

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NATALIA INGRID OLIVEIRA DA SILVA

**ANÁLISE DO EFEITO ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE
ALBUMINA SÉRICA BOVINA NA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS
UTILIZANDO A PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 DO *Dengue vírus***

Alfenas/MG

2016

NATALIA INGRID OLIVEIRA DA SILVA

**ANÁLISE DO EFEITO ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE
ALBUMINA SÉRICA BOVINA NA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS
UTILIZANDO A PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 DO *Dengue vírus***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção de título de mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
Área de Concentração: Biologia Molecular
Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

Alfenas/MG

2016

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

Silva, Natalia Ingrid Oliveira da

Análise do efeito adjuvante de nanopartículas de albumina sérica bovina na imunização de camundongos utilizando a proteína não estrutural 1 do Dengue Vírus / Natalia Ingrid Oliveira da Silva. -- Alfenas/MG, 2016.

85 f.

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Vacina. 2. Vírus da Dengue. 3. Nanopartículas. 4. Dengue.
I. Coelho, Luiz Felipe Leomil. II. Título.

CDD-616.91852



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



NATALIA INGRID OLIVEIRA DA SILVA

“ANÁLISE DO EFEITO ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA NA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS UTILIZANDO A PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 DO DENGUE VÍRUS”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Biologia Molecular

Aprovado em: 08 de dezembro de 2016.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Luiz Felipe Leomil Coelho

Prof. Dr. Marcos José Marques
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Marcos José Marques

Profª. Dra. Betânia Paiva Drumond
Instituição: UFMG

Assinatura: Betânia Paiva Drumond

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Julio e Branca, por serem meus grandes mestres na vida, pelo carinho e amor incondicional, pela confiança, e principalmente, por acreditarem no meu trabalho e amor pela Ciência, sem este apoio nada disso seria possível.

Aos meus irmãos e familiares, pela paciência, carinho e por torcerem sempre pelo meu sucesso. Seguimos unidos!

Aos meus queridos amigos de Campos do Jordão, Alfenas e de “Budapeste”, pelo carinho especial, cada um foi essencial por tornar minha vida mais leve e divertida.

À Universidade Federal de Alfenas e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos e experiências.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pela enorme competência, pelos conhecimentos transmitidos a mim, por ser um exemplo de dedicação ao ensino e ética no trabalho, por ter sido papel essencial no meu crescimento profissional e pela enorme paciência e atenção com que me acolheu.

Ao Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias pelo conhecimento compartilhado e por auxiliar na minha formação pessoal e profissional com tanta gentileza.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Vacinas, pelos erros e acertos, momentos de risada e descontração que tornaram toda a minha estadia no laboratório em momentos inesquecíveis. Em especial à Isabella, Fernanda, Ezequiel, Stella, Camila e Gabriel, a dedicação de vocês foi essencial para realização e sucesso deste trabalho.

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

Aos meus grandes companheiros de Alfenas, Julian, Beatriz e Isabella por todo carinho e ajuda durante este tempo em que estive com vocês!

A todos que contribuíram de alguma forma com o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A dengue é uma doença viral, sistêmica, considerada endêmica em mais de 128 países, com cerca de 3,9 bilhões de pessoas no mundo vivendo em áreas de risco de infecção. O vírus da dengue é transmitido para humanos através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes* infectadas. DENV é um vírus de RNA com polaridade positiva pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. O desenvolvimento de uma vacina que confira imunidade de forma segura e eficiente, contra os quatro sorotipos do DENV é considerado prioritário. A proteína NS1, conservada entre sorotipos do DENV (1-4), está relacionada a processos imunopatológicos observados nas formas mais graves da dengue, sendo responsável pela indução da produção de citocinas inflamatórias e aumento da permeabilidade endotelial via ativação de receptores do tipo Toll 4. Pesquisas sugerem o uso da NS1 como candidato vacinal contra dengue, uma vez que a vacinação com NS1 recombinante foi capaz de proteger camundongos contra doses letais de sorotipos homólogos e heterólogos do DENV. Estudos preliminares do nosso grupo mostram que nanopartículas de albumina sérica bovina (NPBSA) são promissores sistemas vacinais de entrega de antígenos do DENV e outros antígenos microbianos, pois possuem, provavelmente, uma atividade adjuvante. Assim, este estudo teve como objetivo verificar o potencial adjuvante das NPBSA em induzir a produção de anticorpos anti-NS1 em camundongos. Os resultados obtidos indicam que as NPBSA não apresentaram citotoxicidade significativa em culturas de células macrofágicas RAW 264.7 e células fibroblásticas BHK-21, porém, as NPS foram capturadas mais facilmente pelas células RAW 264.7 do que por células BHK-21. A NS1 do DENV-1 foi expressa em sistema procaríoto e depois utilizada como antígeno. A administração subcutânea das NPs em camundongos na presença ou ausência da proteína NS1 foi capaz de induzir o recrutamento de um infiltrado inflamatório nos locais onde a mesma foi aplicada. Após a imunização, foi observado que as NPBSA foram capazes de induzir a produção de anticorpos IgM anti-NS1 em 60% dos animais imunizados e IgG anti-NS1 em 80%. Estes dados podem estar relacionados com o perfil adjuvante das NPs, que ao serem administradas associados a NS1, foram capazes de induzir uma troca de classe mais rápida, levando à produção de plasmócitos secretores de IgG. Estudos futuros serão realizados para verificar se os anticorpos produzidos são capazes de inibir a ligação da NS1 ao receptor Toll 4 e diminuir assim, a produção de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma.

Palavras-chave: NS1. Nanopartículas. Dengue. Vacina.

ABSTRACT

Dengue fever is a viral, systemic disease, considering endemic in more than 128 countries, with about 3.9 billion people worldwide living in infection risk area. *Dengue virus* is transmitted to humans through the bite of infected female mosquitoes of the genus *Aedes*. DENV is a RNA virus with positive polarity belonging to the *Flaviviridae* family, Flavivirus genus. The development of a vaccine conferring immunity, safely and efficiently against all four serotypes of DENV is considered priority. The NS1 is a protein conserved among the serotypes of DENV (1-4) and it is related to the immunopathological process observed in the most severe forms of dengue, including the induction of inflammatory cytokine production and increased endothelial permeability via activation of Toll-like receptors 4. Researches suggest the use of NS1 as a vaccine candidate against dengue fever, since vaccination with recombinant NS1 was able to protect mice against lethal doses of homologous and heterologous serotypes of DENV. Studies in our group have shown that bovine serum albumin nanoparticles (NPBSA) are promising vaccine systems for delivery antigen of DENV and other microbial antigens as likely to have adjuvant activity. This study aimed to verify the adjuvant potential of bovine albumin nanoparticles to induce an immune response in the presence of the NS1 protein of DENV-1. The results indicate that albumin NPs did not show significant cytotoxicity in cultures of macrophagic RAW 264.7 and BHK-21 fibroblast cells, however, the nanoparticles are captured more easily by RAW 264.7 cells than for BHK-21 cells. NS1 of DENV-1 was expressed in prokaryotic system and then used as antigen. Subcutaneous administration of the NPs in mice in the presence or absence of the NS1 protein was able to induce the recruitment of an inflammatory infiltrate at the sites where it was applied. Following immunization, it was observed that NPBSA were able to induce production of anti-NS1 IgM antibodies in 60% of the immunized animals and anti-NS1 IgG in 80%, these data may be related to the adjuvant profile of NP, which when administered associated with NS1, were able to induce a faster class exchange, leading to the production of IgG secreting plasmocytes. Future studies will be carried out to verify if the antibodies produced are able to inhibit the binding of NS1 to TLR-4 receptor and thereby decrease the production of proinflammatory cytokines, responsible for increased vascular permeability and extravasation of plasma.

Key words: NS1. Nanoparticles. Dengue fever. Vaccination

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Prevalência da Dengue no mundo	17
Figura 02 -	Aumento da infecção viral Mediada por Anticorpos.....	22
Figura 03 -	Representação da partícula viral e genoma do <i>Dengue vírus</i>	24
Figura 04 -	Representação da estrutura tridimensional da partícula viral e da estrutura homodimérica da proteína E do <i>Dengue vírus</i>	26
Figura 05 -	Representação estrutural das principais proteínas do <i>Dengue vírus</i>	28
Figura 06 -	Representação esquemática do ciclo de multiplicação do <i>Dengue vírus</i>	30
Figura 07 -	Candidatos vacinais contra a dengue.....	34
Figura 08 -	Plasmídeo de expressão de proteínas pQE-30.....	49
Figura 09 -	Microscopia de Força Atômica de Nanopartículas de albumina sérica bovina.....	56
Figura 10 -	Análise da citotoxicidade de NP de BSA: Citotoxicidade em células RAW 264.7; Citotoxicidade em células BHK-21.....	57
Figura 11 -	Taxa de captura de nanopartículas.....	58
Figura 12 -	Análise da captura de nanopartículas.....	59
Figura 13 -	Amplificação da região codificadora da proteína NS1 de DENV-1.....	60
Figura 14 -	PCR para confirmação da presença de plasmídeo NS1/pQE- 30 e Dupla digestão com as enzimas de restrição <i>BamHI</i> e <i>HindIII</i>	61
Figura 15 -	Sequenciamento do gene da NS1 do <i>Dengue vírus</i>	62
Figura 16 -	Expressão da proteína NS1 a partir de indução com IPTG.....	63
Figura 17 -	Purificação da proteína recombinante NS1 em coluna de Quelato de Níquel.....	64
Figura 18 -	Análise do efeito da administração de nanopartículas de BSA na pele de camundongos <i>Swiss</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Nova Classificação dos casos de Dengue, Brasil 2014.....	20
Tabela 02 -	Caracterização das Nanopartículas de Albumina Sérica Bovina.....	55
Tabela 03 -	Produção de anticorpos IgG e IgM anti-NS1 após imunização com NS1 recombinante na presença ou ausência de NS1.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	- Aumento da Infecção Mediada por Anticorpos
AnfB	- Anfotericina B
ANVISA	- Agência de Vigilância Sanitária
APC	- Célula Apresentadora de Antígeno
BCA	- Ácido Bicinconínico
BHK-21	- Linhagem Celular de Fibroblastos de rim de Hamster Chinês
BNP	- Nanopartícula Biodegradável
BSA	- Albumina Sérica Bovina
CDC	- Agência de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	- DNA complementar
CLR	- Receptor de lectina tipo C
cm	- Centímetros
D	- Domínio
DC	- Célula Dendrítica
DCSA	- Dengue com Sinais de Alarme
DENV	- Dengue vírus
DG	- Dengue Grave
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxirribonucleotídeo
DO	- Densidade Óptica
DPIV	- Vacina da dengue tetravalente inativada e purificada
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
ELISA	- Ensaio da Imunoadsorção Enzimática
Fc γ R	- Receptor para Imunoglobulina do tipo G
FD	- Febre do Dengue
FHD	- Febre Hemorrágica do Dengue
FITC	- Isotiocianato de Fluoresceína
IFN	- Interferon
His	- Histidina
HSA	- Albumina Sérica Humana

IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IL	- Interleucina
IPTG	- β -D-tiogalactosídeo
kDa	- Kilodalton
LB	- Caldo Luria Bertani
LPS	- Lipopolissacarídeo
TLR	- Receptor do tipo Toll (Toll like Receptor)
M	- Molar
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	- Microlitro
mg	- Miligrama
mM	- Milimolar
mmHg	- Milímetro de mercúrio
mRNA	- Ácido Ribonucleico mensageiro
ng	- Nanograma
NIH	- Institutos Nacionais da Saúde
nm	- Nanômetro
NP	- Nanopartícula
NS	- Não Estrutural
NTPase	- Nucleosídeo Trifosfatase
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PAHO	- Organização Pan Americana de Saúde
PAMP	- Padrão Molecular Associado ao Patógeno
pb	- Pares de Base
PBS	- Tampão Fosfato Salina
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- Potencial Hidrogeniônico
prM	- Glicoproteína Precursora de Membrana
Proteína C	- Proteína do Capsídeo
Proteína E	- Proteína do Envelope
Proteína M	- Proteína de Membrana
PRRs	- Receptores de Reconhecimento Padrão
P/E	- Penicilina/Estreptomicina

Rab	- Proteína Rab GTPase
RAW 264.7	- Linhagem Celular de Macrófagos Murino
RBS	- Sítio de ligação ao ribossomo
RE	- Retículo Endoplasmático
RdRp	- RNA-dependente de RNA polimerase
RNA	- Ácido Ribonucleico
rpm	- Rotações por minuto
RT	- Transcrição Reversa
SCD	- Síndrome do Choque do Dengue
SFB	- Soro Fetal Bovino
sNS1	- Proteína Não Estrutural 1 secretada
STAT	- Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TBE	- Tampão Tris/Borato/EDTA
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
U	- Unidade
v/v	- Volume a Volume
WRAIR	- Instituto Walter Reed de Pesquisa do Exército dos Estados Unidos
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
µM	- Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Epidemiologia da Dengue	17
2.2	Manifestações Clínicas, Patogênese e Resposta Imune	19
2.3	<i>Dengue vírus</i>	23
2.4	Ciclo de Multiplicação	28
2.5	Vacinas para Dengue	30
2.6	Nanopartículas	35
2.6.1	<i>Nanopartículas Adjuvantes</i>	35
2.6.2	<i>Nanopartículas e Resposta Imune</i>	37
2.6.3	<i>Nanopartículas de Albumina Sérica</i>	40
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos Específicos	43
4	METODOLOGIA	44
4.1	Preparação das nanopartículas de albumina sérica bovina	44
4.2	Caracterização das Nanopartículas	44
4.3	Nanopartículas Fluorescentes	45
4.4	Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas em células RAW 264.7 e BHK 21	45
4.5	Avaliação da taxa de captura em células RAW 264.7 e captura em células BHK-21	46
4.6	Multiplicação e Titulação de <i>Dengue vírus 1</i> (DENV-1)	46
4.7	Extração de RNA viral	47
4.8	Amplificação da região codificadora de NS1	47
4.9	Clonagem do fragmento de NS1 ao vetor de expressão pQE-30	48
4.10	Transformação bacteriana	49
4.11	Seleção de clones recombinantes por PCR	50
4.12	Extração de DNA plasmidial	50
4.13	Sequenciamento dos Plasmídeos Recombinantes	51

4.14	Expressão e purificação da proteína NS1 recombinante em <i>E. coli</i> M15	51
4.15	Histopatologia da Pele	52
4.16	Imunização	53
4.17	Ensaio da Imunoadsorção Enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-NS1	53
4.18	Análise estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Produção e caracterização das Nanopartículas de Albumina Sérica Bovina	55
5.2	Amplificação, clonagem e expressão do gene da proteína NS1 em plasmídeo pQE-30	60
5.3	Histopatologia da Pele após a imunização com as NPs	64
5.4	Avaliação da produção de anticorpos IgG total e IgM anti-NS1 em camundongos imunizados	66
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO	85

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença sistêmica, autolimitada que é causada pelo vírus da dengue (DENV). O DENV é transmitido através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes* infectadas. A doença é considerada endêmica em mais de 128 países, com aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas vivendo em área de risco de infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Em 2013, estimou-se que cerca de 390 milhões de pessoas foram infectadas, com 96 milhões de casos sintomáticos em todo o mundo, três vezes mais do que a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2012 (BHATT et al., 2013).

No Brasil, os números de casos de dengue vêm crescendo a cada ano. Em 2014, foram reportados ao Ministério da Saúde 591.080 casos da doença, uma incidência de 291,5/100.000 habitantes e 410 mortes. Em 2015 foram 1.481 casos de dengue grave e 19.449 casos de dengue com sinais de alarme. De acordo com o boletim epidemiológico nº 33, volume 47, publicado em agosto de 2016 pelo Ministério da Saúde, foram registrados em 2016 1.426,005 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica 32 (3/1/2016 a 17/09/2016). Entre os casos da doença, foram confirmados 762 casos de dengue grave e 7.449 casos de dengue com sinais de alarme. Foram confirmados 563 óbitos por dengue, o que representa uma redução de 32,4% em comparação com o mesmo período de 2015, quando foram confirmados 814 óbitos no país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O *Dengue vírus* (DENV) é um vírus de RNA com polaridade positiva (RNA+) pertencente à Família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Atualmente são descritos quatro sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) que são geneticamente e antigenicamente distintos (CLYDE et al., 2006; CHAWLA et al., 2014). Recentemente foi relatada a existência de um quinto sorotipo denominado DENV-5, que circula entre primatas não humanos (NORMILE, 2013). Depois de um período de 4-8 dias de incubação após a infecção, a dengue pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo a maioria dos casos assintomáticos. Quando sintomática, a doença é classificada em Febre Indiferenciada, Febre do Dengue (FD), Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) ou o caso mais grave, a Síndrome do Choque do Dengue (SCD) caracterizada principalmente pelo extravasamento de plasma (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). Apesar desta

classificação ainda ser utilizada, em 2009 a OMS lançou uma nova classificação dos estágios da dengue sendo elas, Dengue com ou sem sintomas de alarme e Dengue severa (GUZMAN & HARRIS, 2015).

Embora haja um grande esforço por parte dos governos e das populações para se combater os vetores da dengue, a vacinação tem sido a estratégia mais desejada para o controle da propagação do DENV. Contudo, hoje mesmo com anos de pesquisa e algumas vacinas em teste, ainda se busca uma candidata que seja segura, eficiente e que seja acessível à toda população.

A NS1 é uma proteína não estrutural que se encontra conservada entre os quatro sorotipos do DENV (1-4) e está relacionada a várias respostas imunológicas no hospedeiro infectado, incluindo produção de citocinas inflamatórias e aumento da permeabilidade endotelial via ativação de receptores do tipo Toll 4 (TLR4), eventos estes que são relacionados aos casos mais graves da doença (MODHIRAN et al., 2015). Trabalhos recentes apontam o uso da NS1 do DENV como um candidato a imunógeno para produção de vacinas contra a dengue, pois a vacinação com NS1 recombinante foi capaz de proteger camundongos contra doses letais de sorotipos homólogos e heterólogos do DENV (OROZCO et al., 2012). Estudos mostram que a vacinação com NS1 protege contra o extravasamento vascular induzido por DENV em camundongos e que a administração passiva de soro anti-NS1 ou anticorpos anti-NS1 podem prevenir o extravasamento vascular mediado por NS1 tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BEATTY et al., 2015).

Nanopartículas têm sido frequentemente usadas como carreadores ou como adjuvantes vacinais, pois, além de proteger o imunógeno contra degradação, aumenta sua absorção facilitando a difusão através do epitélio, modificando a cinética e aumentando a penetração e distribuição intracelular amplificando, acelerando ou melhorando a resposta imune. Nanopartículas construídas com albumina apresentam vantagens por serem biodegradáveis, fáceis de preparar, reproduzíveis e bem toleradas, principalmente pelo fato da matriz da albumina ser capaz de incorporar vários tipos de compostos (ELZOGHBY, 2012; SILVA et al., 2012). Assim, neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito adjuvante de nanopartículas de albumina sérica bovina em induzir produção de anticorpos anti-NS1 em camundongos Swiss utilizando como antígeno a proteína NS1 recombinante, uma vez que esta proteína está relacionada com os efeitos mais graves da doença, como extravasamento de plasma celular e produção de citocinas vasoativas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia da Dengue

A dengue é uma arbovirose sistêmica, autolimitada, causada pelo vírus da dengue (DENV), transmitido através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados. A dengue é considerada endêmica em mais de 128 países (Figura 1), com aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas vivendo em área de risco de infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Em 2013, estimou-se que cerca de 390 milhões de pessoas foram infectadas, com 96 milhões de casos sintomáticos por todo o mundo, três vezes mais do que a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2012 (BHATT et al., 2013).

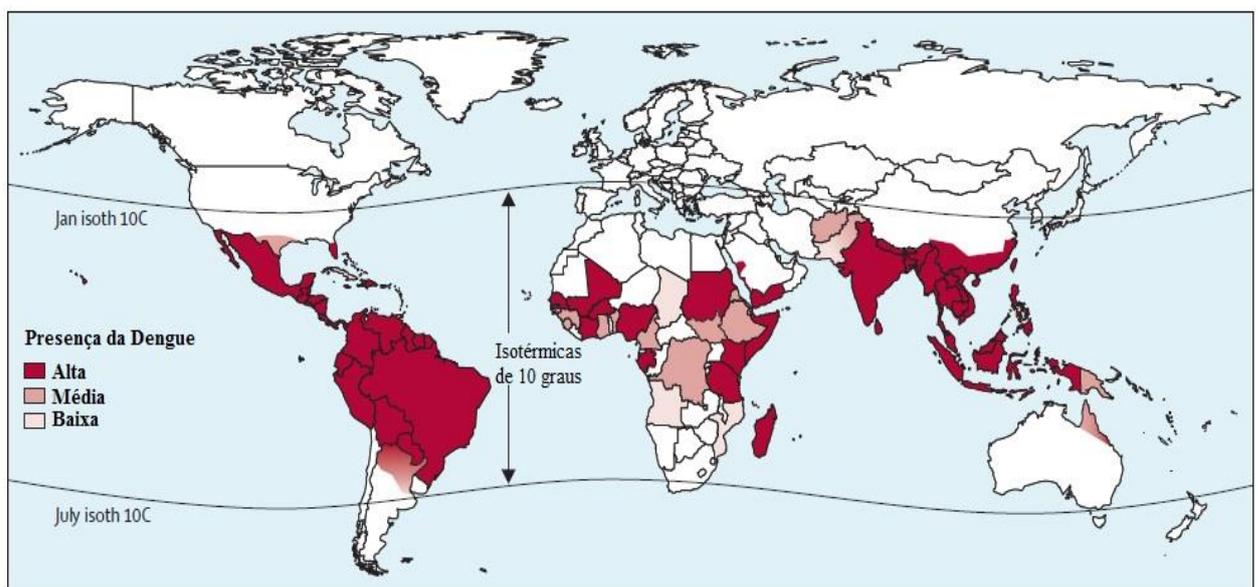


Figura 1 - Prevalência da Dengue no mundo.

