culturas de células de rim de hamster neonato, BHK-21, transfectadas com os plasmídeos pE1D1, pE1D3 e pE1D4 mostrou que eles foram capazes de mediar corretamente a expressão das proteínas E de DENV1, 3 e 4, respectivamente.

O próximo passo deste estudo é avaliar essas vacinas quanto ao seu potencial imunogênico e protetor. Para iniciar essas análises, camundongos BALB/c foram imunizados com os quatro plasmídeos recombinantes para a aquisição do soro imune que serão utilizados em experimentos que busquem avaliar a resposta imune humoral gerada com estas vacinas de DNA, como padronização dos ensaios de soroneutralização para sorotipos de DENV 1, DENV3 e DENV4 por redução de plaque em monocamadas celulares (PRNT_{50%}), titulação de anticorpos neutralizantes, bem como avaliação desses anticorpos gerados com uma formulação tetravalente com todos os plasmídeos. No entanto, devido à pandemia da COVID-19, não foi possível dar continuidade a tais experimentos práticos, tratando-se, portanto, de perspectivas a serem alcançadas em trabalhos futuros.

A continuação dos estudos da vacina pE1D2, agora em uma formulação tetravalente, é muito importante no cenário das vacinas contra a dengue. A vacina

pE1D2 foi capaz de induzir níveis significativos de anticorpos neutralizantes e uma resposta imune celular robusta, com produção de IFN- γ e proteção em modelo murino. Além dos estudos com a vacina de DNA pE1D2 isoladamente, foi também avaliada a combinação dessa vacina com um vírus da febre amarela vacinal quimérico, contendo os genes prM/E de DENV2 (YF17D-D2), que é semelhante a um dos vírus que compõem a vacina Dengvaxia. A imunização com essas duas vacinas levou à proteção total de camundongos BALB/c após desafio com DENV2 (100% de sobrevivência e 0% de morbidade), com um efeito sinérgico da resposta de anticorpos neutralizantes. Por outro lado, a resposta de células T com produção de IFN- γ foi gerada predominantemente pela vacina de DNA, demonstrando a sua importância na indução deste braço da resposta imune. Este estudo gerou uma patente com depósito em 11 países e já foi concedida em Cuba, China, Colômbia e Peru. Essa combinação de vacina de DNA e vacina viva quimérica pode ser uma alternativa para a melhoria na eficácia da vacina licenciada para uso em humano, a Dengvaxia.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A preocupação tanto por parte da comunidade científica quanto de profissionais da saúde que lidam diretamente com o enfrentamento da doença no mundo, reflete em uma procura incessante por estratégias vacinais preventivas. Além disso, a ineficácia de proteção universal oriunda da única vacina licenciada para a dengue nos dias atuais, a Dengvaxia, devido ao risco de manifestações graves da doença por infecções secundárias heterólogas em indivíduos vacinados, promove cada vez mais o interesse no desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes que possam atender à maioria da população.

Os resultados aqui apresentados compilam estudos realizados nos últimos anos acerca de vacinas gênicas contra a dengue baseadas na proteína do envelope viral. Com base no conteúdo avaliado, é possível concluir que há uma maior predominância de estudos aplicados às tecnologias de DNA, em detrimento às de RNA. Dentre as diferentes vacinas de DNA baseadas na proteína E, atualmente disponíveis em ensaios pré-clínicos e clínicos, o uso da associação da proteína pré-membrana e proteína do envelope (prM/E) foi a estratégia que tem alcançado estudos mais avançados, com ensaios clínicos em indivíduos soronegativos.

Além disso, nesse estudo foi iniciada a avaliação de uma vacina de DNA contra a dengue baseada na proteína E, desenvolvida pelo laboratório LABIFIV. Os DNAs plasmidiais utilizados (pE1D1, pE1D2, pE1D3 e pE1D4) encontraram-se íntegros e puros e foram capazes de mediar corretamente a expressão das proteínas E recombinantes em cultura de células de mamíferos. A inoculação desses plasmídeos em camundongos desenvolvida no presente trabalho contribuirá para avaliações de segurança e potencial imunogênico dessa abordagem em experimentos futuros.

Em suma, apesar de reconhecer os desafios, este trabalho reforça a necessidade do avanço de estudos, principalmente, os que envolvem tecnologias gênicas, que possam desenvolver uma vacina capaz de conferir proteção e eficácia satisfatória e duradoura contra os quatro sorotipos do vírus da dengue. Ainda, sugere que a estratégia desenvolvida pelo grupo pode se tornar uma candidata promissora para futuros ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

ALVES, Ada *et al.* Dengue Virus and Vaccines: How Can DNA Immunization Contribute to This Challenge?. **Frontiers in Medical Technology**, v. 3, p. 13, 2021.

