



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Elisabete Rodrigues do Monte Silva

**Efeito do peptídeo EL28 como adjuvante da
vacina DENV3E**

São José do Rio Preto

2019

ELISABETE RODRIGUES DO MONTE SILVA

Efeito do peptídeo EL28 como adjuvante da vacina
DENV3E

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Doutor no Curso
de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
Co-orientador(a): Prof. Dra. Vivian C. Vasconcelos

São José do Rio Preto
2019

R. Monte, Elisabete

Efeito do peptídeo EL28 como adjuvante de vacina DENV3E / Elisabete R. Monte

São José do Rio Preto, 2019

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Co-orientadora: Prof(a). Dr(a). Vivian C. Vasconcelos

1. Dengue 2. Vacina; 3. Vacina de subunidade; 4. Adjuvante.

ELISABETE RODRIGUES DO MONTE SILVA

Efeito do peptídeo EL28 como adjuvante da vacina DENV3E

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

2º Examinador: Dra. Alice Freitas Versiani

3º Examinador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

4º Examinador: Dra. Ana Carolina Colombelli Pacca Mazaro

5º Examinador: Dr. Mânlio Tasso de Oliveira Mota

Suplentes: Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos; Dra. Paula Rahal; Dr. Margarete

Teresa Gottardo de Almeida; Dra. Carolina Colombelli Pacca Mazaro, e; Dr. Nathalia Zini

São José do Rio Preto, ___/___/___.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
EPÍGRAFE.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. Objetivo Geral.....	11
1.2.1. Objetivo Específico.....	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1. Proteína Recombinante (DENV3E), Peptídeo EL28 e Vírus.....	13
2.2. Modelo Animal.....	13
2.3. Imunização e Infecção.....	14
2.4. Análises Hematológicas.....	15
2.5. Citometria de Fluxo.....	15
2.6. Elisa.....	17
2.7. Ensaio de Permeabilidade Vascular.....	17
2.8. Análise Estatística.....	18
3. RESULTADOS.....	19
3.1. Avaliação de possíveis alterações hematológicas após imunização com pE+EL28.....	19
3.2. Citometria de fluxo.....	21
3.2.1. Análise da proliferação de linfócitos do tipo T CD8⁺ e T CD4⁺.....	21
3.2.2. Análise da expressão de IFN-γ e de marcadores de superfície de células ativadas, células T de memória central e efetora, em linfócitos do tipo T CD8⁺ e T CD4⁺.....	23

3.3. ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	34
3.3.1. Avaliação da secreção de citocinas.....	34
3.4. Ensaio de Permeabilidade Vascular (Modelo de perfusão Evans Blue).....	35
4. DISCUSSÕES.....	37
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu amigo, conselheiro e consolador, que me sustenta e renova as minhas forças a cada manhã.

Ao meu orientador Dr. Maurício Lacerda Nogueira, por me acolher por duas vezes em seu laboratório, sem demonstrar preconceitos equivocados devido à situação atual em que me encontrava. Por concordar e providenciar local adequado para que os experimentos, referentes à proposta de pesquisa que apresentei, fossem realizados. Muito obrigada pela forma que você faz parecer tudo tão simples e prático de resolver, mesmo perante um tempo limitado.

À minha co-orientadora, Dra. Vivian Vasconcelos Costa, uma profissional incrível e uma pessoa extraordinária, por ser tão acessível e disponível em realizar, pelo carinho e atenção que me recebeu em seu laboratório. À Ingredy, Michele, Raissa e Thaís, por terem me ajudado na realização dos experimentos, ensinando, auxiliando e ajudando nas interpretações e discussões dos resultados. Vocês são excepcionais.

À Geórgia, amiga, conselheira e incentivadora. Presente mais lindo que ganhei durante essa jornada.

Aos meus pais, que me ensinaram a caminhar e assim poder seguir meus próprios passos. Por cada oração que dedicaram a mim, as quais me fizeram encontrar força necessária para prosseguir. Pela educação que me deram e por sempre estarem ao meu lado, tanto nas alegrias como nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos que torcem e se alegram com as minhas conquistas, cada uma expressando de forma diferente, dentro de suas particularidades. Na irmandade encontro apoio e inspiração.

Ao meu marido, por me acompanhar e apoiar nessa minha busca incessante por conhecimento, por vibrar e gritar “eureca” comigo quando eu chegava na solução de algum problema, mesmo não entendendo “bulhufas” do que eu estava falando. Isso é amor!