Fonte: Adaptado de GUZMAN; HARRIS (2015, p. 454).

No Brasil, os casos de dengue vêm aumentando a cada ano. Considerado um país de clima tropical devido ao seu clima quente e úmido, o país propicia condições extremamente favoráveis para o desenvolvimento, sobrevivência e proliferação do vetor da doença (TEIXEIRA et al., 2013). No país, a dengue está presente desde 1845, quando houve o primeiro relato de epidemia no estado do Rio de Janeiro. Posteriormente outras epidemias

foram registradas até que em meados de 1970 a Organização Pan Americana da Saúde (PAHO) iniciou um programa de erradicação do mosquito *Aedes sp.* para prevenir a febre amarela, mesmo vetor da dengue, mantendo o país livre de relatos da doença até 1981. A partir desta data ocorreu a reinfestação do mosquito e ocorrência de epidemia no estado de Roraima pelos sorotipos 1 e 4, que não estabeleceram circulação. O sorotipo 2 se espalhou pelo Brasil após sua primeira identificação em 1990 no Rio de Janeiro, onde os primeiros casos de Síndrome Hemorrágica do Dengue foram documentados e as primeiras mortes registradas (FARES et al., 2015; PAHO, 2014). Desde então, os números de casos de dengue vêm crescendo a cada ano, sendo que entre 1981 e 2006 foram reportados no país 4.243,049 casos de dengue, incluindo 5.817 casos de SCD e 338 mortes. Em 2014, foram reportados ao Ministério da Saúde 591.080 casos da doença, uma incidência de 291,5/100,000 habitantes e 410 mortes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

De acordo com o boletim epidemiológico nº 3, volume 47, publicado em janeiro de 2016 pelo Ministério da Saúde, foram registrados em 2015 1.649.008 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica 52 (04/01/2015 a 02/01/2016). Destes casos reportados, 1.026,226 foram da região sudeste (62,2%), seguidas das regiões Nordeste com 311.519 casos (18,9%), Centro Oeste com 220.966 casos (13,4%), Sul com 56.187 casos (3,4%) e Norte com 34.110 casos (2,1%). Entre os casos graves, foram confirmados 1.569 casos de dengue grave e 20.329 casos de dengue com sinais de alarme. Foram confirmados 863 óbitos por dengue, o que representa um aumento de 82,5% em comparação com o mesmo período de 2014, quando foram confirmados 473 óbitos no país. . Em 2015, foram 1.481 casos de dengue grave e 19.449 casos de dengue com sinais de alarme. De acordo com o boletim epidemiológico nº 34, volume 47, publicado em agosto de 2016 pelo Ministério da Saúde, foram registrados em 2016 1.438,624 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica 37 (3/1/2016 a 17/09/2016). Entre os casos graves, foram confirmados 762 casos de dengue grave e 7.449 casos de dengue com sinais de alarme. Foram confirmados 563 óbitos por dengue, o que representa uma redução de 32,4% em comparação com o mesmo período de 2015, quando foram confirmados 814 óbitos no país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

2.2 Manifestações Clínicas, Patogênese e Resposta Imune

A dengue possui um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo a maioria dos casos assintomáticos. Com um tempo de incubação de 4 a 8 dias, a dengue é uma doença autolimitada, portanto, nos casos mais brandos, descanso e reidratação são suficientes para que o paciente se recupere, porém, ela pode progredir para casos mais graves. Se não tratada corretamente, a mortalidade da dengue pode chegar a 20%, embora, com o tratamento adequado, este número possa cair para menos de 1% de mortalidade (GUZMAN; HARRIS, 2015). Quando sintomática, a doença é classificada em Febre Indiferenciada, Febre do Dengue (FD), Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) e o caso mais grave, a Síndrome do Choque do Dengue (SCD) caracterizada principalmente pelo extravasamento de plasma. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). Apesar desta classificação ainda ser usada, em 2009 a OMS lançou uma nova classificação dos estágios da dengue, sendo esta nova classificação adotada pelo Ministério da Saúde no Brasil, são elas: Dengue Provável, Dengue com Sinais de Alarme (DCSA) e Dengue Grave (DG).

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

Dengue Provável

Em casos de indivíduos que vivem ou tenham viajado para área endêmica, e apresentem duas ou mais das seguintes manifestações:

- **Náuseas e vômitos;**
- **Exantema;**
- **Mialgias, artralgias;**
- **Cefaléia, dor retroorbital;**
- **Petéquias ou prova do laço positiva;**
- **Leucopenia.**

Dengue com Sinais de Alarme

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

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

Dengue Grave

São todos os casos de dengue que apresentam um ou mais dos seguintes resultados:

- **Choque, extremidades frias;**
- **Pulso débil ou indetectável, pressão diferencial convergente ≤ 20 mmHg;**
- **Hipotensão arterial;**
- **Acúmulo de líquidos com insuficiência respiratória;**
- **Sangramento grave, segundo a avaliação do médico;**
- **Comprometimento grave de órgãos, tais como: dano hepático importante (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase > 1000), sistema nervoso central (alteração da consciência), coração (miocardite) ou outros órgãos.**

As diversas manifestações clínicas da doença podem estar relacionadas com as características do próprio vírus, diferenças genéticas entre cada sorotipo, à carga viral e a fatores relacionados ao hospedeiro como idade, estado nutricional, características imunológicas e genéticas (PAWITAN et al., 2011). Embora não seja possível estabelecer uma correlação entre um sorotipo ou um genótipo particular do DENV e a severidade da doença, alguns estudos indicam que certos genótipos de DENV 2 e DENV 3 estão associados com FHD. No geral, genótipos asiáticos aparentam ser mais virulentos do que aqueles inicialmente encontrados nas Américas e no Pacífico Sul. No caso do sorotipo 2 (DENV 2), análises filogenéticas mostraram em 2006, que genótipos nativos da América estão associados à FD enquanto que os genótipos asiáticos estão associados à FHD (CLYDE et al., 2006). Estas análises demonstram que, apesar de características semelhantes, as manifestações da doença podem variar consideravelmente.

A primeira linha de defesa após a infecção por DENV é a produção de Interferons do tipo I (IFNs) pelas células dendríticas plasmocitóides (DCP). As DCP, e outras células infectadas produzem os dois tipos I (α e β) de IFNs durante a infecção, sendo estes, considerados cruciais na proteção contra a infecção por DENV *in vitro* e *in vivo*. A produção de IFNs é iniciada após a interação do vírus com receptores de lectina tipo C denominados de DC-SIGN e receptores semelhantes a Toll (Toll like receptors – TLR) expressos nas células mielóides (RODENHUIS-ZYBERT, 2010).

Diversos mecanismos têm sido estudados a fim de se entender a patogênese e as respostas imunológicas desenvolvidas após uma infecção por DENV, principalmente nos casos de FHD/SCD. A infecção primária pelo DENV fornece imunidade adquirida prolongada contra os sorotipos da primeira infecção e uma proteção cruzada temporária contra sorotipos heterólogos à infecção primária. Estudos epidemiológicos demonstram que, infecções secundárias por um sorotipo heterólogo ocorrem frequentemente em áreas endêmicas, e é a principal causa de fator de risco para casos graves da doença (CLYDE et al., 2006; HALSTEAD, 2007). Embora, mesmo após infecções secundárias, a dengue grave ainda é rara, com uma taxa de 0.5% -1% de evolução de Febre branda para FHD e SCD (DIAMOND; PIERSON, 2015).

O mecanismo pelo qual uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo de DENV pode levar ao desenvolvimento de FHD e SCD pode ser explicado pela hipótese do aumento da infecção mediada por anticorpos (ADE - Figura 2). Este mecanismo ocorre devido à

presença de anticorpos não neutralizantes que se ligam às partículas virais e favorecem a infecção de células que possuem receptor para imunoglobulina do tipo Fc γ RII. Estudos mostram que a ligação cruzada de complexos imunes de IgG com receptores Fc γ aumentam a infecção intracelular acarretando 100 vezes mais produção viral, assim, contribuindo para a severidade da doença por um mecanismo intrínseco (iADE) (DIAMOND; PIERSON, 2015; HALSTEAD, 2014). A presença de casos descritos de FHD/SCD em crianças que nasceram de mães com anticorpos para a dengue confirma esta hipótese (GUZMAN; HARRIS, 2015; MURPHY; WHITEHEAD, 2011).

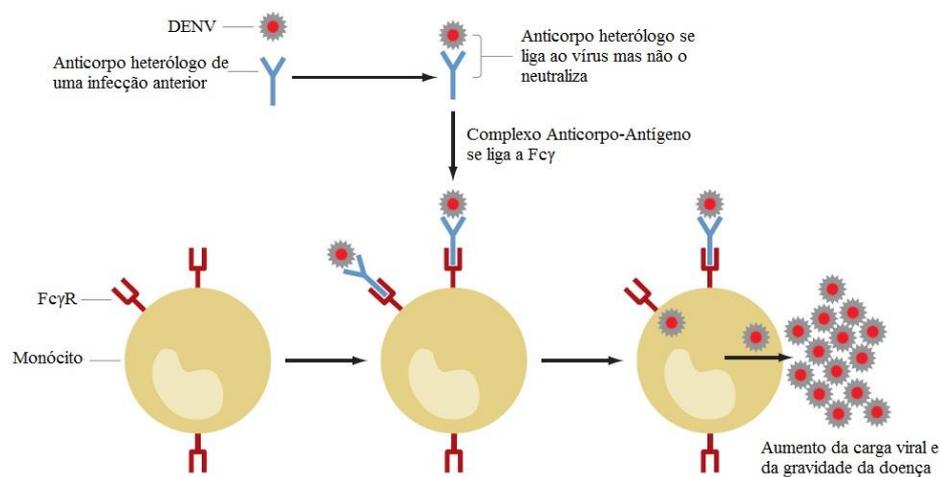


Figura 2 - **Aumento da infecção Mediada por Anticorpos:** Figura esquemática demonstrando o mecanismo de aumento da carga viral através da hipótese de Aumento da infecção Mediada por Anticorpos.

Fonte: Adaptado de MURPHY e WHITEHEAD (2011, p. 600).

Outros trabalhos apontam que a patogênese de FHD/SCD pode estar associada à ativação de células T que apresentam um fenótipo anormal de produção de citocinas. De acordo com estes estudos, em uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo, ocorre uma ativação preferencial de linfócitos TCD4 e TDC8 de memória, produzidos na infecção anterior, levando a uma resposta imune ineficaz caracterizada pela presença de linfócitos TCD8 com degranulação subótima e alta produção de citocinas vasoativas como IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral). As citocinas derivadas de células T possuem um efeito pleitrópico, incluindo a indução ou o aumento da inflamação e alteração da permeabilidade vascular, sendo diretamente relacionado com aumento da gravidade da doença (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; ROTHMAN, 2011).

2.3 *Dengue vírus*

O *Dengue vírus* (DENV) é considerado atualmente um arbovírus de transmissão rápida e ampla. O DENV é um vírus constituído por RNA de fita simples com polaridade positiva que pertence a família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus* e são conhecidos, até o momento, quatro diferentes sorotipos do vírus (DENV -1, -2, -3 e -4), os quais são antigenicamente e geneticamente distintos, possuindo uma identidade genética na sequência de aminoácidos limitada de aproximadamente 60% - 75% (CLYDE et al., 2006; GUZMAN; HARRIS, 2015). Foi observado que entre os sorotipos 1 e 4 há uma similaridade na sequência gênica de 73%, entre os sorotipos 3 e 4 uma similaridade de 54%, enquanto que o sorotipo 2 é consideravelmente distinto dos outros 3 sorotipos (BLOK, 1985; RAMAKRISHNAN et al., 2015). Embora, recentemente tenha sido relatada a existência de um quinto sorotipo, denominado DENV-5, a circulação deste é selvagem e acomete apenas primatas não humanos (CHAWLA et al., 2014; NORMILE, 2013).

O DENV é uma partícula envelopada, com diâmetro aproximado de 50 nanômetros (nm) e que apresenta uma simetria icosaédrica e um nucleocapsídeo esférico (Figura 3A) (RODENHUIS-ZYBERT, 2010). Seu genoma codifica uma única poliproteína que ao ser clivada, e co-traduzida, dá origem a três proteínas estruturais, a proteína do capsídeo (C), proteína de membrana (M) e proteína do envelope (E), e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Figura 3B). Embora, as funções específicas de algumas proteínas do DENV ainda não tenham sido esclarecidas, trabalhos recentes indicam que elas vão além da síntese do mRNA viral, como também desempenham papel importante na organização da partícula viral e nas modulações das respostas imunológicas do hospedeiro (CLYDE et al, 2006).

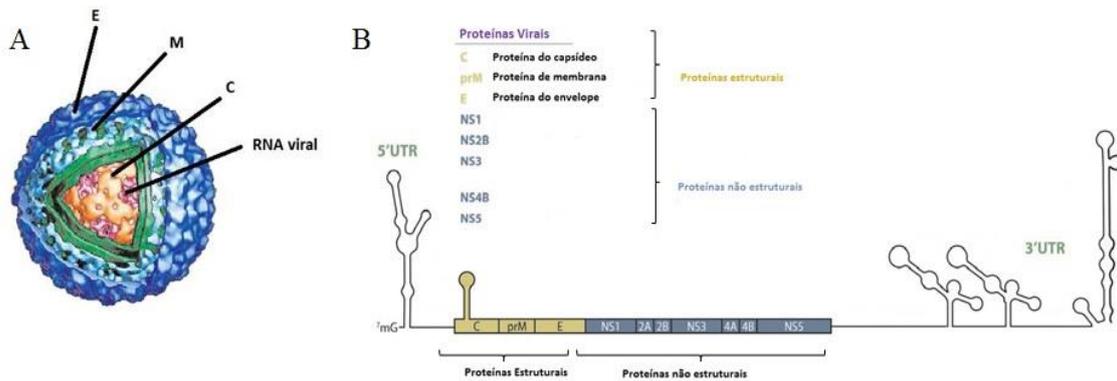


Figura 3 - **Representação da partícula viral e genoma do Dengue vírus.** **A:** Representação esquemática da partícula viral do DENV, apresentando as proteínas estruturais do Envelope (E), da Membrana (M), do Capsídeo (C) e o RNA genômico no interior do nucleocapsídeo esférico. **B:** Genoma do DENV, demonstrando os genes que codificam as proteínas estruturais (C, prM e E) e as proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5).

Fonte: Adaptado de CLYDE et al. (2006, p. 11420); DEL ANGEL e VALLE (2013, p.2)

Múltiplas cópias da proteína do capsídeo C (11 kDa – Kilodalton), participam da formação de um complexo ribonucleoprotéico que encapsulam o RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral. A associação do nucleocapsídeo com a membrana plasmática do hospedeiro se deve ao caráter básico da proteína C, que possui resíduos carregados encontrados nas extremidades Amino e Carboxi terminais, os quais se encontram separados por uma região hidrofóbica (LINDENBACH; RICE, 2003; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

A glicoproteína precursora de membrana (prM), com tamanho aproximado de 26 kDa é a precursora da proteína de membrana M (8 kDa). O processamento da prM ocorre na maturação dos vírions, durante a passagem deste pela via secretora do Retículo Endoplasmático do hospedeiro. O pH levemente ácido (5,8 – 6,0) da rede “trans” do Complexo de Golgi provoca a dissociação dos heterodímeros prM/E, que leva à formação de dímeros que se encontram na superfície da partícula. Essa reorganização das proteínas permite que proteases como a furina clivem prM dando origem aos peptídeos “pr” e à proteína de membrana M. O segmento “pr” permanece associado ao virion até que este seja liberado da célula infectada, sendo o vírus a partir deste momento, considerado maduro (LINDENBACH; RICE, 2003; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010). Trabalhos indicam que a prM protege a proteína E de uma reorganização induzida pela mudança de pH e de uma fusão prematura

durante a secreção, possivelmente funcionando como uma chaperona para a correta montagem e dobramento da partícula durante a replicação viral (CLYDE et al, 2006).

Com cerca de 53 kDa, a proteína do envelope E está envolvida principalmente na adesão e fusão do vírus na célula hospedeira. Sua estrutura tridimensional (Figura 4) é formada por um complexo homodimérico, subdividida em três domínios: domínio I (DI), está localizado centralmente e forma uma estrutura que modula as mudanças conformacionais geradas por alterações no pH. O domínio II (DII) contém a região de dimerização formada por uma alça altamente conservada que funciona como um peptídeo de fusão interno que é responsável pela fusão do envelope viral à membrana endossomal, além de conter a maior parte dos epítopos com reatividade cruzada de grupos e subgrupos de Flavivírus. O domínio III (DIII), é chamado de domínio “immunoglobulin-like”, desempenhando um papel importante na ligação dos receptores celulares, como também, é responsável pela indução de elevados títulos de anticorpos neutralizantes específicos anti-DENV (CHAWLA et al., 2014; CLYDE et al, 2006; LINDENBACH; RICE, 2003; REY et al., 1995).

As proteínas não estruturais do DENV coordenam aspectos intracelulares da replicação viral, como a montagem do vírus e a modulação da resposta imune do hospedeiro. A NS1 é uma proteína conservada do DENV, com aproximadamente 46-55 kDa. Esta proteína é inicialmente traduzida como um monômero que é glicosilado no retículo endoplasmático (RE) e posteriormente forma um dímero que pode ter quatro diferentes destinos: a) os dímeros de NS1 podem se associar com o complexo de replicação viral na superfície da membrana do RE; b) associar-se à membrana plasmática das células infectadas através de ligações glicofosfatidilinositol; c) NS1 pode formar um hexâmero solúvel lipofílico que é então, secretado pela célula infectada ou, por fim; d) ligar-se à superfície de células não infectadas através de interações glicosaminoglicanas (APTE-SENGUPTA et al., 2014; BEATTY et al., 2015; EDELING et al., 2014;).

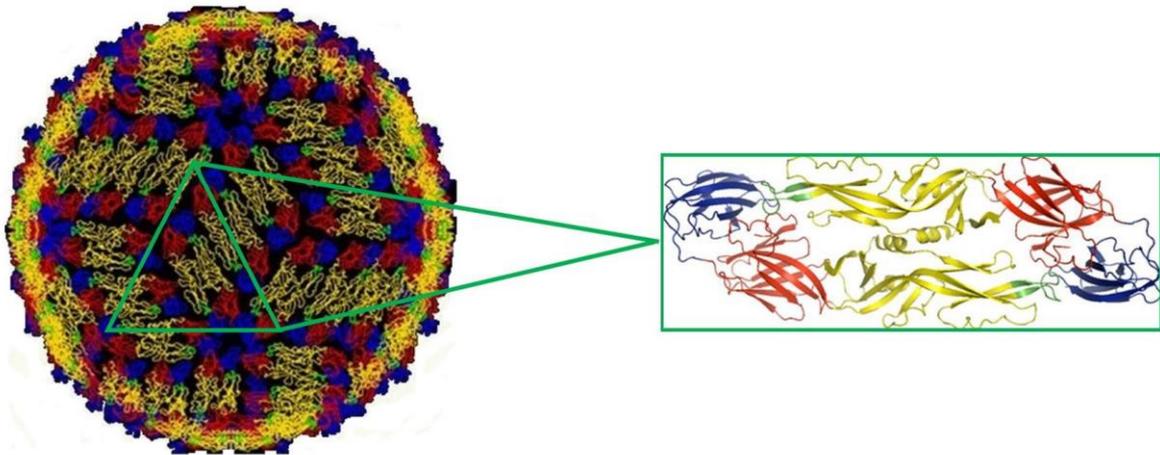


Figura 4 - **Representação da estrutura tridimensional da partícula viral do *Dengue vírus* (DENV – 2). Representação da estrutura homodimérica da proteína E do DENV.** Em vermelho, domínio I, em amarelo, domínio II com a alça de fusão em verde e em azul, domínio III.

Fonte: Adaptado de LINDENBACH; RICE (2003, p.27) e RODENHUIS-ZYBERT et al. (2010, p. 2774).