ARIAS, Julia *et al.* Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. **Virology**, v. 452, p. 42-51, 2014.

AZEVEDO, Adriana S. *et al.* DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e20528, 2011.

AZEVEDO, Adriana S. *et al.* The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58357, 2013.

BACK, A; LUNDKVIST, A. Dengue viruses—an overview. **Infection ecology & epidemiology**, v. 3, n. 1, p. 19839, 2013.

BARNIOL, Judit *et al.* Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by disease: multi-centre study in 18 countries. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011.

BARRETO, Maurício L.; TEIXEIRA, Maria Glória. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22, p. 53-72, 2008.

BECKETT, Charmagne G. *et al.* Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. **Vaccine**, v. 29, n. 5, p. 960-968, 2011.

BISWAL, Shibadas *et al.* Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4–16 years: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1423-1433, 2020.

BHATT, Samir *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.

BUTTHEP, Punnee *et al.* Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 31, n. 12, p. e232-e238, 2012.

CAMPOS, Estefânia VR *et al.* How can nanotechnology help to combat COVID-19? Opportunities and urgent need. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-23, 2020.

CASSETTI, M. Cristina; HALSTEAD, Scott B. Consultation on dengue vaccines: progress in understanding protection, 26–28 June 2013, Rockville, Maryland. **Vaccine**, v. 32, n. 26, p. 3115-3121, 2014.

CAVALCANTI, Luciano *et al.* Evaluation of the World Health Organization 2009 classification of dengue severity in autopsied individuals, during the epidemics of 2011 and 2012 in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 658-664, 2015.

CHAHAL, Jasdave S. *et al.* Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 29, p. E4133-E4142, 2016.

CRILL, Wayne D.; CHANG, Gwong-Jen J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **Journal of virology**, v. 78, n. 24, p. 13975-13986, 2004.

COLLER, Beth-Ann G. *et al.* The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7267-7275, 2011.

DANKO, Janine R. *et al.* Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue DNA vaccine administered with a cationic lipid-based adjuvant in a phase 1 clinical trial. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 3, p. 849, 2018.

DEFRANCESCO, Laura. The Anti-hype vaccine. **Nature biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 193-198, 2017.

DEJNIRATTISAI, Wanwisa *et al.* Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102-1108, 2016.

DIAMOND, Michael S. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. **Immunology and cell biology**, v. 81, n. 3, p. 196-206, 2003.

DIAZ, Clemente *et al.* Phase I randomized study of a tetravalent dengue purified inactivated vaccine in healthy adults from Puerto Rico. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 5, p. 1435, 2018.

DURBIN, Anna P.; WHITEHEAD, Stephen S. Next-generation dengue vaccines: novel strategies currently under development. **Viruses**, v. 3, n. 10, p. 1800-1814, 2011.

ELONG NGONO, Annie; SHRESTA, Sujan. Immune response to dengue and Zika. **Annual review of immunology**, v. 36, p. 279-308, 2018.

FERREIRA, Ralph Antonio Xavier *et al.* Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. **Acta tropica**, v. 149, p. 138-147, 2015.

FLORES, Heather A.; O'NEILL, Scott L. Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 508-518, 2018.

FRIED, Jessica R. *et al.* Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 3, p. e617, 2010.

GARCÍA, Gissel *et al.* Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. e38-e43, 2011.

GEALL, Andrew *et al.* RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2013. p. 152-159.

GUBLER, Duane J.; HALSTEAD, S. B. **Is Dengvaxia a useful vaccine for dengue endemic areas?** *BMJ (Clinical research ed.)*, [s.l.], v. 367, p. l5710, 2019. ISSN: 1756-1833, DOI: 10.1136/bmj.l5710.

GUZMAN, Maria G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7-S16, 2010.

HADINEGORO, Sri Rezeki *et al.* Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 13, p. 1195-1206, 2015.

HALSTEAD, Scott B. *et al.* Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv virus res**, v. 60, p. 421-467, 2003.

HALSTEAD, Scott B. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. **Vaccine**, v. 35, n. 47, p. 6355-6358, 2017.

HEINZ, F. X.; STIASNY, Karin. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 4, p. 289-295, 2012.

HENCHAL, Erik A.; PUTNAK, J. Robert. The dengue viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HINZ, Thomas *et al.* The European regulatory environment of RNA-based vaccines. **RNA Vaccines**, p. 203-222, 2017.