À minha filha, Alice, a flor mais linda do meu jardim. Criança carinhosa, determinada e parceira que Deus me concedeu para amar e orientar. Muitas vezes ela foi o motivo de eu não desistir. Você me faz um ser humano melhor, filha!

E por fim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação. O meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

Se o cérebro determina que o fracasso é o resultado provável, o corpo não sai do lugar. A motivação só acontece quando a mente manda o sinal de que há pelo menos 50% de chance de uma atividade ser bem-sucedida. É a antecipação do sucesso e a sensação de uma recompensa futura que estimulam uma pessoa a se dedicar a uma tarefa, por mais desgastante que seja.

Suzana Herculano Houzel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da incidência de dengue por Região de Saúde, Brasil, até a Semana Epidemiológica 34 de 2019.....	1
Figura 2. Imagem esquemática da resposta imune do hospedeiro à infecção por DENV...2	2
Figura 3. Figuras esquemáticas das hipóteses para o desenvolvimento de dengue grave..4	4
Figura 4. Imagem esquemática do proteassomo 26S e seus componentes.....8	8
Figura 5. Imagem ilustrativa da expressão do proteassomo imune e do regulador PA28 (11s) sob indução de IFN- γ9	9
Figura 6. Desenho experimental do esquema de imunização e infecção.....14	14
Figura 7. Desenho experimental do esquema de imunização e infecção para ensaio com azul de Evans.....17	17
Figura 8. Avaliação das alterações hematológicas após imunização com EL28+pE e desafio com o DENV-3..... 18 e 19	18 e 19
Figura 9. Efeito do peptídeo EL28 na proliferação de esplenócitos totais, linfócitos T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺20 e 21	20 e 21
Figura 10. Efeito do peptídeo EL28 na expressão de IFN- γ por linfócitos do tipo T CD8 ⁺22 e 23	22 e 23
Figura 11. Efeito do peptídeo EL28 na expressão de IFN- γ por linfócitos do tipo T CD4 ⁺24 e 25	24 e 25
Figura 12. Efeito do peptídeo EL28 na expressão de CD69 por linfócitos do tipo T CD8 ⁺26 e 27	26 e 27
Figura 13. Efeito do peptídeo EL28 na expressão de CD69 por linfócitos do tipo T CD4 ⁺28 e 29	28 e 29
Figura 14. Distinção entre células T de memória central e memória efetora.....29 e 30	29 e 30
Figura 15. Gráficos demonstrativo da avaliação da secreção de citocinas por ensaio de ELISA.....32 e 33	32 e 33

Figura 16. Quantificação do extravazamento do corante azul de Evans no tecido hepático.....34

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Grupos experimentais e tratamentos.....10

Tabela 2. Marcações para ensaio de Citometria de Fluxo.....12

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- μg: micrograma
- μL: microlitro
- μM: micromolar
- A129: camundongo imunocomprometido deficiente para os receptores IFN- α/β
- ADE: *antibody-dependent enhancement*
- AG129: camundongo imunocomprometido deficiente para o receptor IFN- α/β e γ
- Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCs: células apresentadoras de antígeno
- AS03: adjuvante de emulsão *oil-in-water* composto de esqualeno
- AS03: adjuvante de vacina - óleo em água a base de esqualeno
- AS04: adjuvante a base de sal de alumínio e agonista de TLR4
- AS04: adjuvante de vacina – hidróxido de alumínio + monofosforil lipídico A
- BOD: demanda bioquímica de oxigênio
- BSA: soro albumina bovina
- C57/Bl6: camundongos de linhagem imunocompetente
- C6/36: linhagem celular originada do mosquito *Aedes Albopictus*
- CD45: proteína marcadora de ativação de célula T
- CD62L: proteína marcadora de células T naïve
- CD69: proteína marcadora de ativação precoce de célula T
- ConA: Conavalina A
- ConA: Concanavalin A. Lectina a qual possui habilidade para estimular linfócitos T
- CPP: peptídeo de penetração celular
- DC: célula dendrítica
- DENV-1,2,3 e 4: vírus do dengue sorotipo 1, 2, 3 e 4
- DENV3E: construção da proteína E truncada em sua região transmembrana
- DF: febre da dengue
- DG: doença grave
- DHF/DSS: febre hemorrágica da dengue/ síndrome do choque da dengue
- DNA: ácido desoxirribonucleico