A NS1 secretada (sNS1) pode ser detectada na corrente sanguínea de pacientes infectados desde os primeiros dias em que os sintomas aparecem e os níveis circulantes aumentam de ng/mL para mg/mL durante a fase aguda da doença. Altos níveis de sNS1 estão associados com o aumento da severidade da doença, embora ainda não esteja claro se esta medida tenha significância nos casos graves da doença, a sua associação a ela tornou a sNS1 um marcador de carga viral nos casos mais severos de dengue, como FHD/SCD (BEATTY et al, 2015; MODHIRAN et al., 2015). A sNS1 desempenha papel importante na patogênese e nas respostas protetora contra o DENV, se ligando a vários componentes do sistema complemento e seus reguladores, assim como, na produção de citocinas chave que desencadeiam uma resposta inflamatória causadora de danos às plaquetas e às células endoteliais pelos anticorpos com reação cruzada e anti-NS1, responsáveis pela desregulação da permeabilidade vascular (ALLONSO et al., 2015; MODHIRAN et al, 2015).

Estudos demonstram que a NS1 induz a produção de citocinas inflamatórias e permeabilidade da monocamada de células endoteliais através da ativação via TLR4 (Toll Like Receptor 4). A sNS1 purificada funciona analogamente à LPS, induzindo a secreção de Interleucina-6 (IL-6) pelas células mononucleares do sangue periférico, sugerindo que a NS1

se comporta como PAMP (Padrão Molecular Associado á Patógenos) (BEATTY et al, 2015; MODHIRAN et al., 2015).

Trabalhos recentes mostram que a vacinação com NS1 e/ou a administração de soro anti-NS1 ou anticorpos anti-NS1 protege contra o extravasamento vascular induzido por DENV em camundongos. Estudos sugerem que anticorpos contra NS1 gerados a partir da vacinação com a própria proteína podem aumentar a depuração do vírus, bem como neutralizar os efeitos vasoativos de NS1, sugerindo esta, como uma candidata a imunógeno para produção de vacinas que impeçam o extravasamento de plasma celular, característico dos casos mais severos da dengue (FH/SCD) (BEATTY et al., 2015).

As proteínas NS3 e NS5 (70 kDa e 103 kDa), possuem suas estruturas e funções bem estudadas e definidas (Figura 5). A NS3 é uma proteína multifuncional que possui um domínio N-terminal (NS3 pro) que tem atividade protease, responsável pelo processamento proteolítico da poliproteína viral, e uma região C-terminal que contém uma RNA-trifosfatase e domínio RNA NTPase que são essenciais para a replicação do RNA. O domínio serina-protease da NS3 tem participação central no ciclo de replicação do DENV. A proteína NS2b (14 kDa) funciona como cofator para a atividade enzimática da proteína NS3, o conjugado NS3/NS2b cliva a poliproteína precursora nas junções NS2a/NS2b, NS2b/NS3, NS3/NS4a e NS4b/NS5, assim como regiões internas em NS2a, NS3 e NS4a (FALGOUT et al., 1991; NATARAJAN, 2010).

A NS5 é a proteína mais conservada entre as não estruturais do DENV, contém domínios metiltransferase e RNA-dependente de RNA polimerase (RdRp), que são essenciais na replicação genômica e no revestimento (“capping”) do RNA viral. Estudos mostram que, a região N-terminal de NS5 é homóloga á S-adenosil metionina metiltransferase dependente (SAM), sugerindo que esta proteína esteja envolvida na formação do cap-5'. Pouco se sabe sobre as funções específicas da proteína NS2a (22 kDa). Com caráter hidrofóbico, ela está envolvida na replicação e na montagem do DENV. Há poucos estudos que demonstrem as funções das proteínas NS4a e NS4b (16 e 27 kDa), embora se tenha conhecimento de que estejam envolvidas no rearranjo da membrana, aumento da replicação viral e modulação da resposta imune no hospedeiro. Estudos sobre mutações em NS4b, sugerem que esta proteína seja essencial na replicação e na patogênese do DENV, como também, tenha a capacidade de bloquear as vias de sinalização de IFN α/β (Interferon), interferindo na atividade do fator de

transcrição STAT1 (Signal Transducers and Activators of Transcription) (LINDENBACH & RICE, 2013 APTE-SENGUPTA et al., 2014; LI et al., 2015).

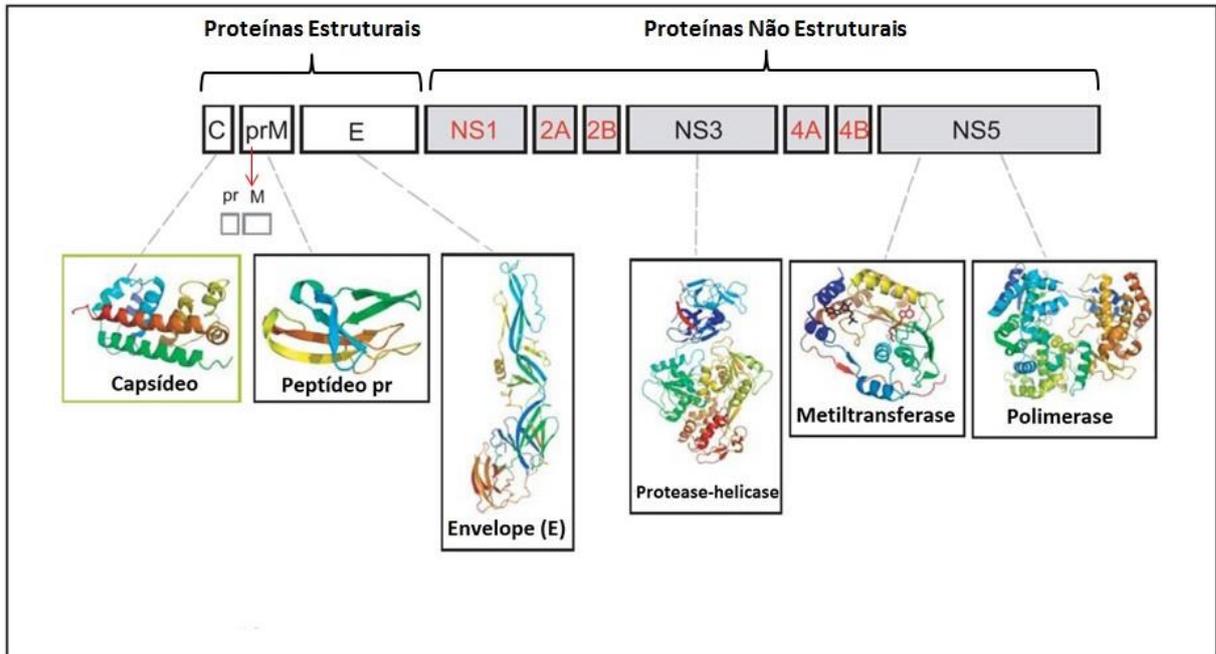


Figura 5 - **Representação estrutural das principais proteínas do *Dengue vírus***. A imagem mostra a estrutura total das proteínas C, prM, E e NS3 e os domínios metiltransferase e polimerase de NS5.

Fonte: Adaptado de PERERA e KUHN (2008, p.370).

2.4 Ciclo de Multiplicação

O ciclo de multiplicação do DENV se inicia quando um hospedeiro humano é inoculado com o vírus através da picada de mosquitos fêmeas de *Aedes sp.* infectadas. Nos mosquitos, DENV é encontrado inicialmente infectando o intestino, de onde então, espalha e se replica em vários órgãos e compartimentos do corpo até finalmente atingir as glândulas salivares (MERCADO-CURIEL et al., 2008)

Em humanos, após a inoculação, os principais alvos para infecção são as células da linhagem fagocíticas mononucleares, como por exemplo, monócitos, macrófagos e células dendríticas, incluindo as células de Langerhans residentes na pele. A associação ocorre com o auxílio da proteína E do DENV e de receptores na célula alvo. Muitos estudos mostram que,

dentre os possíveis receptores celulares que participam da adesão à célula hospedeira são os receptores de lectina tipo C (CLR – C-type lectin), incluindo receptores DC-SIGN [Dendritic cell – specific intracellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)- grabbing non-integrin], receptores de manose, glicoproteínas específicas, como Sulfato de Heparina e receptores de lectina tipo C (CLEC5, MDL-1) (BACK & LUNDKVIST, 2013; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

Após a adesão do vírus à membrana da célula hospedeira, inicia-se o processo de endocitose mediada por receptor (Figura 6), e assim como outros flavivírus, ela ocorre pela formação de vesículas mediadas por clatrina. Após a internalização, a partícula viral é entregue para endossomos imaturos precoces Rab5-positivos, que maturam em endossomos tardios Rab7-positivos, onde ocorre a fusão da membrana. A acidificação das vesículas endossomais ($\text{pH} < 6,5$) induz uma alteração conformacional da proteína E do virion, resultando em uma trimerização irreversível da proteína do envelope. Esta alteração expõe o peptídeo de fusão causando a fusão entre as membranas virais e endossomal, permitindo a liberação do nucleocapsídeo e do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira. O RNA viral é então encaminhado para o retículo endoplasmático (RE), onde é traduzido em uma única poliproteína que é processada em proteínas virais e proteases do hospedeiro. Após a síntese do complexo viral de replicação, se dá início a síntese do RNA através da transcrição da fita anti-senso do RNA viral (CLYDE et al., 2006; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010; SCREATON et al., 2015).

O RNA sintetizado é empacotado pela proteína do capsídeo (C), formando o novo nucleocapsídeo. A montagem do vírus ocorre com o auxílio das proteínas E e prM na superfície do RE, quando o nucleocapsídeo internaliza para o lúmen do RE, dando origem à partículas virais imaturas não infecciosas. Análises estruturais revelam que um único virion contém cerca de 180 heterodímeros prM/E, que são projetados exteriormente na superfície da partícula como 60 estruturas triméricas em forma de espículas. Essa associação trimérica de prM/E, acredita-se, induz modificações que auxiliam no empacotamento do virion. As partículas virais imaturas são transportadas através da via trans-Golgi do Complexo de Golgi, onde acidificações no pH induzem mudanças conformacionais, promovendo o rearranjo das proteínas do envelope. Este rearranjo expõe sítios de clivagem para furina, esta protease cliva a proteína prM em proteína de membrana M e peptídeo pr. O vírus, agora maduro, permanece com o peptídeo pr associado até que a partícula seja liberada da célula hospedeira para

infectar outras células (CLYDE et al., 2006; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010; SCREATON et al., 2015).

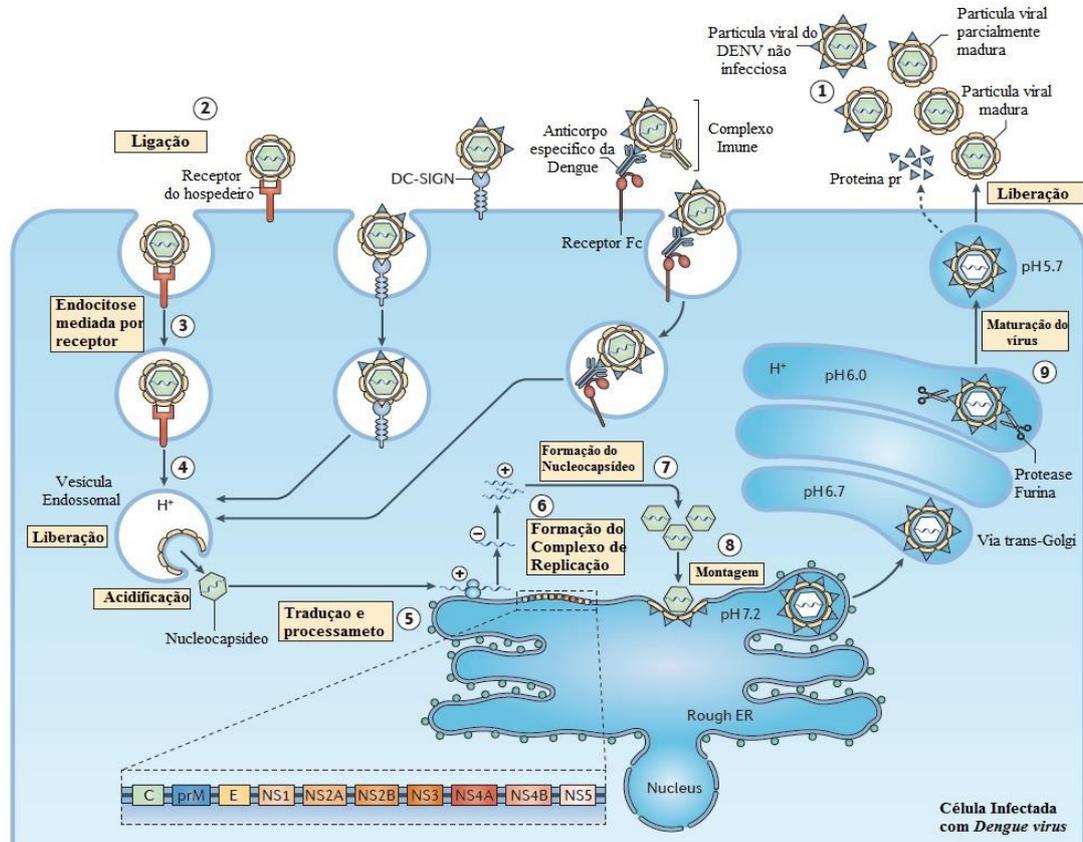


Figura 6 - Representação esquemática do ciclo de multiplicação do *Dengue vírus*.

Fonte: Adaptado de SCREATON et al. (2015, p.747).

2.5 Vacinas para dengue

Embora haja um grande esforço por parte da população e do governo dos países onde a dengue é endêmica, em controlar o vetor da doença, há fatores controversos em relação ao uso de inseticidas para combater o mosquito *Aedes*, uma vez que estes compostos são na sua maioria tóxicos para o homem e para o meio ambiente. Novos produtos estão sendo desenvolvidos para controlar o *A. aegypti*. Óleos essenciais com altos níveis de atividade larvicida também estão sob estudo e alguns resultados mostram que nanopartículas de prata sintetizadas pelo *Bacillus thuringiensis* e *Sida acuta* possam ser utilizadas com segurança

como biopesticidas contra o mosquito (GUZMAN; HARRIS, 2015). O controle dos criadouros de larvas do mosquito, como por exemplo, água parada em vasos, pneus e garrafas, tem sido um dos métodos mais efetivos para se controlar o número do vetor nas áreas urbanas, embora eficiente, esta estratégia demanda grande esforço e conscientização por parte da população e não elimina de fato as chances de uma infecção.

Apesar das estratégias de combate ao vetor ainda se mostrarem de extrema importância, os casos de dengue vêm aumentando a cada ano nas últimas décadas, tornando imprescindível a busca por um método eficiente de combate à doença. Os esforços para o desenvolvimento de vacinas contra dengue foram iniciados há mais de 50 anos, quando apareceram os primeiros casos graves da doença. Uma vacina considerada ideal contra o vírus deverá induzir uma resposta imune durável e protetora contra os quatro sorotipos do DENV, tanto para aqueles indivíduos que não foram expostos ao vírus da dengue quanto para aqueles que foram infectados previamente por um dos sorotipos (GUZMAN; HARRIS, 2015; SCREATON et al., 2015).

Atualmente, existem vários candidatos vacinais em desenvolvimento contra dengue sendo estudados. Vacinas baseadas em vírus atenuados ou inativados, incluindo quimeras com DENV atenuado ou com estruturas do vírus da febre amarela, vacinas com vetores recombinantes, como os usados em adenovírus, vacinas de DNA, vacinas de proteínas do DENV usadas em combinação com adjuvantes e algumas outras tecnologias estão sendo testadas (GUY; JACKSON, 2016; GUZMAN; HARRIS, 2015).

Uma das vacinas que está sendo testada é a TV003 (Figura 7), desenvolvida pelo Centro de Pesquisa Nacional dos Estados Unidos (National Institute of Health – NIH). Esta vacina utiliza quatro candidatos monovalentes com deleção de 30 ou 31 nucleotídeos na região 3' não traduzida dos quatro diferentes sorotipos (3' UTR). Esta modificação genética atenuou a maioria dos sorotipos virais e manteve a sua imunogenicidade para DENV-1, DENV-3 e DENV-4. Já para DENV-2, foi utilizado um vírus quimérico, no qual foi substituída as sequências codificadoras das proteínas prM e E do DENV-4 pelas proteínas de DENV-2. Os quatro candidatos monovalentes foram utilizados para compor uma vacina tetravalente. Diferentes versões de vacinas monovalentes individuais foram testadas em humanos, e na fase I de testes, chegou-se a uma vacina com formulação tetravalente com ótima eficiência. Na fase II de testes, as formulações de TV003 e posteriormente TV005 se mostraram promissoras, com uma imunogenicidade e reatogenicidade satisfatórias

principalmente para TV005, após apenas uma dose da vacina. A tecnologia desenvolvida pelo centro de pesquisa NIH não é exclusiva, sendo licenciada para diferentes países, como o Brasil. O Instituto Butantan, no Brasil, anunciou em 2015, os primeiros testes de eficácia de fase III no país, com voluntários entre 2 a 59 anos de idade que irão receber uma única dose da vacina tetravalente (NCT02406729) (INSTITUTO BUTANTAN, 2013; GUY et al, 2015; SCREATON et al, 2015,).

Outro candidato vacinal que utiliza vírus atenuado, foi desenvolvido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América, que utilizou cepas do sorotipo 2, com passagem primeiramente por células de rim de cachorro (isolado 16681, PDK53). Posteriormente, o mesmo foi desenvolvido pela empresa Invitrogen, Inc (EUA), e atualmente é desenvolvido pela empresa farmacêutica Takeda Pharmaceutical Co., Ltda (Japão) com o nome de DENVax. Três mutações chave estão presentes respectivamente nas regiões 5'UTR e em dois genes não estruturais (NS) do DENV-2 PDK53. Esta cepa poderá posteriormente, funcionar como estrutura para a construção de quimeras dos outros 3 sorotipos, 1, 3 e 4. Assim como no caso anterior, esta vacina em teste apresentou imunogenicidade e segurança satisfatórias na fase I dos testes pré-clínicos. Nos casos das duas vacinas em teste, tanto a desenvolvida pelo NIH como a do CDC induzem resposta contra os antígenos não estruturais do DENV, assim como contra antígenos estruturais (prM/E) (GUY et al, 2015).

Dentre as abordagens conhecidas, porém sem sucesso, é a alternativa desenvolvida pelo Instituto Walter Reed de Pesquisa do Exército dos Estados Unidos (WRAIR) e pela empresa GlaxoSmithKline (DPIV) utilizando os quatro sorotipos do DENV inativados como agentes vacinais. Os estudos para avaliar a imunização com esta vacina inativada demonstraram diversos efeitos colaterais. A ineficácia na fase II de triagem foi caracterizada por um alto efeito colateral quando testados em indivíduos que possuíam anticorpos preexistentes de uma infecção primária com o DENV (SCREATON et al, 2015).

Vacinas de DNA apresentam dificuldade devido à baixa eficiência com o qual o DNA exógeno é capturado pelas células hospedeiras. Desta forma, esta estratégia vem apresentando dificuldades de geração de resposta imune suficiente (RAMAKRISHNAN et al., 2014). O maior risco em se utilizar vacinas que contenham DNA exógeno é deste se integrar ao DNA cromossomal endógeno e inativar genes supressores de tumores e/ou ativar oncogenes (KLINMAN et al., 1997). Uma estratégia seria a criação de vacinas a partir da utilização de

vetores virais. Um trabalho realizado a partir do uso de Adenovírus recombinante carregando sequências das proteínas prM e E do sorotipo 2 do DENV levou a obtenção de resposta humoral e celular após vacinação em modelo animal (HOLMAN et al., 2007; RAMAKRISHNAN et al., 2014).