HOLTKAMP, Silke *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 4009-4017, 2006.

IDRIS, Fakhriedzwan *et al.* An update on dengue vaccine development, challenges, and future perspectives. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 16, n. 1, p. 47-58, 2021.

JIMENEZ, Raquel Ocazonez; DA FONSECA, Benedito Antônio Lopes. Recombinant plasmid expressing a truncated dengue-2 virus E protein without co-expression of prM protein induces partial protection in mice. **Vaccine**, v. 19, n. 6, p. 648-654, 2000.

KALLAS, Esper G. *et al.* Safety and immunogenicity of the tetravalent, live-attenuated dengue vaccine Butantan-DV in adults in Brazil: a two-step, double-blind, randomised placebo-controlled phase 2 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 7, p. 839-850, 2020.

KALLEN, Karl-Josef; THEB, Andreas. A development that may evolve into a revolution in medicine: mRNA as the basis for novel, nucleotide-based vaccines and drugs. **Therapeutic advances in vaccines**, v. 2, n. 1, p. 10-31, 2014.

KATZELNICK, Leah C. *et al.* Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 929-932, 2017.

KHAN, Kishwar Hayat. DNA vaccines: roles against diseases. **Germes**, v. 3, n. 1, p. 26, 2013.

KHETARPAL, Niyati; KHANNA, Ira. Dengue fever: causes, complications, and vaccine strategies. **Journal of immunology research**, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2016/6803098/>. Acesso em: 23 ago. 2021.

KASSIM, Fauziah Md *et al.* Use of dengue NS1 antigen for early diagnosis of dengue virus infection. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 42, n. 3, p. 562-9, 2011.

KROSCHEWSKI, Helga *et al.* Mutagênese do domínio NS5 metiltransferase do vírus da dengue tipo 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 28, pág. 19410-19421, 2008.

KUCZERA, Diogo *et al.* Highlights for dengue immunopathogenesis: antibody-dependent enhancement, cytokine storm, and beyond. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 38, n. 2, p. 69-80, 2018.

KUHN, Richard J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

KULKARNI, Ajit *et al.* Neutralizing antibody response and efficacy of novel recombinant tetravalent dengue DNA vaccine comprising envelope domain III in mice. **Iranian journal of medical sciences**, v. 42, n. 2, p. 152, 2017.

LAUGHLIN, Catherine A. *et al.* Dengue research opportunities in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, v. 206, n. 7, p. 1121-1127, 2012.

LEDFOORD, H. Moderna COVID vaccine becomes second to get US authorization: Two RNA vaccines will be useful as US infections surge, but the speedy authorizations complicate clinical trials. **Nature News**, 2020.

LIMA, Eduardo *et al.* Vaccines for COVID-19-state of the art. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 21, p. 13-19, 2021.

LINDENBACH, Brett D. **Flaviviridae**: the viruses and their replication. *Fields virology*, p. 1101-1152, 2007.

LIU, Margaret A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. **Immunological reviews**, v. 239, n. 1, p. 62-84, 2011.

LIU, Yang *et al.* Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. **Emerging microbes & infections**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2016.

LU, Hui *et al.* Preliminary evaluation of DNA vaccine candidates encoding dengue-2 prM/E and NS1: their immunity and protective efficacy in mice. **Molecular immunology**, v. 54, n. 2, p. 109-114, 2013.

LU, Y *et al.* Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 21, n. 17-18, p. 2178-2189, 2003.

LWANDE, Olivia Wesula *et al.* Globe-trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: risk factors for arbovirus pandemics. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 2, p. 71-81, 2020.

MAHASE, Elisabeth. Covid-19: What do we know about the late stage vaccine candidates? **British Medical Journal Publishing Group**. 371:m4576. 2020.

MALAVIGE, G. N. *et al.* Dengue viral infections. **Postgraduate medical journal**, v. 80, n. 948, p. 588-601, 2004.

MANOFF, Susan B. *et al.* Immunogenicity and safety of an investigational tetravalent recombinant subunit vaccine for dengue: results of a Phase I randomized clinical trial in flavivirus-naïve adults. **Human vaccines & immunotherapeutics**, 2019.

MARTÍNEZ-VEGA, Ruth Aralí *et al.* ADE and dengue vaccination. **Vaccine**, v. 35, n. 32, p. 3910-3912, 2017.

MASSAD, Eduardo *et al.* Dengue and the risk of urban yellow fever reintroduction in Sao Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, p. 477-484, 2003.