DSA: dengue com sinais de alerta

EL28: peptídeo de 9 aminoácidos derivado da degradação da subunidade regulatória 4 da ATPase 19S pelo proteassomo

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*

FBS: Soro Fetal Bovino

FcγR: receptor de imunoglobulina encontrado na superfície de determinadas células

FITC: fluorocromo derivado da fluoresceína utilizado em ensaios de citometria de fluxo

HeLa: tipo de célula imortalizada de câncer cervical

ICB/UFMG: Instituto de ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais

IFN- α/β : interferons do tipo I produzidos por leucócitos e fibroblastos quando invadidos por vírus. Estimulam a produção de proteínas que impedirão a replicação viral.

IFN- γ : interferon do tipo II que está envolvido na regulação das respostas imunológicas inflamatórias e tem alguns efeitos antivirais e antitumorais

IL-10: interleucina 10

IL-17: interleucina 17

IL-6: interleucina 6

IPTG: indutor de galactocidase usado para promover a expressão de proteínas em células controlados pelo sistema operon lac

ISCOM: complexos imunoestimulantes

ISCOM: complexos imunoestimulantes

L-15: meio para cultura celular

LB: meio desidratado (Luria Bertani) utilizado para manutenção e cultivo de cepas recombinantes de *Escherichia coli*.

LL37: peptídeo antimicrobiano humano

MF59: adjuvante de vacina a base de esqualeno

MF59: adjuvante imunológico adicionado à vacina de influenza

MHC: Complexo de histocompatibilidade maior

MWNT: antígeno carreador *multi-walled carbon nanotubes*

nAb: anticorpos neutralizantes

NS1: proteína viral não estrutural 1

NS3: proteína viral não estrutural 3

NS4: proteína não estrutural 4

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMPs: padrões moleculares associados ao patógeno

PBS: phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

pE: construção da proteína E truncada em sua região transmembrana

PFU: unidade formadora de placa

PMA/Ionicina: estimuladores de produção intracelular de citocinas

PRRs: Receptores de reconhecimento Padrão

PSMC1, PSR4-HUMAN ou Rpt2: proteína ATPase do complexo 19S do proteassomo

RNA: ácido ribonucleico

RPMI: meio para cultura celular

SE: semana epidemiológica

Th1: Células T auxiliares do tipo 1

Th2: Células T auxiliares do tipo 2

TLR: receptor de linfócito T

TV003: vacina antidengue tetravalente

Resumo

Introdução: O peptídeo EL28 é um peptídeo intracelular que parece ter uma contribuição endógena com a atividade biológica do IFN- γ . Em um estudo anterior, Monte e colaboradores, o peptídeo EL28 demonstrou habilidade em aumentar o título de anticorpos IgG anti-BSA, em camundongos. Além disso, o peptídeo EL28 ativou a proliferação de células T CD8. Estes resultados sugerem que o peptídeo EL28 possui um potencial como peptídeo imunoestimulador, podendo ser utilizado como adjuvante na formulação de vacinas. **Objetivo:** Neste estudo avaliamos a capacidade do peptídeo EL28 em potencializar a resposta imune induzida pela vacina de subunidade DENV3E, aqui nesse estudo chamada por pE; uma construção truncada da região transmembrana da glicoproteína E do DENV-3. **Materiais e Métodos:** Fêmeas de camundongos da linhagem C57/Bl6 foram imunizadas com uma combinação da vacina pE e o peptídeo EL28 e desafiados com o vírus da dengue do tipo 3. Os níveis de expressão de células T CD8 e CD4, células de memória central e efetora e expressão da citocina IFN- γ e da proteína viral não-estrutural 3 (NS3), foram analisadas por citometria de fluxo para avaliar os efeitos imunoestimulatórios de EL28. A secreção de citocinas também foi avaliada por ELISA. Para avaliar os sinais da doença nos camundongos desafiados, tais como, plaquetopenia e hemoconcentração, foi realizado a contagem de plaquetas, contagem diferencial e total de leucócitos, e hematócrito. Além disso, foi realizado o ensaio com o corante *Evans Blue* para avaliar se houve alteração da permeabilidade vascular entre os grupos controle e imunizados. **Resultados:** O esquema de vacinação pE+EL28 foi capaz de reverter a plaquetopenia induzida pela infecção com pE, assim como, estimulou a proliferação de células totais do baço e de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺. Entretanto, nosso modelo de infecção não foi capaz de induzir outros sinais da doença, tais como, hemoconcentração e aumento da permeabilidade vascular. **Conclusão:** Ao confrontar todos os grupos experimentais, o modelo utilizado não foi o adequado para verificar o efeito do peptídeo EL28. Novos estudos devem ser conduzidos a fim de adequar o esquema de imunização ao modelo experimental estudado.