O candidato vacinal mais promissor atualmente é o CYD-TDV, desenvolvido pela Sanofi Pasteur. Esta vacina consiste em um vírus quimérico desenvolvido a partir da estrutura (“backbone”) de cepas do vírus da febre amarela (YFV17D), com os genes que codificam as proteínas prM/E do YFV17D sendo substituídas pelos genes que codificam estas proteínas em cada sorotipo do DENV. Os testes clínicos iniciais demonstraram respostas sorológicas positivas para a vacina, atingindo 66.5% - 100%. As fases I e II de triagem em indivíduos jovens e adultos indicou que CYD-1-4 (sorotipos 1 a 4) induz resposta neutralizante além de induzir células TCD4 soro específicas anti-dengue e TCD8 NS3-específica anti-YFV17D. Após a fase III de testes realizados na Ásia e na América Latina, observou-se que CYD é segura, tolerável, induz imunogenicidade e é efetiva contra os quatro sorotipos (GUY; JACKSON, 2016). Recentemente (Dezembro, 2015), a vacina foi registrada e licenciada no Brasil pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Com o nome de Dengvaxia®, a vacina apresentou uma eficácia global de 65,5% contra os quatro sorotipos do DENV (58,4% contra o sorotipo 1, 47,1% contra o sorotipo 2, 73,6% contra o sorotipo 3 e de 83,2% contra o sorotipo 4), na população acima de nove anos de idade, sendo aplicada em 3 doses com um intervalo de 6 meses de uma dose para outra (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

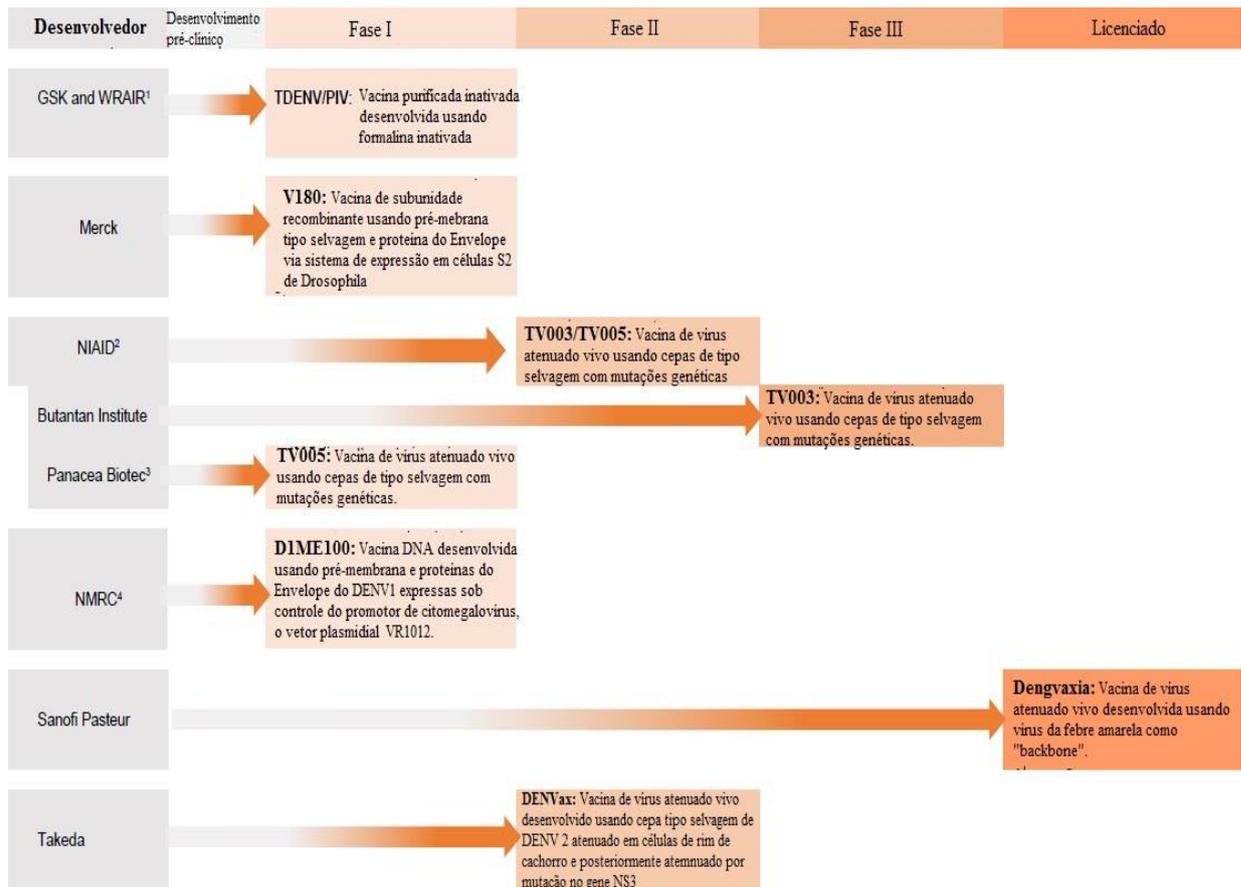


Figura 7 - **Candidatos vacinais contra a dengue:** Candidatos vacinais contra a dengue que estão em desenvolvimento e as fases de teste em que cada uma se encontra.

Fonte: Adaptado de: www.denguevaccines.org (Acesso em 22/01/2016).

Em abril de 2016 o Grupo Consultivo Estratégico de Especialistas em Imunização (SAGE – WHO), recomendaram que a Dengvaxia® fosse administrada em países com alta endemicidade da dengue, com aproximadamente 70% de soroprevalência. As análises da fase 3 de testes clínicos mostraram que a vacinação com Dengvaxia® conferiu proteção em indivíduos parcialmente imunes à dengue (aqueles que já entraram em contato com o vírus), porém, existe uma preocupação em relação aos números de hospitalizações de indivíduos que não entraram em contato com o vírus antes da vacinação (AGUIAR et al, 2016).

Embora a Dengvaxia® já esteja licenciada e pronta para ser distribuída em alguns países, continuam os estudos para se encontrar um candidato vacinal com uma maior eficácia, segurança e que possa ser administradas em menos doses. Uma das estratégias que vêm sendo desenvolvida é o uso de nanopartículas como adjuvantes para vacina contra a dengue. Nanopartículas têm sido frequentemente usadas como carreadores ou como adjuvantes

vacinais, pois, além de proteger o imunógeno contra degradação, aumenta sua absorção facilitando a difusão através do epitélio, modificando a farmacocinética e aumentando a penetração e distribuição intracelular (SILVA et al., 2012).

2.6 Nanopartículas

2.6.1 Nanopartículas Adjuvantes

As nanopartículas são materiais que têm dimensões nanométricas, entre 10-1000 nm e são compostas por uma matriz coloidal ou involucro, podendo ser utilizadas como carreadores de fármacos convencionais e outras substâncias como peptídeos, proteínas recombinantes, nucleotídeos e vacinas (DAI et al., 2006; MURTHY, 2007).

As nanopartículas (NPs) têm sido amplamente utilizadas em aplicações da medicina em diversas áreas, como por exemplo, na entrega de fármacos e genes para o tratamento de diversas patologias, dentre elas, doenças degenerativas, doenças oculares, respiratórias, alergias, HIV e até mesmo na terapia contra alguns tipos de cânceres (MURTHY, 2007; ROY et al., 1999). As características destas partículas contribuem particularmente para que ela se torne forte candidata às funções médicas e farmacêuticas, pois possuem grandes áreas superficiais que podem exibir um grande número de grupos funcionais, como ligantes, rápida absorção, mobilidade biológica, elevada capacidade de difusão, estabilidade do sistema, proteção contra degradação do antígeno e/ou fármaco, possuem a capacidade de prolongar a exposição ao princípio ativo por meio da liberação controlada além de atenuar toxicidade de alguns fármacos sem alteração dos seus efeitos terapêuticos (ELSABAHY; WOOLEY, 2013; NITTA; NUMATA, 2013; RAHIMNEJAD et al., 2006).

O desafio na construção de nanopartículas como sistemas carreadores são: o tamanho da partícula, as propriedades superficiais e a cinética da liberação dos agentes ativos, que tem como objetivo chegar ao sítio específico de ação do fármaco para se atingir o máximo de eficácia no tratamento (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

A escolha do material na preparação das NPs em sistemas de carreamento de vacinas é diversa e está diretamente ligado ao tipo de resposta terapêutica esperada. Os materiais podem incluir polímeros, copolímeros, lipídeos e alguns metais e está relacionado a fatores como, biocompatibilidade, taxa de degradação, hidrofiliabilidade ou lipofiliabilidade e polaridade. Os efeitos relativos às propriedades da partícula vão ser influenciados pelos seguintes fatores: tamanho, estabilidade, carga e cinética da liberação do antígeno enquanto os efeitos nas respostas imunes induzidas incluirão fatores como a estabilidade e a liberação do antígeno, interação da partícula com as Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), apresentação e processamento do antígeno pelas APCs, estas características vão determinar a compatibilidade da nanopartícula com o sistema imune (NITTA; NUMATA, 2013; OYEWUMI et al., 2010; REBOUÇAS et al., 2012).

Atualmente o material mais utilizado para a preparação de NPs são os polímeros, estes possuem diferentes grupos funcionais que interagem entre si formando agregados que podem resultar na formação de nanopartículas, além de permitir a modificação e/ou ligação de moléculas e ligantes que podem tornar a superfície das NPs funcionais (YANG et al., 2006). Dentre os polímeros utilizados para a preparação de nanopartículas os mais utilizados são aqueles de materiais biodegradáveis. O que mais chama atenção nestes polímeros, além do fato de serem biodegradáveis é o fato de serem biocompatíveis e aprovados para uso em humanos como sistema de carreamento de fármacos (OYEWUMI et al., 2010; PATIL; PANYAM, 2009). Outro material utilizado na produção de nanopartículas são os lipossomos, porém, as desvantagens quanto ao uso destes frente às NPs poliméricas são: baixa eficiência de encapsulação, baixa estabilidade de estocagem e rápida liberação de ativos hidrossolúveis na presença de componentes sanguíneos. Já as NPs poliméricas melhoram a estabilidade dos fármacos ou proteínas e possuem interessantes características de liberação controlada (MARCATO; DURÁN, 2008; SOPPIMATH et al., 2001).

Os biopolímeros são produzidos a partir de matéria prima de fonte renovável e biocompatíveis como, proteínas (seda, colágeno, albumina e β -caseína) e polissacarídeos (alginato, quitosano, heparina e amido) ou de fonte sintética [PLA – poli (ácido lático), PLGA – ácido poli-(lático-co-glicólico)] (NITTA; NUMATA, 2013; REBOUÇAS et al., 2012). Em comparação com os polímeros sintéticos, as NPs compostas de proteínas oferecem a vantagem de serem metabolizáveis por enzimas digestivas em peptídeos inócuos ao passo que os sintéticos podem se acumular no organismo e resultar em produtos de degradação tóxicos

(ELZOGHBY et al., 2012). Outra vantagem do uso de biopolímeros é que nanopartículas produzidas a partir destes têm uma biodegradação lenta, o que pode sustentar a liberação do antígeno por um período de meses (KREUTER, 1994; PITAKSUTTEEPONG, 2005).

Além da influência do material utilizado na produção da nanopartícula estar estreitamente ligada à resposta imune antígeno-específica, o tamanho da partícula vai influenciar a rota e a forma como a NP vai ser absorvida ou capturada, assim como o tipo de resposta imune humoral ou celular. O autor Oyewumi descreveu (2010) que, partículas com tamanhos entre 20 e 200 nm são normalmente capturadas por endocitose, caracterizando uma resposta imune celular de indução de células T CD4 e T CD8. Em contrapartida, partículas com tamanhos acima de 500 nm são na maioria das vezes capturadas por fagocitose e/ou pinocitose por células dendríticas ou macrófagos e são mais prováveis de promover uma resposta imune humoral (MOTTRAM et al, 2006; OYEWUMI et al., 2010; XIANG et al., 2006). Mesmo que haja relação do tamanho da nanopartícula e da resposta imune, a rota de administração e o antígeno utilizado vão influenciar diretamente no tipo de captura das NPs e na resposta imunológica desenvolvida.

Um fator importante a ser considerado no uso de NP como carreadores e/ou adjuvantes vacinais é a rota pela qual ela é administrada uma vez que administração desempenha um papel significativo na formação da indução de respostas imunes. As NP podem ser introduzidas no organismo através das vias intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, cutânea, subcutânea, oral ou intraocular (GREGORY et al., 2013; KONG et al., 2011; OYEWUMI et al., 2010). De acordo com Newman e colaboradores (2002), partículas com o mesmo tamanho quando administradas por diferentes vias podem estimular tipos diferentes de APCs levando a uma resposta imune diferenciada.

2.6.2 *Nanopartículas e Resposta Imune*

A utilização de nanopartículas como adjuvantes vem da necessidade da utilização destas para a amplificação, aceleração ou melhoramento da resposta imune para uma ampla gama de antígenos que são fracamente imunogênicos (OYEWUMI et al., 2010). Os adjuvantes vacinais podem atuar: aumentando a presença de um infiltrado celular no local da

imunização, promovendo a ativação das APCs através de regulação positiva de sinais co-estimuladores ou aumentando a expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC); aumentando desta forma, a apresentação de antígenos e finalmente induzindo a liberação de citocinas (SINGH; O'HAGAN, 1999).

Os adjuvantes podem ser classificados como: imunoestimuladores, imunopotencializadores ou atuarem como sistemas de entrega de antígenos. Acredita-se que, os adjuvantes imunoestimuladores/imunopotencializadores exercem os seus efeitos predominantemente na indução da expressão de citocinas, no aumento da expressão de MHC ou de receptores envolvidos no reconhecimento de antígenos, tais como os Receptores do Tipo Toll (TLRs), ou ainda através do aumento dos sinais co-estimulatórios. Estes efeitos irão aumentar a ação das APCs, potencializando-as. Por outro lado, os sistemas de entrega têm como objetivo direcionar e aumentar a quantidade de antígeno a ser apresentado para as APCs (SINGH; O'HAGAN, 1999; O'HAGAN; VALIANTE, 2003; O'HAGAN; RAPPUOLI, 2004).

Nanopartículas construídas a partir de polímeros biodegradáveis associadas a antígenos vacinais, como DNA, proteínas e peptídeos, vêm sendo utilizadas como sistemas adjuvantes de entrega de vacinas e possuem grande potencial imunoestimulante. Nanopartículas biodegradáveis (BNPs) associadas à antígenos ou com antígenos encapsulados representam, atualmente, uma estratégia eficiente para a liberação de antígenos imunogênicos uma vez que são capazes de otimizar a resposta do sistema imune principalmente através da ativação e diferenciação das células dendríticas (DC), além de serem sistemas promissores para o encaminhamento de antígenos aos linfonodos após uma administração subcutânea e de induzirem a ativação do sistema complemento (MONOLOVA et al., 2008; OYEWUMI et al., 2010; REDDY et al., 2006).

Outro fator que favorece este sistema é o fato das nanopartículas manterem o antígeno intacto por mais tempo, aumentando desta forma, as chances de captura e processamento do antígeno pelas DCs (AKAGI et al., 2011). O reconhecimento e ativação das DCs pela associação das NPs com o antígeno é um importante mecanismo da resposta inata e está diretamente ligada à apresentação do antígeno às células T CD4, que uma vez ativadas, vão auxiliar na ativação e proliferação de células T CD8 e dos linfócitos B levando a uma resposta imune específica (AKAGI et al., 2011; STORNI et al., 2005). Portanto, o sistema adjuvante vai atuar sobre as células da imunidade inata, enquanto os antígenos disponibilizam os

epítomos necessários para geração de uma imunidade adquirida e de memória imunológica (O'HAGAN; VALIANTE, 2003; PASQUALE et al., 2015).

Diversos aspectos podem influenciar na resposta imunológica induzida pela administração de antígenos associados à nanopartículas, tais como o tamanho e morfologia da partícula, composição, carga superficial, estrutura química e via de administração. Oyewumi e colaboradores (2010) e Kanchan e Panda (2007) descreveram uma tendência de partículas menores induzirem uma resposta celular, e das partículas maiores em induzirem uma resposta humoral. Chong e colaboradores descreveram em 2005, que a imunização com nanopartículas de PLGA associadas à albumina sérica humana (HBsAg) com tamanho aproximado de 300 nm, foram capazes de induzir uma resposta imune celular, especificamente com presença de células Th1. Gutierrez e colaboradores (2002) avaliaram a resposta imune de camundongos após a imunização com NPs de PLGA carregadas com BSA, as quais apresentavam tamanhos de 200, 500 e 1000 nm. Os autores observaram que a imunização utilizando NPs entre 200 e 500 nm levaram a menores níveis de IgG anti-BSA se comparado com as partículas de 1000 nm.

Outro fator que influencia na interação das NPs e do sistema imune, ou seja, da sua internalização, é a carga da partícula. A literatura descreve que, partículas catiônicas ou aniônicas são melhores internalizadas pelas células do que aquelas que apresentam carga neutra. Nanopartículas catiônicas se ligam a grupos funcionais celulares de superfície carregados negativamente, como por exemplo, ácido siálico, iniciando a translocação da partícula (ABBASI et al., 2012; CHAN; CARUSO, 2005). Cho e Caruso descreveram em seu estudo que a internalização de nanopartículas de ouro carregadas positivamente demonstraram maior aderência à membrana celular e conseqüentemente foram mais capturadas por células do que NPs com carga negativa ou neutra.

O tamanho da partícula vai influenciar diretamente o destino destas após a escolha da rota de administração da imunização. De acordo com Pitaksuteepong (2005), as nanopartículas com diâmetros menores do que 100 nm são drenadas pelos capilares linfáticos por meio dos espaços presentes nas células endoteliais linfáticas. Em contrapartida, as NPs que possuem tamanhos entre 100-1000 nm, são na maioria das vezes fagocitadas pelas DCs, as quais migram para os capilares linfáticos. A rota de administração das nanopartículas e/ou adjuvantes vacinais desempenha um papel significativo na formação da indução de respostas imunes. As NP podem ser introduzidas no organismo através de diferentes vias, como por

exemplo, pela via intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, cutânea, subcutânea, oral ou intraocular (GREGORY et al., 2013; KONG et al., 2011; OYEWUMI et al., 2010). A administração subcutânea permite a entrega do antígeno vacinal para órgãos linfóides periféricos, como linfonodos, onde se encontram as células B e T responsáveis por uma resposta imune adquirida (OUSSOREN; STORM, 2001). De acordo com Newman e colaboradores (2002), partículas com o mesmo tamanho quando administradas por diferentes vias podem estimular tipos diferentes de APCs levando a uma resposta imune diferenciada.

2.6.3 *Nanopartículas de Albumina Sérica*

Estudos recentes mostram que aplicações de NPs de albumina sérica (humana ou bovina) têm demonstrado algumas vantagens como carreador de fármacos biocompatível e biodegradável liberando os medicamentos nos locais de interesse e aumentando a concentração destes no tecido (GRADISHAR et al., 2005; LI et al., 2008; ZHAO et al., 2010). Nanopartículas construídas com albumina apresentam vantagens por serem biodegradáveis, fáceis de preparar, reproduzíveis e bem toleradas, principalmente pelo fato da matriz da albumina ser capaz de incorporar vários tipos de compostos (ELZOGHBY et al., 2012; SILVA et al., 2012). A albumina tanto humana (HSA) quanto bovina (BSA), é uma proteína plasmática, estável em pH de 4 a 9 e pode ser aquecida a 60°C por até 10 horas sem efeitos deletérios, baixa toxicidade, alta estabilidade, capacidade de ligação a vários fármacos, capacidade de emulsificação, gelificação e ligação com água, possui grande capacidade de biodegradação além de ficar circulante no sangue por aproximadamente 19 dias (CHEN et al., 2015; ELZOGHBY, et al., 2012). Outro fator que colabora para o uso da albumina sérica na preparação de NP é o fato dela ser facilmente produzida, através das técnicas de coacervação, gelificação térmica, dessolvatação controlada, formação de emulsão e auto-montagem (HEDAYATI et al., 2012; MÜLLER et al., 1996).

No processo de preparação a partir da técnica de coacervação ou dessolvatação, a albumina sérica é dissolvida em água ultrapura (pH entre 7 e 9) ou em outra solução, como por exemplo, o cloreto de sódio a 10 mM. A transformação em NP ocorre pela adição controlada de um agente de dessolvatação (etanol ou acetona) sob agitação constante em

velocidade determinada, até a obtenção de uma solução turva. A adição do agente de dessolvatação e/ou coacervação reduz a solubilidade da albumina na água auxiliando na interação das moléculas desta proteína. A ligação entre as partículas de albumina formadas é considerada, neste momento, pouco estável podendo se dissolver na solução aquosa. Para que haja a estabilização das partículas formadas, é necessário o uso de um agente de reticulação, como o glutaraldeído, este reage com os grupos amino na superfície da partícula estabilizando-a. A etapa de reticulação das NPs de albumina influencia na sua biodegradabilidade, liberação do fármaco e/ou antígeno e na sua estabilidade. Após o processo de reticulação da albumina com o glutaraldeído, as nanopartículas devem ser purificadas a partir de centrifugação, onde o glutaraldeído em excesso pode ser removido e as nanopartículas formadas podem ser recuperadas a partir da ressuspensão com solução salina. (ABBASI et al., 2011; ELZOGHBY, et al., 2012; LANGER et al., 2003; MERODIO et al., 2001; WEBER et al., 2000). Entre as vantagens da escolha do método de coacervação na produção de NPs de albumina sérica estão: ausência do uso de solventes, homogeneizadores, e outras aparelhagens complexas. Porém, a desvantagem é a reprodutibilidade da técnica, uma vez que ela envolve etapas manuais que podem sofrer variações.

Outra técnica de produção de NP poliméricas bastante utilizada é a da emulsificação. Está técnica é baseada na formação de emulsões espontâneas a partir da mistura de uma fase orgânica, que consiste em um solvente homogêneo lipofílico, como, por exemplo, um óleo e uma fase aquosa, que consiste em água e um tensoativo hidrofílico. Após a formação das gotículas de emulsão o solvente utilizado é eliminado através de tratamento químico ou térmico, resultando em nanopartículas sólidas e estáveis (ELZOGHBY et al., 2012; SUNDAR et al., 2010;). A desvantagem deste método é a necessidade da utilização e remoção dos solventes orgânicos utilizados para a estabilização das emulsões (LANGER et al., 2003; SUNDAR et al., 2010). A técnica de gelificação térmica é baseada em mudanças conformacionais e interações proteicas como resultado do aumento de temperaturas, tais interações envolvem, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas e reações de troca sulfidril-dissulfeto (ELZOGHBY et al., 2012).