MATHEW, Anuja; ROTHMAN, Alan L. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. **Immunological reviews**, v. 225, n. 1, p. 300-313, 2008.

MEUNIER, Marine *et al.* DNA vaccination of poultry: the current status in 2015. **Vaccine**, v. 34, n. 2, p. 202-211, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico 01**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no1.pdf/view>. Acesso em: 26 jan. 2022.

MODIS, Yorgo *et al.* A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 6986-6991, 2003.

MONGKOLSAPAYA, Juthathip *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MORRISON, A. C. *et al.* Defining the challenges and proposing new solutions for *Aedes aegypti*-borne disease prevention. **PLoS Med**, v. 5, n. 362, p. 6, 2008.

MOTA, Javier *et al.* Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. **Vaccine**, v. 23, n. 26, p. 3469-3476, 2005.

NEDJADI, Taoufik *et al.* Tackling dengue fever: current status and challenges. **Virology journal**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2015.

NOGUEIRA, Rita MR; EPPINGHAUS, Ana LF. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 255-256, 2011.

PACHECO, Thyago *et al.* Nano COVID-19 Vaccines: the firsts RNA lipid nanoparticle vaccines being approved from history-Review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p., 2020.

PANG, Ee Leen; LOH, Hwei-San. Towards development of a universal dengue vaccine—How close are we?. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 10, n. 3, p. 220-228, 2017.

PASCOLO, S. Vacinação com RNA mensageiro. **Vacinas de DNA**, pp. 23-40. 2006

PEREIRA, Renata C. *et al.* An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. **Vaccine**, v. 33, n. 35, p. 4261-4268, 2015.

PICCINI, Luana *et al.* Dengue-3 virus entry into vero cells: role of clathrin-mediated endocytosis in the outcome of infection. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140824, 2015.

PINTO, Paolla *et al.* T cell responses induced by DNA vaccines based on the DENV2 E and NS1 proteins in mice: importance in protection and immunodominant epitope identification. **Frontiers in Immunology**, p. 1522, 2019.

POGGIANELLA, Monica *et al.* Dengue E protein domain III-based DNA immunisation induces strong antibody responses to all four viral serotypes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003947, 2015.

PORTER, Kevin R. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a vaxfectin-adjuvanted tetravalent dengue DNA vaccine. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 336-341, 2012.

RAMANATHAN, Mathura P. *et al.* Development of a novel DNA SynCon™ tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6444-6453, 2009.

RAMOS-CASTANEDA, Jose *et al.* Dengue in Latin America: systematic review of molecular epidemiological trends. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005224, 2017.

RATHER, Irfan A. *et al.* Prevention and control strategies to counter dengue virus infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 336, 2017.

RAUCH, Susanne *et al.* RNAActive® technology: generation and testing of stable and immunogenic mRNA vaccines. In: **RNA Vaccines**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 89-107.

RAVIPRAKASH, Kanakatte *et al.* Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. **Virology**, v. 290, n. 1, p. 74-82, 2001.

REINHARDT, Gustavo *et al.* Desenvolvimento e aplicações de vacinas gênicas no tratamento e prevenção de doenças. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 7, p. 245-261, 2017.

REY, Félix A. *et al.* The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. **EMBO reports**, v. 19, n. 2, p. 206-224, 2018.

RIBEIRO, Andressa F. *et al.* Association between dengue incidence and climatic factors. **Revista de saúde pública**, v. 40, n. 4, p. 671-676, 2006.

RICHNER, Justin M. *et al.* Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 1114-1125. e10, 2017.

RIVINO, Laura *et al.* Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection. **Journal of virology**, v. 87, n. 5, p. 2693-2706, 2013.

RODENHUIS-ZYBERT, Izabela A. *et al.* Immature dengue virus: a veiled pathogen. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000718, 2010.

ROTH, Claude *et al.* A modified mRNA vaccine targeting immunodominant NS epitopes protects against dengue virus infection in HLA class I transgenic mice. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1424, 2019.

SAADE, Fadi; PETROVSKY, Nikolai. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 2, p. 189-209, 2012.

SABCHAREON, Arunee *et al.* Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1559-1567, 2012.

SAMPATH, Aruna; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral research**, v. 81, n. 1, p. 6-15, 2009.

SCHLAKE, Thomas *et al.* Developing mRNA-vaccine technologies. **RNA biology**, v. 9, n. 11, p. 1319-1330, 2012.

SCHMIDT, Alexander C. *et al.* Phase 1 randomized study of a tetravalent dengue purified inactivated vaccine in healthy adults in the United States. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 96, n. 6, p. 1325, 2017.