Palavras-Chave: 1. Dengue 2. Vacina; 3. Vacina de subunidade; 4. Adjuvante.

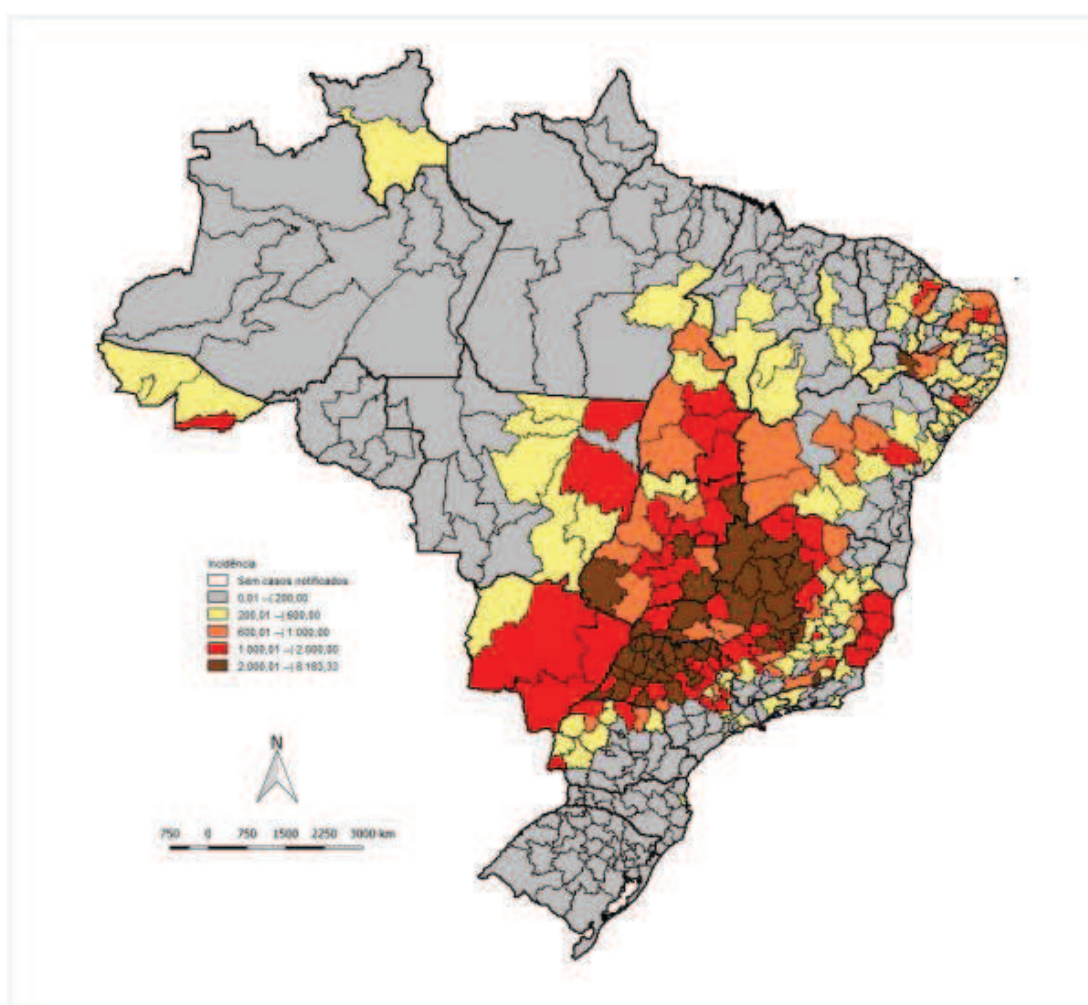
Abstract

Introduction: EL28 peptide is an intracellular peptide that appears to have an endogenous contribution to the biological activity of IFN- γ . In a previous study, Monte et al., the EL28 peptide showed an ability to increase the titer of anti-BSA IgG antibodies in mice. In addition, the EL28 peptide activated T CD8 cells proliferation. The results suggest that the EL28 peptide has a potential as an immunostimulatory peptide and could be used as an adjuvant in vaccine formulation. **Objectives:** In this study, we assessed the ability of EL28 peptide to boost the immune response induced for the DENV3E subunit vaccine, in this study called for pE, a truncated construct of the DENV3 glycoprotein E transmembrane region. **Materials and Methods:** Female C57/Bl6 mice were immunized with a combination of the pE vaccine and the EL28 peptide. After three immunizations, the animals were challenged with type 3 dengue virus. The expression levels of T CD8 and CD4 T cell expression, central and effector memory cells and IFN- γ cytokine expression and of the nonstructural viral protein 3 (NS3), for flow cytometry to assess the immunostimulatory effects of EL28. Cytokine secretion was also assessed by ELISA. In addition, the Evans Blue dye assay was performed to assess whether there was a change in vascular permeability between the control and infected groups. **Results:** pE+EL28 vaccination schedule was able to reverse thrombocytopenia induced by DENV3 infection, as well as, stimulated proliferation of total spleen cells and of CD8⁺ and CD4⁺ T-type lymphocytes. However, our infection model was not able to induce other signs of the disease, such as hemoconcentration and increased vascular permeability. **Conclusion:** When compare all experimental groups, EL28 showed no advantage as an adjuvant to the pE vaccine. Further studies should be conducted in order to adapt the immunization scheme to the experimental model studied.

Keywords: 1. Dengue 2. Vaccine; 3. Subunit Vaccine; 4. Adjuvant.

1. INTRODUÇÃO