Estudos preliminares do nosso grupo mostram que nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA) são promissores sistemas vacinais de entrega de antígenos do *Dengue vírus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados destes trabalhos mostraram que imunização com nanopartículas de BSA com antígenos de *P. aeruginosa* foi eficiente para induzir anticorpos

IgG anti- *P. aeruginosa*, como também, baixar os sinais inflamatórios desencadeados pela infecção nasal de camundongo, a concentração de células inflamatórias nos pulmões, em 1 ou 4 dias após a infecção, além de reduzir edema, hemorragia e manifestações de hiperemia em infecções por esta bactéria. Em outro trabalho, foi observado uma produção robusta de anticorpos IgG anti-DENV em camundongos imunizados com nanopartículas de BSA com quatro sorotipos do DENV inativados adsorvidos em sua superfície (RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al, 2012).

O maior desafio no desenvolvimento de uma vacina contra a dengue é o fato de esta ser causada por quatro sorotipos diferentes do DENV (DENV 1-4), que são geneticamente e antigenicamente distintos entre si. A proteção homóloga em uma segunda infecção pelo mesmo sorotipo é existente e duradoura, porém, no caso de uma infecção por um sorotipo heterólogo a proteção é inexistente ou curta, podendo levar às manifestações mais graves da doença. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de uma vacina eficaz, segura e que confira proteção balanceada contra os quatro sorotipos do DENV ao mesmo tempo.

A literatura mostra que a proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus da dengue é altamente conservada entre seus quatro sorotipos. Ela é encontrada em altos níveis nos casos mais severos da doença, sendo responsável por uma gama de respostas imunológicas no hospedeiro, como por exemplo, a produção de citocinas inflamatórias e o extravasamento de plasma (MODHIRAN et al., 2015). Trabalhos mostram que a vacinação com NS1 e/ou a administração de soro anti-NS1 ou anticorpos anti-NS1 protege contra o extravasamento vascular induzido por DENV em camundongos. Estudos sugerem que anticorpos contra NS1 gerados a partir da vacinação com a própria proteína podem aumentar a depuração do vírus, bem como neutralizar os efeitos vasoativos de NS1 (BEATTY et al., 2015). Assim, neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito adjuvante de nanopartículas de albumina sérica bovina na produção de anticorpos anti-NS1 em camundongos Swiss imunizados com a NS1 na presença de nanopartículas de BSA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito adjuvante de nanopartículas de albumina sérica bovina na imunização de camundongos utilizando a proteína não estrutural 1 do *Dengue vírus 1* como antígeno.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Produzir e caracterizar as nanopartículas de albumina sérica bovina;
- b) Avaliar a taxa de captura por células RAW 264.7 e BHK-21 tratadas com as nanopartículas produzidas;
- c) Analisar os efeitos histopatológicos em camundongos Swiss após a imunização com as nanopartículas de albumina sérica bovina;
- d) Avaliar a produção de anticorpos anti-NS1 em camundongos imunizados com a NS1 na presença das nanopartículas produzidas.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparação das nanopartículas de albumina sérica bovina

Para o preparo das nanopartículas de BSA foi utilizada a técnica de coacervação e ligação cruzada com glutaraldeído (RODRIGUES et al., 2013). Resumidamente, 5 mL de uma solução de BSA a 2% em NaCl 10 mM (pH 8,5) foi colocada em um béquer sob agitação máxima (ABBASI et al, 2011). Logo após, foi adicionado etanol absoluto (1 mL/minuto) para que se formassem os coacervados de nanopartículas. A reticulação foi realizada adicionando-se 50 µL de glutaraldeído a 40% sob agitação orbital por cerca de 16 horas à temperatura ambiente. As nanopartículas formadas foram purificadas através de centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos para eliminação de BSA livre e excessos dos agentes de reticulação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi suspenso em PBS estéril pH 8,5 (Tampão Fosfato Salina) na concentração final de 10 mg/mL.

4.2 Caracterização das Nanopartículas

As características das nanopartículas, como morfologia, diâmetro médio, potencial Zeta e índice de polidispersão, influenciam diretamente na resposta imunológica desenvolvida e na interação com as células apresentadoras de antígenos. A análise da morfologia das nanopartículas foi realizada no Centro de Microscopia da UNIFAL-MG através de Microscopia de Força Atômica (AFM – Park Systems NX10 – Coréia do Sul). Para isto, 15 µL da solução de nanopartículas foram colocados em lamínulas circulares de vidro (13 mm) e secas em temperatura ambiente por 24 horas. Após a secagem, estas foram encaminhadas ao Centro de Microscopia onde foram realizadas as análises.

O diâmetro médio, o potencial Zeta e o índice de polidispersão da amostra foram determinados pela Técnica de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS – Malvern Instruments Ltda Zetasizer Nano ZS – Reino Unido) no Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos da

UNIFAL-MG. As amostras foram diluídas em tampão salina (1:1000) e submetidas à análises realizadas empregando uma fonte de laser vermelho ($\lambda = 633 \text{ nm}$), na temperatura de 25° C , em triplicata.

4.3 Nanopartículas Fluorescentes

Para a produção das nanopartículas fluorescentes, foi utilizado o mesmo protocolo descrito anteriormente, porém, antes da realização do processo de coacervação, foi adicionado à solução de BSA 2%, 50 μL de Isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 1 mg/mL em PBS e incubados por 16 horas.

4.4 Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas em células RAW 264.7 e BHK-21

A taxa de citotoxicidade das nanopartículas produzidas foi realizada através do teste colorimétrico utilizando para isso o metabólito MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] (Sigma-Aldrich, EUA). Após as linhagens celulares de RAW 264.7 e BHK-21 serem cultivadas de acordo com seus protocolos de cultivo, estas foram submetidas ao tratamento com as nanopartículas na concentração inicial de 1 mg/mL. Depois de 72 horas os sobrenadantes foram recolhidos e as células utilizadas para o teste de viabilidade celular a partir da incubação com 10 μL de uma solução contendo 5 mg/mL de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – MTT (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS por 4 horas a 37°C . Após este tempo, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e adicionou-se 100 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan. A leitura da densidade ótica foi feita em espectrofotômetro a 570 nm.

4.5 Avaliação da taxa de captura em células RAW 264.7 e captura em células BHK-21

Foram cultivadas duas linhagens celulares, as células RAW 264.7, em meio DMEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos Penicilina/Estreptomicina (P/E) e antifúngico Anfotericina B (AnfB) na concentração de 5×10^5 células por poço, em placas de cultura de 6 poços contendo lamínulas de vidro esterilizadas, e células BHK-21 em meio DMEM contendo 5% SFB mais P/E e AnfB nas mesmas concentrações.

Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com 500 μg de nanopartículas fluorescentes. Após diversos tempos de incubação (30 minutos, 1, 4, 16 e 24 horas), o meio de cultura foi removido, as lamínulas foram coletadas, lavadas 3 vezes com 1 mL de PBS, posteriormente fixadas com 2 mL de PBS contendo 10% de formaldeído e incubadas a 4°C por 15 minutos. Após a fixação das células, os núcleos foram corados com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de corante bisBenzimide em PBS por 10 minutos. As células coradas foram então visualizadas em microscópio de fluorescência e a porcentagem de células positivas, ou seja, aquelas que englobaram as nanopartículas foram determinadas em relação ao número total de células em pelo menos 10 campos aleatórios.

4.6 Multiplicação e Titulação de *Dengue vírus 1* (DENV-1)

A amostra de DENV-1 foi multiplicada em células C6/36 (derivadas de Mosquitos *Aedes albopictus*) cultivadas em meio Leibowitz L-15 (Cultilab, Brasil) suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA). Após o processo de infecção das células, essas foram observadas em um intervalo de 5-7 dias até o desenvolvimento do efeito citopático característico de DENV em células C6/36 (formação de sincícios). O sobrenadante foi coletado, clarificado por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos (Eppendorf 5810R, Alemanha), aliquoteado e armazenado a -80°C até o uso.

4.7 Extração de RNA viral

O RNA viral de DENV-1 foi obtido a partir da purificação de 200 µL de sobrenadante de cultura de células C6/36 infectadas, utilizando o kit de extração de ácidos nucleicos virais (*High Pure Viral Nucleic Acid Kit* – Roche/ Alemanha), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

4.8 Amplificação da região codificadora de NS1

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada logo após a extração do RNA viral, através de reações de transcrição reversa (RT) utilizando a enzima MMLV-RT (Promega). Inicialmente, 10 µL do RNA viral foram incubados a 70°C por 5 minutos na presença de 50 µM do iniciador antisense NS1 (5'- TTA AAG CTT TTA TGC AGA GAC CAT- 3'). Após este tempo foi adicionado à mistura 5 µL de tampão M-MLV RT 5X, 0,125 mM de dNTPs, 200 U de enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Promega, EUA), e água deionizada estéril para completar o volume final de 25 µL. A reação foi incubada primeiramente a 42°C por 60 minutos e logo em seguida a 72°C por 15 segundos.

A amplificação da sequência codificadora de NS1 ocorreu através do método de PCR convencional (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do cDNA obtido. Nesta reação foram utilizados 2 µL de cDNA, 1U de enzima *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA), 0,3 mM de dNTPs , 1 mM de MgSO₄ , 5 µL do tampão *10X pfx Amplification Buffer*, 0,3 µM de cada iniciador (NS1 *antisense* 5'- TTA AAG CTT TTA TGC AGA GAC CAT- 3'; NS1 *sense* 5'-CCG GAT CCA TGG ACT CGG GAT GTG- 3') e H₂O deionizada estéril para completar o volume final de 50 µL. A amplificação realizada em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 – Thermo Fisher Scientific), e ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação de 94°C por 15 segundos, pareamento a 55°C por 30 segundos e extensão 68°C por 1 minuto e 30 segundos.

O produto da amplificação foi corado com corante fluorescente de ácidos nucleicos Gel Red (Biotium, EUA) e submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X). Após a confirmação da presença do produto de PCR, a reação foi purificada utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) conforme o protocolo do fabricante.

4.9 Clonagem do fragmento de NS1 ao vetor de expressão pQE-30

O fragmento purificado de NS1 e o plasmídeo de expressão pQE-30 (Qiagen, Alemanha) foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e HindIII (Promega, EUA). A reação de digestão utilizou Tampão de Restrição Enzimática 1X, 2 µg de Albumina Sérica Bovina Acetilada (BSA), 1 µg de DNA, 5 U de BamHI, 5 U de HindIII e quantidade suficiente de água para volume final de 20 µL. A reação foi incubada em banho Maria a 37°C por 4 horas e o produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X). Para purificação do DNA digerido utilizou-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA) conforme o protocolo do fabricante.

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

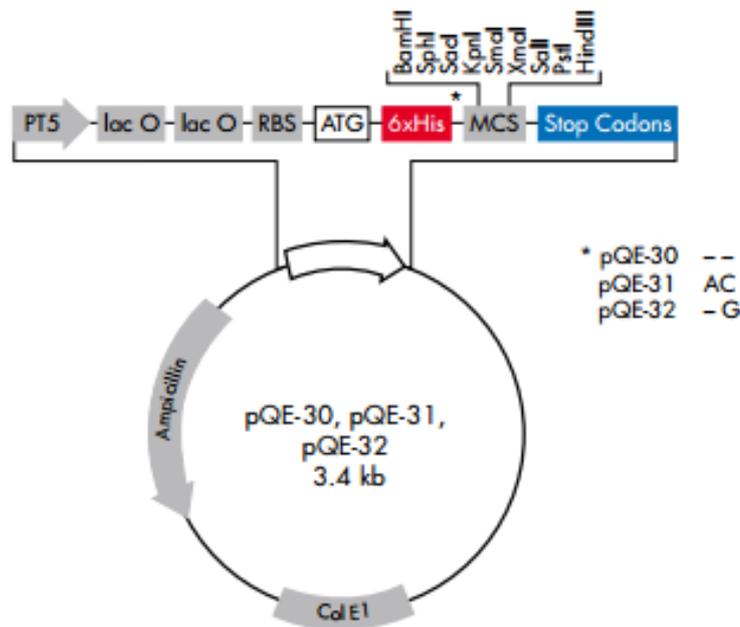


Figura 8 – Plasmídeo de expressão de proteínas pQE-30.

Fonte: <http://web.mnstate.edu/provost/QiaExpressionist.pdf> (Acesso em 18/04/2016)

A ligação do fragmento de interesse (NS1) ao plasmídeo pQE-30 foi feita utilizando a enzima T4 DNA *ligase* (Promega, EUA). Foram utilizados 50 ng de vetor e uma razão de 1:3 de inserto, conforme o protocolo do fabricante. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* JM109, segundo o protocolo apresentado no item 5.9.

4.10 Transformação bacteriana

A reação de transformação foi realizada utilizando bactérias quimiocompetentes *E. coli* JM109 (Promega, EUA) ou M15 (Qiagen, Alemanha). Foi adicionada toda a reação de ligação ao tubo contendo a bactéria competente, homogeneizado gentilmente e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente foi realizado o choque térmico a 37°C por 45 segundos e imediatamente a reação foi incubada em banho de gelo por mais 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de meio Luria Bertani (LB - Himedia, Índia) e a cultura incubada a 37°C por 1 hora. Volumes de 30 e 70 µL foram plaqueados em placas de Petri

contendo LB ágar e antibiótico ampicilina (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA). A cultura foi incubada por no mínimo 18 horas a 37°C para posterior seleção dos clones transformados.

4.11 Seleção de clones recombinantes por PCR

As colônias que cresceram na placa contendo o antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) foram coletadas da placa de Petri com o auxílio de uma ponteira de micropipeta e foram então, mergulhadas em tubos de 0,2 mL contendo mix de PCR previamente preparado. Logo após, foram transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 500 µL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL). A reação de PCR foi realizada com Tampão da Taq 1X, 2,0 mM de MgCl₂, 500 µM de dNTPs, 0,5 µM do iniciador pQE-30 senso (5'- CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG- 3'); 0,5 µM do iniciador pQE-30 antisenso (5'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G 3'), 2 U de Taq polimerase e quantidade suficiente de água para volume final de 20 µL. A amplificação realizada em termociclador ocorreu nas seguintes condições: um ciclo inicial a 95°C por 10 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 49,2°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. O produto da amplificação foi corado com corante fluorescente de ácidos nucleicos Gel Red (Biotium, EUA) e submetido à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA 1X).

4.12 Extração de DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial em pequena escala dos clones de interesse (aqueles que apresentaram o inserto), a suspensão bacteriana foi inoculada em tubos de 50 mL contendo 5 mL de meio LB e antibiótico de seleção ampicilina (100 µg/mL) e incubados sob agitação de 180 rpm a 37°C por 16 horas. Após este tempo utilizou-se o Kit *Wizard™ Plus Miniprep DNA purification System* (PROMEGA, EUA) para a obtenção dos plasmídeos recombinantes, segundo o protocolo do fabricante. O plasmídeo recombinante contendo o

inseto de interesse foi utilizado para transformação de bactérias M15 para posterior expressão da proteína NS1.

4.13 Sequenciamento dos Plasmídeos Recombinantes

O plasmídeo recombinante foi enviado para a empresa Myleus (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi, descrito por SANGER e colaboradores (1977), em sequenciador automático capilar Mega Bace1000 (GE HEALTHCARE, EUA), utilizando o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (MegaBACE™) (GE HEALTHCARE, EUA), obedecendo às condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

4.14 Expressão e purificação da proteína NS1 recombinante em *Escherichia coli* M15

Após a transformação bacteriana as colônias positivas foram selecionadas por reações de PCR conforme descrito no item 4.6 e inoculadas em 5 mL de meio LB contendo antibióticos de seleção ampicilina (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) e kanamicina (25 µg/mL) (Applichem, Alemanha) e incubados a 37°C em agitação de 180 rpm por 16 horas. Após este período de incubação, foi adicionado 600 µL da cultura bacteriana em 10 mL de meio LB contendo antibióticos de seleção supracitados. A cultura foi incubada sob agitação de 180 rpm a 37°C até atingir a densidade óptica (DO) de 0,6 a 600 nm. Após atingir a DO desejada, foi adicionado IPTG (isopropil-β-D-thiogalactoside) à cultura na concentração final de 2 mM e esta foi incubada em agitação por 4 horas para a indução da expressão da proteína recombinante. Foi retirado da cultura 1 mL antes e após a indução para análise da expressão da proteína em gel de Poliacrilamida-SDS 12%. A cultura pós-indução foi centrifugada a 4000 rpm durante 30 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em tampão de lise pH 8,0 (Guanidina 6 M, 0,1 M de Fosfato

Monossódico de Sódio; 0,01 M de Tris;) e mantido em agitação por 60 minutos à temperatura ambiente. O lisado bacteriano foi centrifugado a 12.000 rpm durante 30 minutos e o sobrenadante utilizado para a purificação da proteína.

Para a purificação da proteína recombinante, o sobrenadante foi aplicado em coluna contendo 2 mL de quelato de Níquel (Sigma-Aldrich, EUA) previamente equilibrada com 15 mL de tampão de lise pH 8,0. O eluato foi coletado e a coluna lavada com 15 mL de tampão de purificação pH 8,0 (Ureia 8 M, 0,1 M de Fosfato Monossódico de Sódio, 0,01 M de Tris). Após, a coluna foi lavada com mais 15 mL de Tampão de purificação pH 6,0 e depois pH 4,0 sendo coletadas as frações correspondentes.

O perfil proteico das bactérias antes e após a indução por IPTG foram analisados através de eletroforese em gel de Poliacrilamida-SDS 12%. As amostras foram diluídas volume a volume (v/v) em Tampão de aplicação 2X (5% Mercaptoetanol; 10% Glicerol; 50 mM Tris pH 6,8; 0,25% v/v Azul de Bromofenol), aquecidas a 99°C por 10 minutos e então aplicadas no gel. Após a corrida, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue R 250 1% diluído em solução fixadora (Metanol 50%; Ácido Acético 10%) por aproximadamente 2 horas. O gel foi então descorado em solução de 50% Álcool Etílico e 50% água por 24 horas.

As frações que apresentaram as proteínas NS1 purificadas foram dialisadas em tampão Ureia 0,5 M em pH 7, utilizando membranas de diálise com poros de 12 kDa (Sigma-Aldrich, EUA). As proteínas foram aliquotadas, quantificadas pelo método de ácido bicinonínico (BCA) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

4.15 Histopatologia da Pele

Camundongos *Swiss* fêmeas de 4 a 5 semanas de idade obtidos do biotério institucional foram mantidos em condições de acesso livre à água e alimentos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UNIFAL-MG (696/2015). Os animais tiveram seus pelos removidos e receberam uma única dose de imunização pela via subcutânea na região dorsal contendo 1 mg de nanopartícula na ausência ou presença da NS1 (30 µg/dose) em um volume final de 160 µL. Como controle negativo camundongos receberam a administração

de 160 μ L de tampão salina (PBS pH 8,5) e como controle positivo os animais receberam 30 μ g da NS1 recombinante em salina estéril (PBS pH 8,5).

Após 7 dias da injeção subcutânea, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a região da pele onde as injeções foram previamente aplicadas, foram removidas e fixadas em tampão salina 10% formaldeído para posterior análise histopatológica pela técnica de hematoxilina e eosina.

4.16 Imunização

Camundongos Swiss fêmeas de 4 a 5 semanas de idade, nas mesmas condições citadas anteriormente receberam três doses das nanopartículas pela via subcutânea (1 mg Nanopartícula/dose) na ausência ou presença da aplicação de NS1 (30 μ g/dose) concomitantemente, em um volume final de 160 μ L nos dias 0, 7 e 14. Como controles positivos e negativos foram utilizados camundongos imunizados com 30 μ g da NS1 recombinante e salina estéril (pH 8,5), respectivamente. Os animais foram anestesiados com Ketamina (90 mg/kg) (Agener União - Brasil) e Xilazina (5 mg/kg) (Anasedan, Ceva – Brasil) e o sangue coletado pela veia submandibular 14 dias após a última imunização para avaliação da produção de anticorpos específicos.

4.17 Ensaio da Imunoadsorção Enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-NS1

O soro dos camundongos imunizados foi submetido a ensaios de ELISA para quantificação de anticorpos IgG e IgM usando como antígeno a NS1 recombinante. A proteína NS1 recombinante foi diluída na concentração de 20 μ g/mL em tampão carbonato/bicarbonato (0,1 M pH 9,6) e utilizada para a sensibilização da placa de 96 poços Nunc MaxiSorp® (eBIO SCIENCE, EUA). Foram adicionados 100 μ L da solução por poço, e incubado por no mínimo 16 horas a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada por três vezes

com solução composta por salina fosfatada tamponada contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) e em seguida bloqueada com 200 μ L de PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé) e 0,05% Tween-20 por 2 horas a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem e depois foram acrescentados 100 μ L dos soros diluídos 1:25 em solução de PBS-T por poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados novamente por três vezes com a solução de lavagem e após, foi acrescentado 100 μ L por poço anticorpos de secundários conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluídos em PBS-T conforme indicação do fabricante e a placa incubada por mais uma hora a 37°C. Para a detecção de anticorpos foram utilizados anticorpos secundários contra IgG e IgM totais conjugados à peroxidase.