SCHWARTZ, Lauren M. *et al.* The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. **Vaccine**, v. 33, n. 29, p. 3293-3298, 2015.

SHAFEE, Norazizah; ABUBAKAR, Sazaly. Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. **Journal of general virology**, v. 84, n. 8, p. 2191-2195, 2003.

SHUKLA, Rahul *et al.* Antibody-dependent enhancement: A challenge for developing a safe dengue vaccine. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

SMIT, Jolanda M. *et al.* Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160-171, 2011.

STAPLES, J. Erin *et al.* Yellow fever vaccine booster doses: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 64, n. 23, p. 647, 2015.

STETTLER, Karin *et al.* Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 823-826, 2016.

SUN, Wellington *et al.* Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 6_suppl, p. 24-31, 2003.

SWAMINATHAN, Sathyamangalam; KHANNA, Navin. Dengue vaccine development: Global and Indian scenarios. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 84, p. S80-S86, 2019.

THOMAS, Stephen J.; YOON, In-Kyu. A review of Dengvaxia®: Development to deployment. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2295-2314, 2019.

TORRESI, J *et al.* Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 5, p. 1059-1072, 2017.

TOTTEY, Stephen *et al.* Plant-produced subunit vaccine candidates against yellow fever induce virus neutralizing antibodies and confer protection against viral challenge in animal models. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 2, p. 420, 2018.

UNNIKRISHNAN, Rahul *et al.* Clinical and laboratory profile of dengue in the elderly. **Journal of family medicine and primary care**, v. 4, n. 3, p. 369, 2015.

VRATSKIKH, Oksana *et al.* Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003458, 2013.

VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 275-293, 2003.

VÁZQUEZ, Susana *et al.* Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. **Vaccine**, v. 20, n. 13-14, p. 1823-1830, 2002.

WATANAVERADEJ, Veerachai *et al.* Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve infants. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 2, p. 341, 2011.

WEAVER, Scott C.; VASILAKIS, Nikos. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, genetics and evolution**, v. 9, n. 4, p. 523-540, 2009.

WILLIAMS, James. Improving DNA vaccine performance through vector design. **Current gene therapy**, v. 14, n. 3, p. 170-189, 2014.

WHITEHEAD, Stephen S. Development of TV003/TV005, a single dose, highly immunogenic live attenuated dengue vaccine; what makes this vaccine different from the Sanofi-Pasteur CYD™ vaccine?. **Expert review of vaccines**, v. 15, n. 4, p. 509-517, 2016.

WHO. **Dengue vaccine: WHO position paper**. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9130.pdf?ua=1> . Acesso em: 12 de agosto de 2021, às 18:32h.

WHO. **Global Burden of Dengue**. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/9789241504034/en/>. Acesso em: 12 ago. 2021.

WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. 2009. Disponível em: <https://www.who.int/home/search?indexCatalogue=genericsearchindex1&searchQuery=DENGUE&wordsMode=AnyWord>. Acesso em: 24 dez 2021.

WOLLNER, Clayton J.; RICHNER, Justin M. mRNA Vaccines against Flaviviruses. **Vaccines**, v. 9, n. 2, p. 148, 2021.

XIE, Xuping *et al.* Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. **Journal of virology**, v. 87, n. 8, p. 4609-4622, 2013.

YACOURB, Sophie *et al.* Recent advances in understanding dengue. **F1000Research**, v. 5, 2016.

YAP, Yun-Kiam; SMITH, Duncan R. Strategies for the plant-based expression of dengue subunit vaccines. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 57, n. 2, p. 47-53, 2010.

YOUNG, Paul R. *et al.* An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

YUNG, Chee-Fu *et al.* Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 92, n. 5, p. 999, 2015.

ZANETI, Arthur Baruel *et al.* Dendritic cell targeting using a DNA vaccine induces specific antibodies and CD4+ T cells to the dengue virus envelope protein domain III. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 59, 2019.

ZEIDLER, Julianna D. *et al.* Non-canonical roles of dengue virus non-structural proteins. **Viruses**, v. 9, n. 3, p. 42, 2017.

ZHANG, Mengling *et al.* Modified mRNA-LNP vaccines confer protection against experimental DENV-2 infection in mice. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, v. 18, p. 702-712, 2020.

ZHENG, Aihua *et al.* A toggle switch controls the low pH-triggered rearrangement and maturation of the dengue virus envelope proteins. **Nature communications**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2014.

ZOU, Jing *et al.* Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. **Journal of virology**, v. 89, n. 7, p. 3455-3470, 2015.