A dengue tem sido um dos principais problemas de saúde pública mundial, sendo endêmica em mais de 100 países, atingindo mais de 2,5 bilhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais do globo. Estima-se que cerca de 390 milhões de ocorram por ano e delas 96 milhões sejam com manifestações clínicas ¹. Conforme informações do Boletim Epidemiológico, divulgado em setembro de 2019 pelo Ministério da Saúde, até a semana epidemiológica 34 (SE 34), foram registrados 1.439.471 casos prováveis de dengue no Brasil (**figura 1**). Além disso, foram confirmados 1.111 casos de dengue grave (DG), 15.179 casos de dengue com sinais de alarme (DSA) e 591 óbitos confirmados ².



Fonte: Sinan Online (banco de dados de 2018 atualizado em 02/01/2019; de 2019, em 26/08/2019).

Figura 1. Distribuição geográfica da incidência de dengue por Região de Saúde, Brasil, até a Semana Epidemiológica 34 de 2019

Dengue é uma doença viral emergente causada por um dos 4 sorotipos antigeneticamente distintos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). O DENV é membro do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviridae*, e é, principalmente, transmitido pelos mosquitos antropofílicos *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus* e pelo mosquito primatófilos arboreal, outro membro da família *Aedes spp*, os quais são responsáveis por manter o ciclo de transmissão urbano e silvático, respectivamente ^{3; 4; 5}.

A infecção por dengue ocorre após a picada do mosquito que injeta o vírus através da epiderme do hospedeiro e libera partículas virais que infectam células presentes na derme, geralmente, monócitos e células dendríticas, ou ainda podem ativar células imunes, tais como, os mastócitos. Uma resposta inflamatória local contra DENV na pele comanda o recrutamento de leucócitos pelos vasos sanguíneos, incluindo as células NK e células T, as quais irão matar células infectadas no sítio de injeção. O vírus da dengue trafega até os linfonodos através dos vasos linfáticos, onde irão estabelecer uma infecção sistêmica (**figura 2**). Essa resposta inflamatória localizada ocorre alguns dias antes de surgirem os sinais da doença ⁶.