A placa foi novamente lavada por mais três vezes com a solução de lavagem e posteriormente foram acrescentados 100 μ L por poço de uma solução de Dicloridrato de O-Fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EUA) preparada em tampão citrato/fosfato (0,1 M de Ácido Cítrico; 0,1 M de Fosfato de Sódio; pH 4,5) acrescentado de 0,001% de H₂O₂. A placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e após este tempo foi realizada a leitura da densidade ótica em leitor de microplacas (Leitor de Elisa Anthos Zenyth 200rt) em comprimento de onda de 450 nm. A determinação das amostras positivas foi realizada através da determinação do ponto de corte de cada ensaio de ELISA. O ponto de corte (cut-off) foi calculado através da média da densidade ótica obtida nos animais que receberam apenas a administração de PBS (controle negativo) somada a duas vezes o valor do desvio padrão obtido para este grupo. Foram, portanto, considerados positivos para a produção de IgM e IgG os animais que apresentaram valores de D.O. acima do ponto de corte.

4.18 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas pelo software GraphPad Prism® 4.0 utilizando teste *t-student*. O nível mínimo de significância aceita foi de 5% ($p < 0,05$).

5 Resultados

5.1 Produção e caracterização das Nanopartículas de Albumina Sérica Bovina

As nanopartículas de albumina sérica bovina (NP) deste estudo foram produzidas pelo método de coacervação com etanol. A albumina sérica foi escolhida como transportador molecular uma vez que é um composto biodegradável, biocompatível, atóxico e metabolizado *in vivo*. Após a reação de coacervação, a solução se tornou turva, com aspecto leitoso esbranquiçado, demonstrando a presença de coacervados de albumina (pH 8,5) que caracterizam as nanopartículas.

Uma vez produzidas, as nanopartículas foram caracterizadas quanto à sua morfologia, ao tamanho, ao potencial Zeta e a determinação do índice de polidispersão (Tabela 2). A análise da Dispersão Dinâmica de Luz mostrou que as NPs produzidas tiveram um tamanho médio de $431,9 \pm 4,004$ nm, um potencial Zeta médio de $-43,8 \pm 3,01$ mV e um índice de polidispersão de $0,322 \pm 0,0301$.

A morfologia das nanopartículas foi analisada através de Microscopia de Força Atômica (AFM – Park Systems NX10) e conforme esperado elas apresentaram forma esférica (Figura 9).

Tabela 2 - Caracterização das Nanopartículas de Albumina Sérica Bovina

	Tamanho Médio (nm)	Potencial Zeta (mV)	Polidispersão
Nanopartícula (NP)	$431,9 \pm 4,004$	$-43,8 \pm 3,01$	$0,322 \pm 0,0301$
Nanopartícula + FITC	$406,2 \pm 7,474$	$-26,3 \pm 1,53$	$0,249 \pm 0,029$

Fonte: Do autor

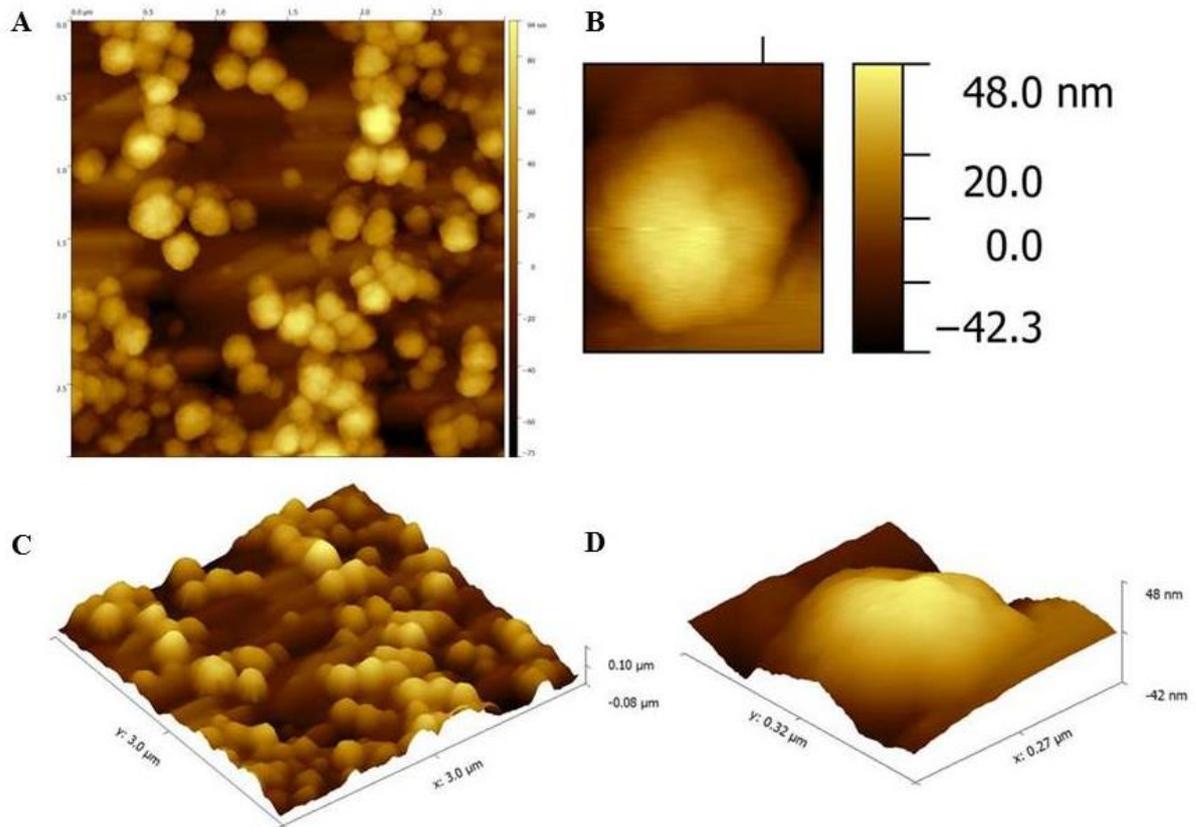


Figura 9 - **Microscopia de Força Atômica de Nanopartículas de albumina sérica bovina:** (A) Imagens em 2D, das nanopartículas de BSA; (B) Imagem em 2D de uma única nanopartícula; (C) Imagens em 3D das NPs de BSA em uma área de 3.0 x 3.0 μm ; (D) Imagem 3D de uma única NP com tamanho aproximado de 320 nm.

Fonte: Do autor.

Para avaliar a taxa de citotoxicidade das NP de BSA foi utilizado teste colorimétrico *in vitro* com o princípio da metabolização de MTT pelas enzimas mitocondriais das células macrofágicas RAW 264.7 e células fibroblásticas BHK-21, uma vez que este teste pode ser facilmente reproduzido, controlado e interpretado. A biocompatibilidade da BSA e a segurança de seu uso foram confirmadas pela ausência de citotoxicidade das NP de BSA. Conforme mostrado na figura 10, não houve citotoxicidade significativa dos dois tipos de célula estudados quando essas foram tratadas com 1 mg/mL de NP ($P < 0,05$).

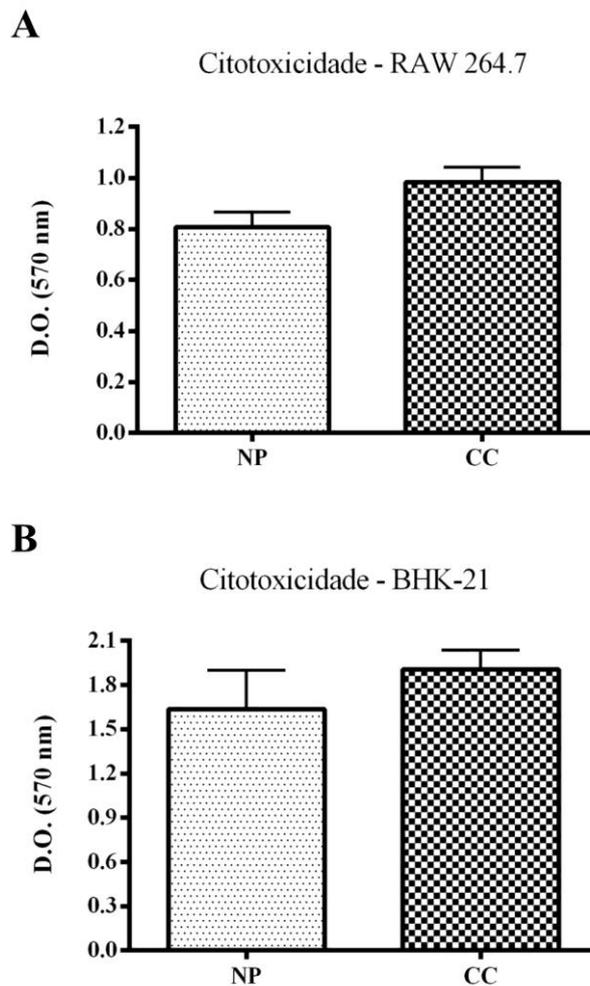


Figura 10 - **Análise da citotoxicidade de NP de BSA**: A) Citotoxicidade em células RAW 264.7; B) Citotoxicidade em células BHK-21. (NP) Nanopartícula de Albumina Sérica Bovina; (CC) Controle de Células; (D.O.) Densidade Óptica: 570 nanômetros.

Fonte: Do autor.

Além da caracterização e da análise da citotoxicidade, foi avaliado a captura destas nanopartículas por células fagocitárias (RAW 264.7) e não fagocitárias (BHK-21). A diferença na taxa de captura de nanopartículas entre os dois tipos celulares pode ser observada na figura 11. Embora tenha havido diferença na taxa de captura entre os dois grupos celulares, ambas as células capturaram nanopartículas a partir do primeiro intervalo de tempo de 30 minutos e após o intervalo de 24 horas cerca de 100% das células RAW fagocitaram NP e aproximadamente 80% das células BHK-21 capturaram nanopartículas. A intensidade do sinal (fluorescência FITC) observado nas células com características não fagocitárias (BHK-21) é

menor se comparado com o sinal emitido em células fagocitárias (RAW 264.7) o que demonstra uma maior taxa de captura de nanopartículas por estas (Figura 12).

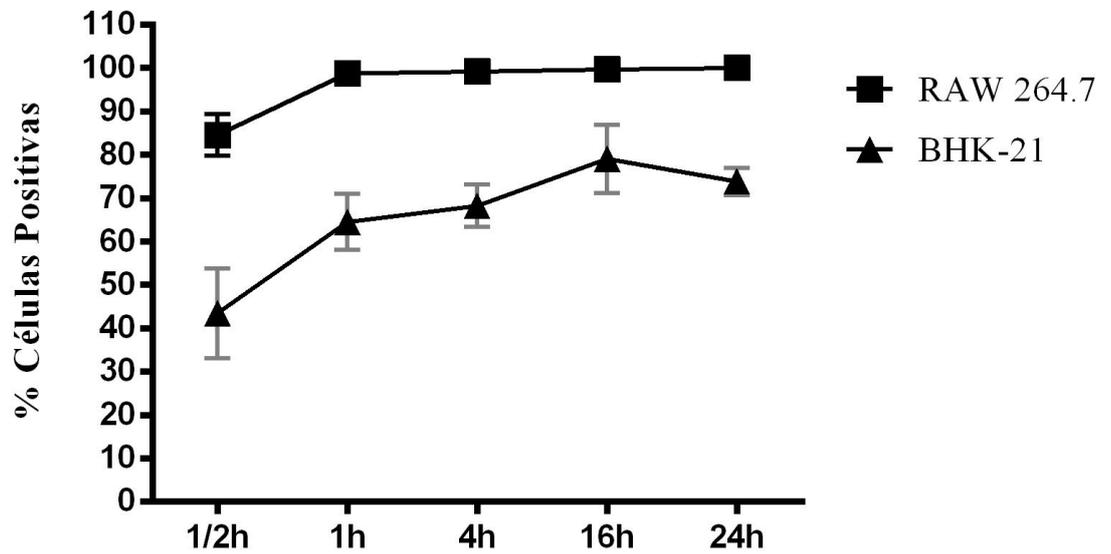


Figura 11 - **Taxa de captura de nanopartículas:** O gráfico acima mostra a porcentagem de células RAW 264.7 e BHK-21 positivas para a captura de nanopartículas nos intervalos de 1/2, 1, 4, 16 e 24 horas.

Fonte: Do autor.

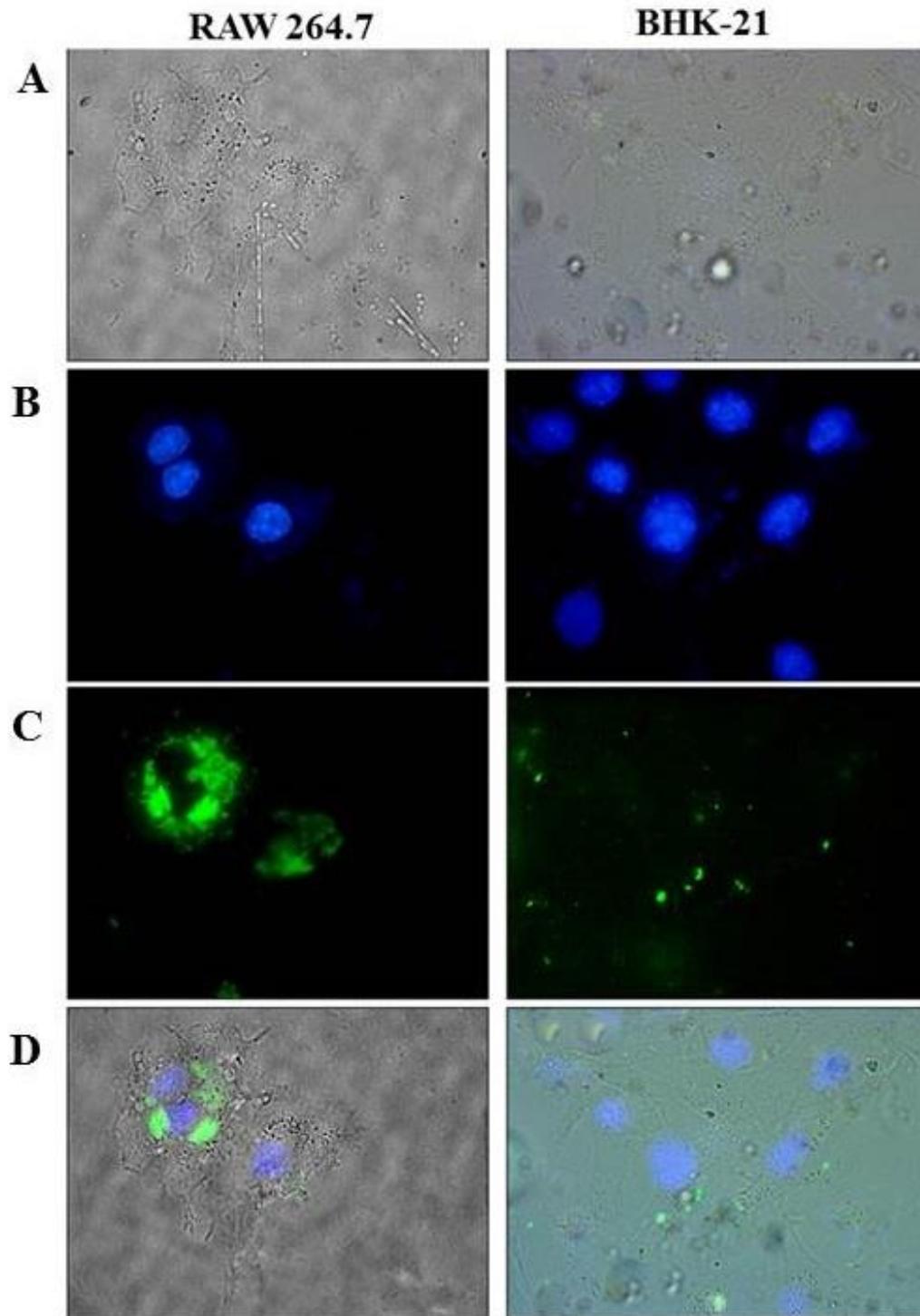


Figura 12 - **Análise da captura de nanopartículas:** Microscopia de fluorescência da análise da captura de NPs por células RAW 264.7 e BHK-21. **A:** Células RAW e BHK em campo claro; **B:** Em azul, núcleo das células RAW e BHK coradas com bisbenzimidide; **C:** Em verde, nanopartículas coradas com FITC; **D:** Imagens sobrepostas (A + B + C) das NPs capturadas pelas células RAW e BHK.

Fonte: Do autor.

5.2 Amplificação, clonagem e expressão do gene da proteína NS1 em plasmídeo pQE-30

A região codificadora da proteína NS1 do DENV-1 foi amplificada por RT-PCR utilizando iniciadores específicos para NS1. O produto amplificado resultante foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (o resultado pode ser visualizado na figura 13). Conforme esperado o fragmento amplificado apresentou o tamanho aproximado de 1100 pares de bases.

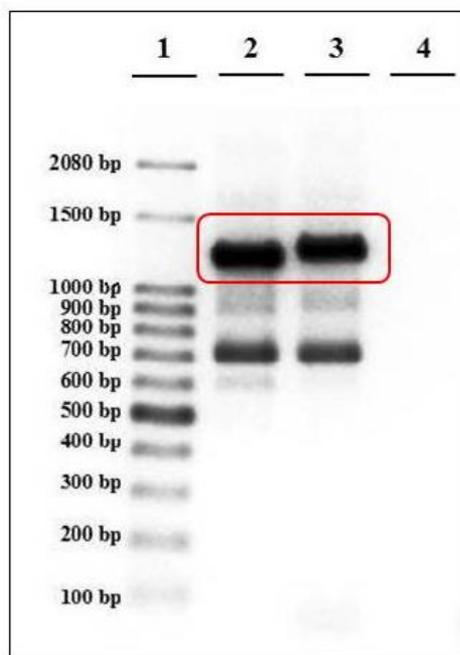


Figura 13 - **Amplificação da região codificadora da proteína NS1 de DENV-1:** Eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed e visualizado sob luz U.V. (1) Marcador de tamanho molecular referente a 100 pares de bases (pb) (Ludwig Biotec, Brasil); (2) e (3) circulos em vermelho, são réplicas referentes ao produto de amplificação utilizando *iniciadores específicos* para NS1; (4) controle negativo

Fonte: Do Autor

O fragmento amplificado foi utilizado para clonagem em vetor pQE-30 e posteriormente o produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias *E.coli* JM109. A presença da sequência codificadora para NS1 em plasmídeo pQE-30 foi confirmada através da realização de PCR para seleção de clones recombinantes utilizando iniciadores específicos

para o plasmídeo. Conforme observado na Figura 14A, todos os clones apresentaram o inserto no tamanho esperado. Para análise da confirmação da presença do gene codificante para NS1, o plasmídeo pQE-30 foi submetido a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Figura 14B). Com a digestão, houve a liberação do fragmento clonado de tamanho esperado (1100pb), confirmando desta forma mais uma vez a presença do inserto.

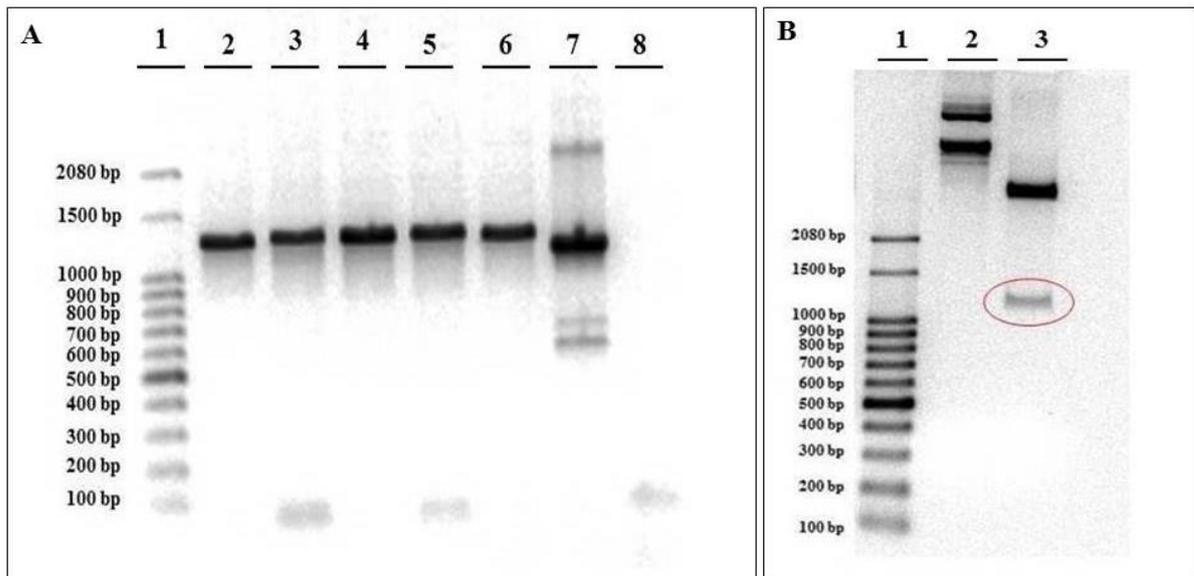


Figura 14 - **A: PCR para confirmação da presença de plasmídeo NS1/pQE- 30:** A) Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da presença da sequência codificadora da NS1 em plasmídeos pQE-30 inseridos em *E.coli* JM109. (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil). (2) a (6) mostram a presença do inserto em todos os clones analisados. (7) Controle positivo: pQE-30/PEPDENV. (8) Controle Negativo. **B) Dupla digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III.** (1) Marcador de tamanho molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil). (2) Plasmídeo pQE-30 não digerido. (3) Plasmídeo pQE-30 digerido pelas enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. O fragmento circulado em vermelho representa a sequência codificadora da proteína NS1 com aproximadamente 1100pb.