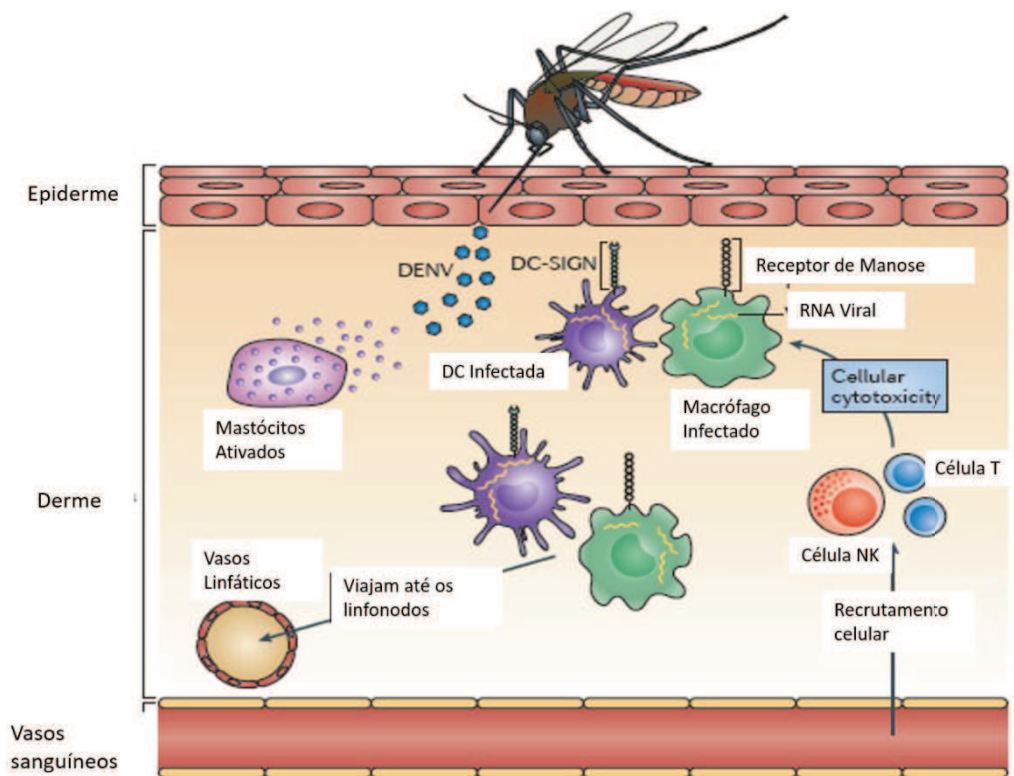


Figura 2. Figura esquemática da resposta imune do hospedeiro à infecção por DENV. Adaptada de ST John et al., 2013.

Uma imunidade duradoura é desenvolvida após a infecção por um sorotipo, entretanto, não oferece proteção a longo prazo contra os demais sorotipos, podendo aumentar o risco de desenvolvimento de doença grave e complicações ⁷.

Nesse contexto, a infecção por dengue pode ser assintomática ou leve (sem sinais de alarme) ou grave (com sinais de alarme), podendo levar até à morte. Normalmente, a primeira manifestação da dengue é a febre alta, de início abrupto, que geralmente dura de 2 a 7 dias, acompanhada de dor de cabeça, dores musculares intensas, dor atrás dos olhos, prostração, falta de apetite e manchas vermelhas no corpo. A forma grave da doença apresenta sinais de alarme, tais como, dor abdominal intensa e contínua, ou dor à palpação do abdome, vômitos persistentes, acumulação de líquidos (ascites, derrame pleural, derrame pericárdico), sangramento de mucosa ou outra hemorragia, aumento progressivo do hematócrito e queda abrupta das plaquetas ⁸.

Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença grave incluem idade, sorotipo e genótipo viral, além de fatores do hospedeiro, tais como, genética, *status* imune etc. Entretanto, estudos epidemiológicos demonstram que a incidência de doença grave aumenta, significativamente, em indivíduos com infecções secundárias heterólogas ou em bebês lactentes com infecções primárias, nascidas de mãe imunes à dengue ^{9; 10}.

Existem algumas hipóteses que buscam explicar a incidência de dengue grave no contexto de infecções secundárias. Uma delas é o fenômeno de intensificação dependente de anticorpos (do termo em inglês *Antibody-dependent enhancement* - ADE) (**figura 3.A**), na qual postula-se que após um período inicial de proteção cruzada, os anticorpos da primeira infecção continuam reagindo contra outros sorotipos dos DENV, entretanto, de maneira não neutralizantes. Esses anticorpos em quantidades subneutralizantes, levam a formação de imunocomplexos (DENV-anticorpo) os quais são interalizados por receptores de imunoglobulinas do tipo Fc (FcγR) em linhagens de células fagocíticas mononucleares (monócitos e macrófagos) aumentando sua replicação nessas células, a qual é acompanhada por uma liberação massiva de fatores solúveis (citocinas e quimiocinas) que poderia explicar o aumento da permeabilidade vascular e distúrbio hemostático encontrado nos casos graves ^{11; 12}. Uma teoria distinta, mas complementar, é a teoria do pecado antigênico original (**figura 3.B**), que envolve a reativação de linfócitos T e B de memória específicas para a infecção anterior e não a atual resultando na depuração viral tardia e na secreção de uma “tempestade de citocinas” junto com um aumento da apoptose de células infectadas e não infectadas ¹¹. Apesar da relação de casos de dengue grave com infecções secundárias, infecções primárias também podem levar a

manifestação de sintomas da doença grave, ainda que com baixa incidência ^{9; 13}. Para explicar isso, uma teoria postula que manifestações da dengue grave não necessariamente dependem de uma infecção secundária, mas de uma combinação de diversos fatores: carga viral, virulência da cepa, e resposta imune do hospedeiro ¹⁴.

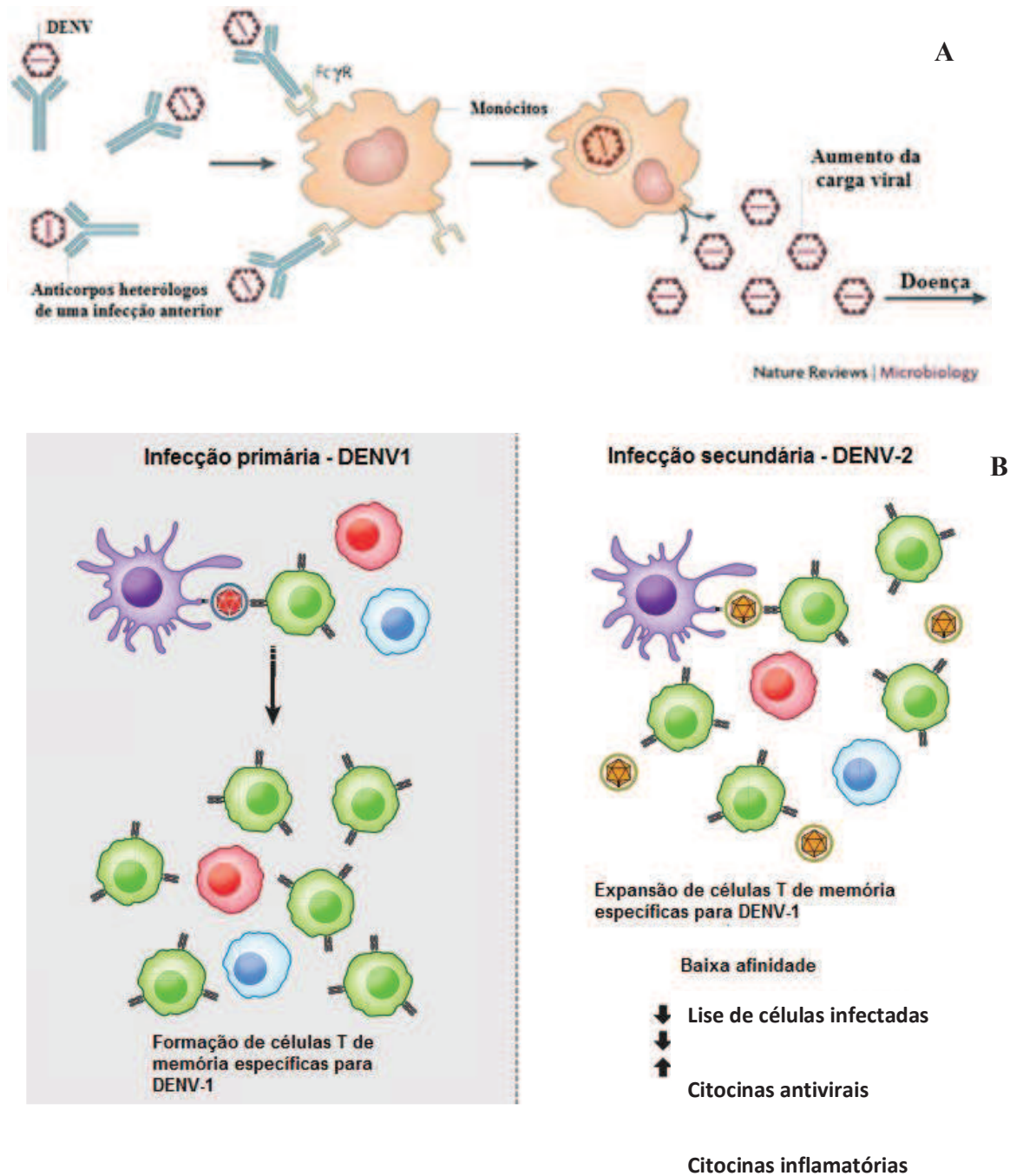


Figura 3. Figuras esquemáticas das hipóteses para o desenvolvimento de dengue grave. **A.** Fenômeno de Intesificação dependente de anticorpos (ADE). **B.** Teoria do pecado antigênico original.

Conforme a OMS (2019), não existe tratamento específico para a dengue, apenas administração de medicamentos para tratar os sintomas, como por exemplo, dor e febre. Atualmente, o principal método para controlar ou prevenir a transmissão do vírus da dengue é combater a propagação dos mosquitos vetores evitando acúmulo de água em pneus e vasos, eliminando resíduos sólidos de forma adequada removendo habitats artificiais, aplicando inseticidas apropriados para recipientes de armazenamento de água ao ar livre. Recomenda-se ainda o uso de telas nas janelas, roupas de mangas compridas, materiais tratados com inseticidas, bobinas e vaporizadores, etc.

A vacinação é uma das formas mais eficientes na prevenção de muitas doenças infecciosas pois provê uma proteção duradoura através da indução de uma resposta imune patógeno-específico ¹⁵.

Até o momento, a vacina Dengvaxia, uma vacina tetravalente, recombinante e atenuada, desenvolvida pela empresa Sanofi Pasteur, possui licenciamento para administração em mais de 100 países. Apesar dos ensaios clínicos da Fase III terem sido bem sucedidos em regiões Pacífico-Asiáticas e países da América Latina e, a análise dos resultados dos primeiros 3 anos de estudo da Fase III sugerirem elevadas taxas de imunização parcial contra dengue, altas taxas de hospitalizações durante as infecções de dengue de pessoas soronegativas vacinadas foram registradas ^{16; 17; 18}. Segundo alguns autores, isto pode indicar que Dengvaxia induz o fenômeno denominado ADE, levando a um agravamento da doença ¹⁹. Em decorrência disso, em 2017, a Anvisa publicou uma nota informativa orientando que a administração de Dengvaxia fosse evitada por pessoas que nunca tiveram contato com o vírus da dengue (http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201).