Fonte: Do autor.

Para a confirmação da presença da sequência codificadora da proteína de interesse, o plasmídeo recombinante pQE-30/NS1 foi sequenciado (Figura 15) e os resultados revelaram que não houve modificações na janela de leitura do DNA e nenhuma mutação na sequência de nucleotídeo do gene codificador da NS1.



Figura 15 - **Sequenciamento do gene da NS1 do Dengue vírus**: **A**: Em azul claro: Códon de início da tradução presente no plasmídeo pQE30; Em vermelho: sequência codificadora da cauda de histidina; Em azul escuro: Início e fim do gene codificador da proteína NS1 do DENV-1. **B**: Sequência de aminoácidos gerada a partir da tradução do gene da NS1.

Fonte: Do autor.

A transformação bacteriana levou à obtenção de diversas colônias crescidas em placa com os antibióticos de seleção. Para a seleção dos clones recombinantes, algumas colônias foram coletadas da placa e induzidas à produção da proteína recombinante a partir da adição de IPTG ao meio de cultura. Após o término do processo de indução da proteína recombinante, os extratos proteicos foram obtidos e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Conforme esperado, a colônia positiva apresentou diferença no perfil eletroforético antes e após indução, pois os extratos proteicos obtidos a partir das bactérias induzidas com IPTG apresentaram uma banda diferencial de tamanho esperado (50 kDa) (Figura 16). A purificação da proteína recombinante NS1 foi realizada através de cromatografia de afinidade utilizando coluna de Quelato de Níquel, que é capaz de se ligar à

cauda de histidina presente na proteína recombinante NS1. A proteína recombinante foi submetida a um gradiente de pH através do uso de solução de Uréia 8M (pH 8,0, pH 6,0 e pH 4,0). Desta forma, ao final do processo foi possível recuperar a proteína recombinante NS1 após eluição em solução final de Ureia 8M pH 4,0. Após a purificação, a NS1 foi submetida à eletroforese em gel de Poliacrilamida-SDS 12% (Figura 17) onde se observou a presença de um fragmento de peso 50 kDa referente à proteína NS1 purificada.

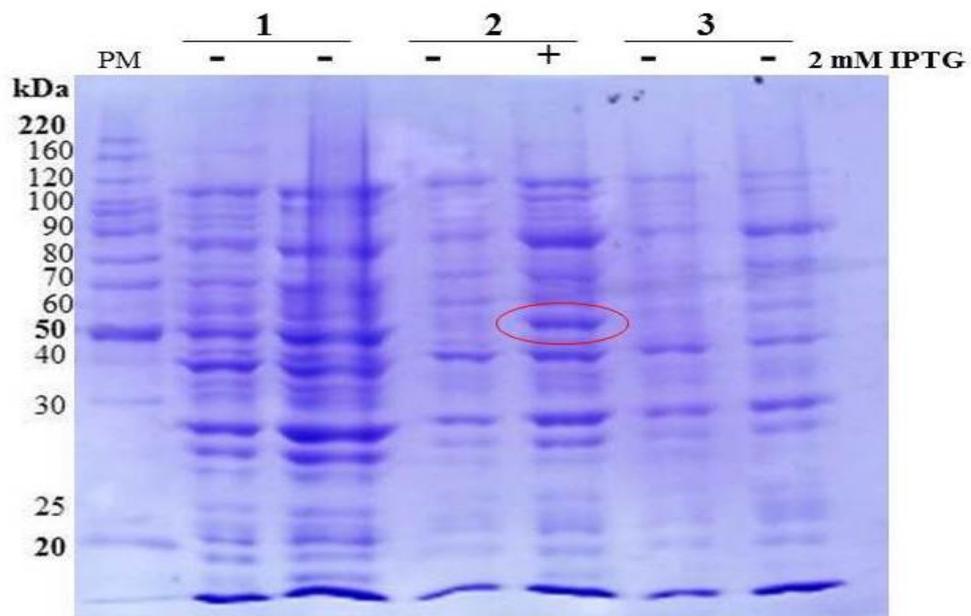


Figura 16 - **Expressão da proteína NS1 a partir de indução com IPTG:** Figura representativa da indução à expressão da proteína recombinante NS1 para clones recombinantes 1, 2 e 3. A indução se deu através da adição de 2 mM de IPTG à cultura bacteriana por 4 horas. Os extratos proteicos obtidos a partir da cultura induzida com IPTG (+) apresentam banda diferencial de aproximadamente 50 kDa quando se comparadas aos extratos proteicos obtidos de culturas não induzidas (-). (PM) Marcador de peso molecular em kilodaltons (kDa) (Invitrogen, EUA); A banda referente à proteína recombinante NS1 está circulado em vermelho.

Fonte: Do autor.

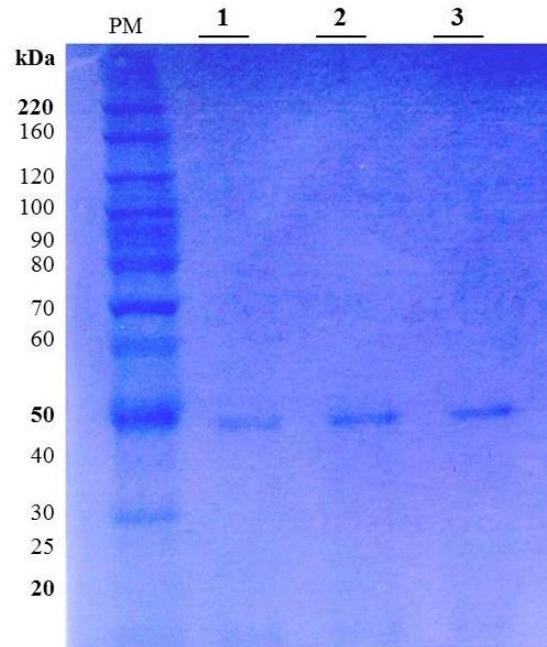


Figura 17 - **Purificação da proteína recombinante NS1 em coluna de Quelato de Níquel:** Gel de Poliacrilamida-SDS 12%. (PM) Marcador de peso molecular em kilodaltons (kDa) (Invitrogen, EUA); (1), (2) e (3) Proteína NS1 purificada (50 kDa) em solução de Ureia 8M pH 4,0.

Fonte: Do autor.

5.3 Histopatologia da Pele após a imunização com as NPs

As alterações histopatológicas induzidas após a imunização dos animais com NP pela via subcutânea na região dorsal foram analisadas pela técnica de hematoxilina e eosina. Esta análise revelou diferenças significativas nas áreas de aplicação entre os animais controles, inoculados com PBS, imunizados com NS1 e os que foram imunizados com as nanopartículas na presença e ausência da NS1 (Figura 18A). Os animais imunizados com as nanopartículas apresentaram uma lesão cutânea característica de um processo inflamatório. As análises histopatológicas demonstraram um aumento da espessura da epiderme, áreas de hiperpigmentação e presença de infiltrado inflamatório na pele dos animais imunizados com NP e NP+NS1 (Figura 18B).

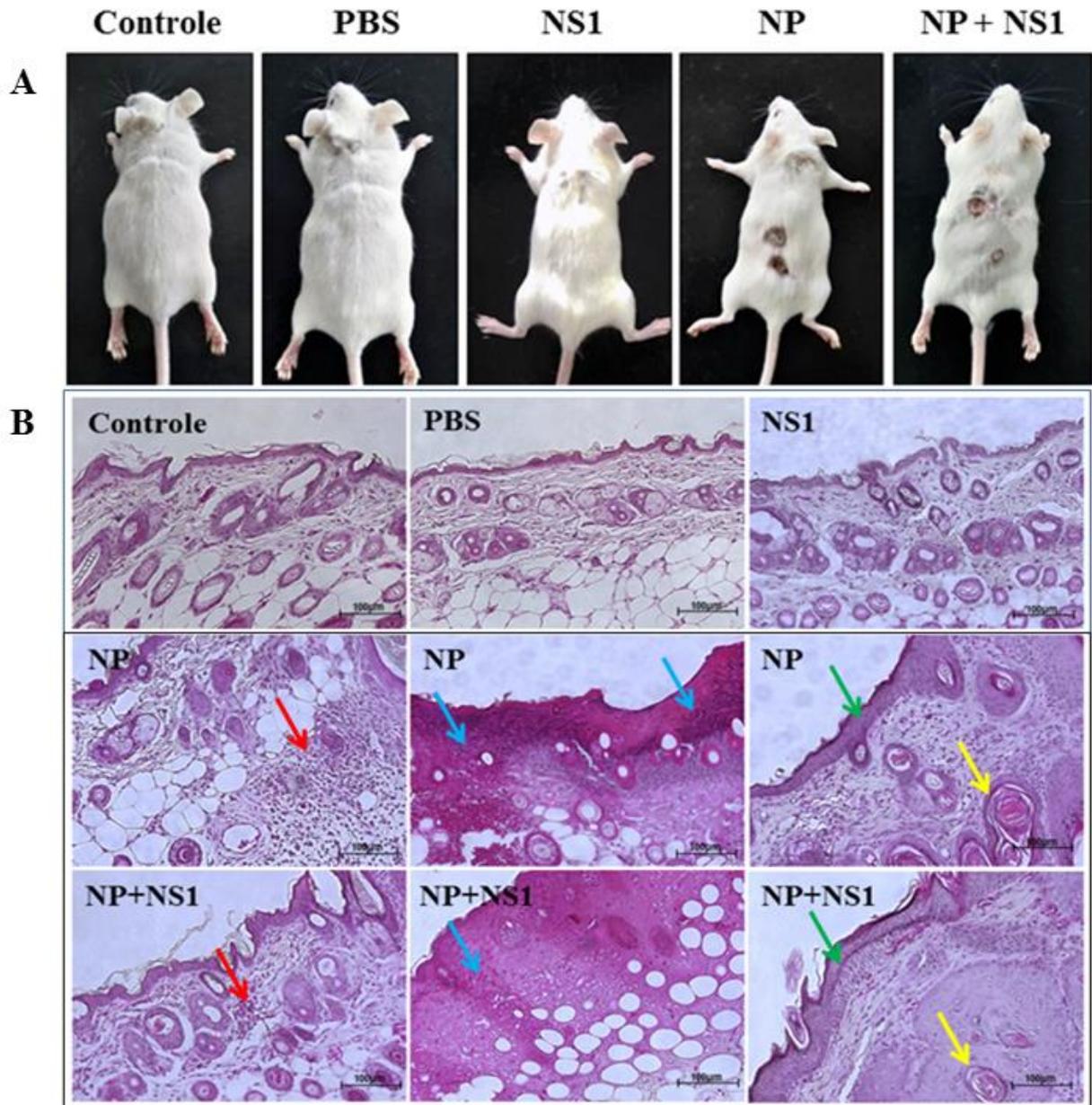


Figura 18 - Análise do efeito da administração de nanopartículas de BSA na pele dos camundongos Swiss. A) Aspecto macroscópico da pele após 7 dias da administração dos tratamentos. B) Análise histopatológica da pele dos animais imunizados após 7 dias da administração dos tratamentos. *Controle* – animais que não foram submetidos a nenhum tratamento; *PBS* – animais imunizados somente com solução salina tamponada (PBS) no pH 8,5; *NS1*- animais imunizados somente com NS1 (30 µg/dose em PBS pH 8,5); *NP* – animais imunizados somente com Nanopartículas (1 mg/dose em PBS pH 8,5); *NP+NS1*- animais imunizados com nanopartículas (1 mg/dose em PBS pH 8,5) e NS1 (30 µg/dose em PBS pH 8,5). **Setas vermelhas:** indicam a presença de infiltrado inflamatório; **Setas azuis:** indicam hiperpigmentação da epiderme; **Setas verdes:** indicam hipertrofia da epiderme; **Setas amarelas:** indicam hipertrofia dos bulbos pilosos.

Fonte: Do autor

5.4 Avaliação da produção de anticorpos IgG total e IgM anti-NS1 em camundongos imunizados

Para avaliar a produção de anticorpos anti-NS1 dos camundongos imunizados com a proteína NS1 associados à nanopartículas, o soro dos animais foi submetido a ensaios de ELISA para quantificação de anticorpos IgG total e IgM usando como antígeno a NS1 recombinante. A tabela 3 mostra que nenhum animal pertencente ao grupo controle negativo (PBS) produziu anticorpos IgM e IgG anti-NS1. Já todos os animais infectados com DENV-1 (controle positivo) apresentaram somente a produção de IgM anti-NS1. A imunização com NS1 (na ausência de NP) induziu a produção de IgM em 66,6% dos animais, enquanto apenas 33,3% dos animais apresentaram produção de IgG anti-NS1. A imunização somente com NP induziu a produção de IgM em 66,6% dos animais, enquanto a imunização com NS1 na presença de NP induziu a produção de anticorpos IgM anti-NS1 em 60% dos animais e IgG anti-NS1 em 80% dos animais.

Tabela 3 - Produção de anticorpos IgM e IgG anti-NS1 após a imunização com NS1 recombinante na presença e ausência de NP.

Grupo experimental	Número de Animais	Porcentagem de animais positivos	
		IgM	IgG
PBS	3	0	0
DENV-1	3	100	0
NS1	4	66,6	33,3
NP	4	66,6	0
NP+NS1	5	60	80

6 DISCUSSÃO

Atualmente os números de casos de dengue no mundo e principalmente no Brasil vêm impulsionando uma busca pelo candidato vacinal ideal contra a doença. A maior dificuldade encontrada neste caminho é a produção de uma vacina que confira imunidade protetora de forma segura e eficaz contra os quatro sorotipos do DENV (1 – 4) ao mesmo tempo (CLYDE et al., 2006; GUZMAN; HARRIS, 2015). Uma vacina ideal deve induzir uma resposta imune durável e protetora contra os quatro sorotipos do DENV, tanto para aqueles indivíduos que não foram expostos ao vírus da dengue quanto para aqueles que foram infectados previamente por um dos sorotipos (GUZMAN; HARRIS, 2015; SCREATON et al., 2015).

O uso da proteína não estrutural 1 do DENV como imunógeno na produção de vacinas tem sido uma alternativa utilizada, uma vez que ela é muito conservada entre seus quatro sorotipos. Ela é encontrada em altos níveis nos casos mais graves da doença, sendo responsável por uma gama de respostas imunológicas no hospedeiro, como por exemplo, a produção de citocinas inflamatórias e o extravasamento de plasma (MODHIRAN et al., 2015).

Neste trabalho, foram produzidas nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA) como sistemas adjuvantes para a imunização com a NS1 recombinante, já que estas apresentam provavelmente uma ação adjuvante. As nanopartículas têm sido amplamente utilizadas como adjuvantes vacinais uma vez que apresentam características que favorecem esta característica, tais como: grandes áreas superficiais que contribuem com grande número de grupos funcionais como, por exemplo, diferentes ligantes, rápida absorção pelo organismo, elevada capacidade de difusão, além de induzir resposta imunológica através da ativação e diferenciação das células imunes (OYEWUMI et al., 2010; NITTA; NUMATA, 2013).

As nanopartículas utilizadas neste trabalho foram produzidas pelo método de coacervação utilizando como material a Albumina Sérica Bovina (BSA). A albumina é um transportador macromolecular biodegradável, atóxico, metabolizado *in vivo* e solúvel em água (ELZOGHBY et al., 2012). Neste trabalho nós demonstramos que é seguro o uso de Albumina na produção de NPs, uma vez que elas não apresentaram citotoxicidade quando incubadas com células macrofágicas RAW 264.7 e células fibroblásticas BHK-21. A Microscopia de Força Atômica mostrou, conforme o esperado, que as NPs apresentaram

forma esférica (Figura 9), e obtiveram valores de diâmetro e potencial Zeta médio que estão entre aqueles encontrados em NPs produzidas em outros trabalhos, que variam de 100 a 900 nm (LI et al., 2008; SILVA et al., 2012; ZHAO et al., 2010; ZU et al., 2009). A variação nos tamanhos das NPs pode ser explicada pelas diferenças nas técnicas de produção de cada uma e vai influenciar diretamente a rota e a forma como a NP vai ser absorvida ou capturada, assim como o tipo de resposta imune humoral ou celular induzida. Foi descrito que partículas com tamanhos entre 20 e 200 nm são normalmente capturadas por endocitose, caracterizando uma resposta imune celular de indução de células T CD4, T CD8. Em contra partida, partículas com tamanhos acima de 500 nm são na maioria das vezes capturadas por fagocitose e/ou pinocitose por células dendríticas ou macrófagos e são mais prováveis de promover uma resposta imune humoral (MOTTRAM et al, 2006; OYEWUMI et al., 2010; XIANG et al., 2006).

O potencial Zeta reflete o potencial elétrico da superfície das nanopartículas e é influenciado pela composição da partícula e do meio em que está disperso. Valores de potencial Zeta relativamente altos ($> \pm 30$ mV) são descritos como importantes para que haja boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal (MARTÍNEZ et al., 2012; MONHANRAJ; CHEN, 2006). As NPs deste trabalho apresentaram um potencial Zeta médio de $-43,8 \pm 3,01$ mV, o que, segundo os autores Monhanraj e Chen, 2006, está entre os valores considerados estáveis e ideais para este sistema. O índice de polidispersão ($\leq 0,3$) indicou a formação de um sistema monodisperso, portanto, com as nanopartículas apresentando uma população de tamanho homogêneo (NEMEN; LEMOS-SENN, 2011).

O potencial das NPs como adjuvante foi avaliada através da taxa de captura de dois tipos celulares com características distintas, as células macrofágicas RAW 264.7 e células fibroblásticas BHK-21. O que se observou foi que as células RAW 264.7 apresentaram uma taxa de captura maior que as células BHK-21. Após apenas meia hora de incubação com as NPs fluorescente, mais de 80% das células RAW 264.7 já haviam fagocitado as NPs fluorescentes enquanto que apenas cerca de 40% das BHK apresentaram positividade no teste de captura. Após 1 hora de incubação 100% das células RAW já se apresentavam positivas, resultado que se manteve até o último tempo de incubação de 24 horas, enquanto que as células BHK-21 atingiram no máximo 70% de positividade para o resultado de captura neste mesmo tempo. Este resultado sugeriu que as células RAW 264.7 possuem características biológicas que favorecem a captura de NP de BSA (Figura 11), o que se confirmou nas

análises de Microscopia de Fluorescência onde se observa uma intensidade maior de sinal de fluorescência FITC (utilizadas na preparação das nanopartículas) em células RAW 264.7 se comparado com o sinal observado em células BHK-21 (Figura 12). Esta diferença de comportamento na captura de NPs (+FITC) pode ser explicada devido a diferenças nas características destes dois grupos celulares.

As células RAW 264.7 macrofágicas possuem características de captura por fagocitose. Seus fagossomos são capazes de capturar partículas com diâmetros acima de 250 nm (YAMEEN et al, 2014). O processo de fagocitose ocorre através da interação entre receptores presentes na superfície do agente exógeno e de receptores encontrados na superfície da célula fagocitária, no caso da albumina existem uma variedade de receptores que são reconhecidos por uma gama de tipos celulares, porém, é descrito que as células macrofágicas possuem receptores para albumina chamados gp18 e gp30 (LARSEN et al, 2016; MERLOT et al, 2014), portanto sendo estes os prováveis receptores reconhecidos pelas células RAW 264.7 durante a fagocitose das nanopartículas de BSA. No caso de células fagocíticas, a morfologia da nanopartícula influencia diretamente no processo de fagocitose. Champion e colaboradores, 2006; 2009 descreveram que a geometria da partícula pode auxiliar na modulação da sua internalização através da fagocitose devido ao favorecimento dos ângulos de contato entre esta e a membrana da célula, e que partículas mais alongadas com proporções mais elevadas são menos propensas a fagocitose. A morfologia esférica da NP deste trabalho pode ser mais um fator que favorece a sua captura. O mecanismo de reconhecimento de albumina e captura de NPs por células BHK-21 ainda não está totalmente esclarecido. O que se sabe é que estas células fibroblásticas, oriundas de rim de Hamster podem reconhecer a albumina através da ação conjunta de receptores Cubilina e Megalina. Trabalho recente de Merlot e colaboradores (2014), descreve que a cubilina juntamente com a megalina possuem um papel essencial na captura de albumina nas regiões do túbulo proximal dos rins e que a deficiência destes em ratos e cachorros mostrou ser a causa de uma diminuição da absorção de albumina pelo túbulo proximal, resultando em um quadro de albuminúria ou deficiência de albumina (BIRN et al, 2000; MERLOT et al, 2014; ZHAI et al, 2000). Embora não se conheça o mecanismo exato de captura de NPs de BSA pelas células BHK-21, sabe-se que elas não possuem a mesma eficiência neste aspecto se comparadas com as células RAW 264.7, porém, mesmo com esta diferença, o que ficou comprovado é que as NPs podem ser capturadas por ambos os tipos celulares.

Para a utilização da NS1 como imunógeno no sistema proposto, primeiramente a sequência codificadora da NS1 foi obtida por RT-PCR e clonado em vetor de expressão pQE-30 (Qiagen, Alemanha). O sucesso da expressão de NS1 no sistema procarioto foi confirmado em eletroforese em gel de poliacrilamida, onde foi possível observar a banda diferencial expressa referente ao peso molecular esperado de 50 kDa (Figura 16). Muitos estudos observaram que a NS1 recombinante expressa em diferentes sistemas heterólogos (bactérias, leveduras ou células de mamíferos) retém a sua antigenicidade, sendo capaz de ativar o sistema imunológico ou de serem reconhecidas por anticorpos monoclonais ou policlonal anti-NS1 (AMARO et al., 2015; AMORIM et al., 2010; ATHMARAM et al., 2013; DAS et al., 2009; HUANG et al., 2001; NOISAKRAN et al., 2007; ROZEN-GAGNON et al., 2012; SANKAR et al., 2013; YOHAN et al., 2016; ZHOU et al., 2006). Desta forma, a expressão de NS1 em sistema procarioto pode ser benéfica para a inclusão deste antígeno em uma vacina para a dengue, pois este sistema de produção de proteínas recombinantes é o que apresenta menor custo de produção de proteína recombinante por litro de cultura (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Após os testes de viabilidade das NPs de BSA *in vitro*, foram realizadas análises histopatológicas *in vivo* utilizando camundongos Swiss. Após a imunização via subcutânea observou-se resposta diferenciada acentuada entre os animais do grupo controle (PBS e NS1) dos animais que receberam as imunizações com NPs e com NPs associadas à NS1. Estes últimos apresentaram uma epiderme com espessamento na região da aplicação da dose, aumento das regiões dos bulbos pilosos, áreas de hiperpigmentação e infiltrado inflamatório demonstrando a resposta inflamatória das imunizações realizadas na presença de NPs.

A imunização via subcutânea tem sido descrita como uma via apropriada pelo fato de existir uma densa rede de APCs da derme, principalmente, do infundíbulo inferior do folículo piloso (VOGT et al, 2005; VOGT et al, 2016; PAPAKOSTAS et al, 2011).

O uso de NP como adjuvante vem sendo utilizado nos últimos anos como estratégia no processo da ativação da resposta imune, uma vez que, a imunização utilizando apenas os compostos desejados pode ser uma estimulação fraca para o sistema imune quando administrados através da pele. O trabalho de Mahe e colaboradores (2008) mostrou que, vacinas de NPs aplicadas em murinos pela via intradérmica são capazes de penetrar pelo ducto pilofolículo, se translocar pelo tecido perifolículo e serem capturadas por APCs

dérmicas e epidérmicas, que posteriormente migram para os linfonodos proximais gerando uma resposta imune após a administração com DNA, proteína ou vírus.

As análises histopatológicas dos camundongos imunizados com as nanopartículas mostraram um aumento dos bulbos pilosos e de infiltrado inflamatório. Há, portanto, uma resposta inflamatória na região da pele onde foram administradas as doses de NPs e NPs+NS1, o que não foi observado nos outros grupos experimentais (controle, PBS e NS1). Estas diferenças podem ser atribuídas ao efeito adjuvante que as NPs de BSA exercem, embora uma análise mais profunda deva ser realizada para se detectar que tipo de células são recrutadas ao local de imunização e qual tipo de resposta imune ocorre após este tipo de imunização (Th1, Th2 ou Th17).

Já foi demonstrado que as nanopartículas biodegradáveis de albumina sérica podem atuar como sistema de entrega de antígenos e indução de anticorpos para o *Dengue vírus* (vírus inativado) e para a *Pseudomonas aeruginosa* (antígenos totais) (RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2012). Este trabalho vem corroborar com o poder adjuvante das NP de BSA, uma vez que os camundongos imunizados com a NS1 na presença de NP foram capazes de produzir anticorpos anti-NS1 (60% produziram IgM e 80% produziram IgG). O uso de camundongos heterogênicos (*Swiss*) pode explicar por que alguns animais responderam melhor ao processo de imunização e outros não. Apesar disso, é evidente a mudança de perfil entre o grupo imunizado com NS1 e o imunizado com NS1 na presença das NPs. A porcentagem de camundongos produtores de IgG anti-NS1 foi maior no grupo de animais imunizados somente com NS1 na presença de NP (80%) se comparado ao grupo imunizado somente com NS1 (33,3%). Esta diferença pode estar relacionada com o perfil adjuvante das NP, que ao serem administradas em conjunto com a NS1, foram capazes de induzir uma troca de classe mais rápida, levando à produção de plasmócitos secretores de IgG.

Sabe-se que existe uma correlação positiva entre a alta concentração de NS1 no plasma de pacientes e o agravamento dos sintomas nestes pacientes, principalmente aqueles relacionados com o extravasamento de plasma (AVIRUTNAN et al., 2006; LIBRATY et al., 2002). A produção de anticorpos anti-NS1 pode ser benéfica na prevenção das formas mais graves da doença, pois já foi demonstrado que anticorpos contra a NS1 solúvel pode inibir a sua ligação aos receptores TLR e conseqüentemente a cascata de sinalização desencadeada por estes receptores da imunidade inata (CHEN et al., 2015; MODHIRAN et al., 2015). A ligação dos anticorpos anti-NS1 à proteína inibe a produção de citocinas, principalmente IL-6

e TNF- α , que induzem o extravasamento vascular induzido pela NS1 (BEATTY et al., 2015). Conforme discutido anteriormente, houve a produção de anticorpos anti-NS1 após a imunização com a NS1 recombinante na presença de NP em alguns animais. Entretanto, ensaios de inibição da ligação da NS1 aos receptores TLR deverão ser realizados a fim de se comprovar se estes anticorpos anti-NS1 possuem esta capacidade.

7 CONCLUSÃO

- a) As nanopartículas de BSA produzidas neste estudo apresentaram morfologia esférica e parâmetros físicos [carga (-43,8 mV) e diâmetro médio (431,9 nm)] adequados;
- b) Os ensaios *in vitro* demonstraram que estas NP não apresentam citotoxicidade em cultura de células RAW 264.7 e BHK-21 e foram facilmente capturadas por estes dois tipos celulares;
- c) Experimentos *in vivo*, mostraram que as NP são capazes de induzir um processo inflamatório na pele de camundongos *Swiss* após a inoculação;
- d) A proteína recombinante NS1 do DENV-1 foi expressa e purificada em sistema procarioto com sucesso;
- e) A imunização de camundongos *Swiss* com a NS1 recombinante na presença das NP, foi capaz de levar a uma produção de anticorpos IgG anti-NS1, confirmando assim, o poder adjuvante destas NP;
- f) **Futuras Perspectivas:** Verificar se os anticorpos anti-NS1 produzidos são capazes de inibir a ligação da NS1 aos receptores TLR, e desta forma contribuir para a diminuição da secreção de citocinas envolvidas no extravasamento de plasma e no agravamento dos sintomas causados pela infecção do DENV.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, S. et al. Cationic Albumin Nanoparticles for Enhanced Drug Delivery to Treat Breast Cancer: Preparation and In Vitro Assessment. **Journal of Drug Delivery**, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. **Advances in Polymer Science**, v. (2012) 247, p. 31-64, 2011.
- ALLONSO, D. et al. Dengue virus NS1 protein modulates cellular energy metabolism by increasing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. **Journal of Virology**. September, 2015.
- AMARO, M. O. F. et al. Antigen production using heterologous expression of dengue virus-2 non-structural protein 1 (NS1) in *Nicotiana tabacum* (Havana) for immunodiagnostic purposes. **Plant Cell Reports**, v. 34, n. 6, p. 919-928, 2015.
- AMORIN, J. H. et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, v. 167, p. 186-192, 2010.
- ANGEL, R. M. DEL; VALLE, J. R. Dengue Vaccines : Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 9–12, 2013.
- APTE-SENGUPTA, S., SIROHI D., AND K. J. R. Coupling of Replication and Assembly in Flaviviruses. **Current Opinion Microbiology**, v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2014.
- ATHMARAM, T. M. et al. Optimization of Dengue-3 recombinant NS1 protein expression in *E. coli* and in vitro refolding for diagnostic applications. **Virus Genes**, v. 46, p. 219-230, 2013.
- AVIRUTNAN, P. et al. Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1078-1088, 2006.

BACK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, n. 0, p. 1–21, 2013.

BEATTY, P. R. et al. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. **Science translational medicine**, v. 7, n. 304, p. 304ra141, 2015.

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

BIRN, H. et al. Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 10, p. 1353–1361, 2000.

BLOK, J. Genetic relationships of the dengue virus serotypes. **The Journal of general virology**, v. 66 (Pt 6), n. 1985, p. 1323–1325, 1985.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418–11431, 2006.

CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Role of target geometry in phagocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 103, n. 13, p. 4930–4934, 2006.

CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 1, p. 244–249, 2009.

CHAWLA, P.; YADAV, A.; CHAWLA, V. Clinical implications and treatment of dengue. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 3, p. 169–178, 2014.

CHEN, J. et al. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **PLOS Pathogens**, v. 1 (7), p. 1–34, 2015.

CHO, J.; CARUSO, F. Investigation of the interactions between ligand-stabilized gold nanoparticles and polyelectrolyte multilayer films. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 17, p. 4547–4553, 2005.

CHONG, S. W. C. et al. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 85-99, 2005.

DAI, H. et al. Chitosan-DNA nanoparticles delivered by intrabiliary infusion enhance liver-targeted gene delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 507–522, 2006.

DAS, D.; MONGKOLAUNGKON, S.; SURESH, M. R. Super induction of dengue virus NS1 protein in E. coli. **Protein Expression and Purification**, v. 66, p. 66-72, 2009.

DENGUE VACCINE INITIATIVE. Vaccine Development. 2015. Disponível em: < <http://www.denguevaccines.org/vaccine-development> > . Acesso em 15 Jan. 2016.

DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 488–492, 2015.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

EDELING, M. A; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 11, p. 4285–90, 2014.

ELSABAHY, M; WOOLEY, K. L. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 12, p. 5552–5576, 2013.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 157, n. 2, p. 168–82, 2012.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of virology**, v. 65, n. 5, p. 2467–2475, 1991.

FARES, R. C. G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

GRADISHAR, W. J. et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 31, p. 7794-7803, 2005.

GREGORY, A. E. Vaccine delivering using nanoparticles. **Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 13, p. 1-13, 2013.

GUTIERRO, I. et al. Size dependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA loaded nanospheres. **Vaccine**, v. 21, p. 67–77, 2002.

GUY, B. et al. Vaccination against Dengue: Challenges and Current Developments. **Annual Review of Medicine**, v. 18, n. 1, p. 387–404, 2015.

GUY, B.; JACKSON, N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 45–54, 2015.

GUZMAN, M. G. et al. Europe PMC Funders Group Dengue : a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12 0, p. 1–26, 2010.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, 2015.

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

HALSTEAD, S. B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement : Knowns and Unknowns. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–18, 2014.

HEDAYATI, R. et al. Fabrication and characterization of albumin-acacia nanoparticles based on complex coacervation as potent nanocarrier. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 1401-1408, 2012.

HOLMAN, D. H. et al. Two Complex, Adenovirus-Based Vaccines That Together Induce Immune Responses to All Four Dengue Virus Serotypes. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 2, p. 182–189, 2007.

HUANG, J. L. et al. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. **Journal of Medical Virology**, v. 65, n. 3, p. 553-560, 2001.

INSTITUTO BUTANTAN. Vacina da Dengue. 2013. Disponível em:
< <http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-4538.pdf> >. Acesso em: 22 jan. 2016.

KANCHAN, V.; PANDA, A. K. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. **Biomaterials**, v. 28, p. 5344-5357, 2007.

KLINMAN, D. M. et al. DNA vaccines: safety and efficacy issues. **Springer Seminar in Immunopathology**, v. 19, n. 2, p. 245-56, 1997.

KONG, B. et al. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine (Lond)**, v. 6, n. 5, p. 929-941, 2011.

KREUTER, J. Drug targeting with nanoparticles. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 19, n. 3, p. 253-256, 1994.

LANGER, K. et al. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journals of Pharmaceutics**, v. 257, p. 169-180, 2003.

LARSEN, M. T. et al. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. **Molecular and Cellular Therapies**, v. 4, n. 3, 2016.

LI, F. Q. et al. Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for live targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, n. 1, p. 274-282, 2008.

LI, Y. et al. Secondary structure and membrane topology of dengue virus NS4B N-terminal 125 amino acids. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1848, n. 12, p. 3150–3157, 2015.

LIBRATY, D. H. et al. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1165-1168, 2002

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23–61, 2003.

MAHE, B. et al. Nanoparticle-based targeting of vaccine compounds to skin antigen presenting cells by hair follicles and their transport in mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 5, p. 1156–1164, 2008.

MANOLOVA, V. et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 5, p. 1404–1413, 2008.

MARCATO, P. D.; DÚRAN, N. New Aspects of Nanopharmaceutical Delivery Systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 1-14, 2008.

MARTÍNEZ, A. et al. Tamoxifen-loaded thiolated alginate-albumin nanoparticles as antitumoral drug delivery systems. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 100A, n.6, p. 1467-1476, 2012.

MERCADO-CURIEL, R. F.; BLACK, W. C.; MUÑOZ, M. D. L. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. **BMC microbiology**, v. 8, n. 6, p. 118, 2008.

MERLOT, A. M. et al. Unraveling the mysteries of serum albumin – more than just a serum protein. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. 299, p. 1-7, 2014.

MERODIO, M. et al. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. **Pharmaceutical Sciences**, v. 12, p. 251-259, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Dengue. 2016. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue> >. Acesso em: 15 jan. 2016.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Science translational medicine**, v. 7, n. 304, p. 304ra142, 2015.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006.

MOTTRAM, P. L., et al. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. **Molecular Pharmaceutics**. V. 4, n. 1, p. 73–84, 2006.

MÜLLER, B. G. et al. Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting: An optimized manufacturing technique. **Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 32-37, 1996.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 587–619, 2011.

MURTHY, S. K. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. **International journal of nanomedicine**, v. 2, n. 2, p. 129–141, 2007.

NATARAJAN, S. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 214–219, 2010.

NEMEN & LEMOS-SENNA. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408-413, 2011.

NEWMAN, K. D., et al. Uptake of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells *in vivo*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 60, n. 3, p.480–486, 2002.

NOISAKRAN, S., et al. Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. **Journal of Virological Methods**, v. 142, p. 67-80, 2007.

NITTA, S.; NUMATA, K. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1629–1654, 2013.

NORMILE, D. Surprising new Dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342. n. 6157, p. 415, 2013.

O'HAGAN, D. T.; RAPPUOPLI, R. Novel Approaches to Vaccine Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 9, p. 1519-1530, 2004.

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the Discovery and delivery of Vaccine adjuvants. **Nature Reviews: Drug Delivery**, v. 2, p. 727-735, 2003.

OROZCO, S., et al. Characterization of a model of lethal dengue virus 2 infection in C57BL/6 mice deficient in the alpha/beta interferon receptor. **The Journal of general virology**, v. 93, n. Pt 10, p. 2152–7, 2012.

OUSSOREN, C.; STORM, G. Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 1–2, p. 143–156, 2001.

OYEWUMI, M. O.; KUMAR, A.; KUI, Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses. **Expert Review Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1095–1107, 2011.

PASQUALE, A. D. et al. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. **Vaccines**, v.3, p. 320-343, 2015.

PATIL, Y.; PANYAM, J. Polymeric Nanoparticles for siRNA Delivery and Gene Silencing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, p. 612–626, 2009.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WHO, Dengue Cases, Americas, 2014. Disponível em <<http://www.paho.org>> . Acesso em 25 de Nov. de 2015.

PAPAKOSTAS, D. et al. Nanoparticles in dermatology. **Archives of Dermatological Research**, v. 303, n. 8, p. 533-550, 2011.

PAWITAN, J. A. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. **Acta Medica Indonesiana**, v. 43, n. 2, p. 129–35, 2011.

PERERA, R.; KUHN, J. Stuctural Proteomics of Dengue Virus. **Current Opinion Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 369–377, 2008.

PITAKSUTEEPONG, T. Nanoparticles : A Vaccine Adjuvant for Subcutaneous Administration. **Naresuan University Journal**, v. 13, n. 2, p. 53–62, 2005.

RAHIMNEJAD, M.; JAHANSHAH, M.; NAJAFPOUR, G. D. Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin for drug delivery. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, p. 1918-1923, 2006.

RAMAKRISHNAN, L.; RADHAKRISHNA PILLAI, M.; NAIR, R. R. Dengue Vaccine Development: Strategies and Challenges. **Viral Immunology**, v. 28, n. 2, p. 76–84, 2015.

REBOUÇAS, J. D. S et al. Nanoparticulate Adjuvants and Delivery Systems for Allergen Immunotherapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-13, 2012.

REDDY, S. et al. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. **Trends of Immunology**, v. 27, p. 573-9, 2006.

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

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, 2010.

RODRIGUES, N. F. et al. Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 44, p. 5062–6, 2013.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 172, p. 1-17, 2014.

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

ROY, K. et al. Oral gene delivery with chitosan–DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. **Nature Medicine**, v. 5, n. 4, p. 387-391, 1999.

ROZEN-GAGNON, K. et al. Expression and immunoaffinity purification of recombinant dengue virus 2 NS1 protein as a cleavable SUMOstar fusion. **Protein Expression and Purification**, v. 82, p. 20-25, 2012.

SANKAR, S.G. et al. High-Level Expression of Functionally Active Dengue-2 Non-Structural Antigen 1 Production in *Escherichia coli*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015.

SILVA, E. F. et al. A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 13, 2012.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. Advances in Vaccine Adjuvants. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1075-1081, 1999.

SOPPIMATH, S. K. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

STORNI, T. et al. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 333-355, 2005.

SUNDAR, S.; KUNDO, J.; KUNDU, S. C. Biopolymeric Nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, p. 1-13, 2010.

TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, p. e2520, 2013.

VOGT, A. et al. Follicular Targeting—A Promising Tool in Selective Dermatotherapy. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, n. 3, p. 252-255, 2005.

VOGT, A. et al. Transcutaneous Anti-Influenza Vaccination Promotes Both CD4 and CD8 T Cell Immune Responses in Humans. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1482-1489, 2016.

WEBER, C. et al. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 91-102, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p. 147, 2009.

YAMEEN, B. et al. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 485-489, 2014.

YANG, Y. Y. et al. Polymeric core-shell nanoparticles for therapeutics. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 5-6, p. 557–562, 2006.

YOHAN, B. et al. Production of recombinant dengue non-structural 1 (NS1) proteins from clinical virus isolates. **Protein Expression and Purification**, v. 129, p. 53-59, 2016.

XIANG, S. D., et al. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2006.

ZHAI, X. Y. et al. Cubilin- and megalin- mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. **Kidney International**, v. 58, p. 1523–1533, 2000.

ZHAO, D. et al. Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 669–677, 2010.

ZHOU, J. M. et al. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. **Virus Genes**, v. 33, p. 27-32, 2006.

ZU, Y. et al. Optimization of the preparation process of vinblastine sulfate (VBLS)-loaded folate conjugated bovine serum albumin (BSA) nanoparticles for tumortarget drug delivery using response surface methodology (RSM). **International Journal of Nanomedicine**, v. 2009, n. 4, p. 321-333, 2009.

ANEXO

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA AO USO DE ANIMAIS (CEAU- UNIFAL)



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

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Produção de nanopartículas contendo antígenos do *Dengue vírus 2* e avaliação de seu potencial vacinal em modelo murino", registrada com o nº 696/2015, sob a responsabilidade de Luiz Felipe Leomil Coelho – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em reunião de 14/04/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 14/04/2016 a 01/03/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	50
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 15 de abril de 2016.

Estela Regina de Oliveira

Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
 Coordenadora CEUA-UNIFAL