Outra vacina anti-dengue tetravalente, a TV003, mostrou alguma eficácia durante os testes clínicos. Esta vacina foi inicialmente desenvolvida pelos Institutos Nacionais de Alergia e doenças infecciosas do Estados Unidos, e então licenciada pela empresa Takeda. Em estudos de fase I e II conduzidos em países endêmicos e não-endêmicos, a TV003 induziu respostas robustas de anticorpos neutralizantes (nAb) a todos os quatro sorotipos do DENV, e foi bem tolerado em todos os pacientes ^{20; 21; 22}. Atualmente, TV003 está em testes de ensaio clínico de fase III no Brasil ²³.

Apesar disso, há questões ocasionais de segurança em torno das vacinas atuais, incluindo reversão, inativação incompleta do vírus e transmissão do vírus vacinal a indivíduos imunocomprometidos que podem causar doenças e outros eventos adversos

graves²⁴. Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias de imunização que sejam eficazes e seguras torna-se uma necessidade de atual.

As vacinas de subunidade apresentam um alto perfil de segurança e forte estabilidade, além disso, incluem uma produção rápida e econômica^{25;26}. Apesar de suas características, a maioria das vacinas de subunidade não cumprem todos os requisitos clínicos para alcançar o licenciamento para uso humano. As vacinas de subunidades são, geralmente, compostas por um epítipo imunodominante específico ao invés da partícula viral inteira. Isto permite maior segurança e menor competição antigênica, entretanto, por sua vez, pode gerar respostas imunes reduzidas, como resultado de um único alvo imunogênico, eliminando assim o potencial de respostas imunes simultaneamente contra múltiplos alvos do patógeno, como aqueles induzidos por vacinas atenuadas^{27;28}. Devido a isso, a adição de adjuvantes às vacinas de subunidades, tem sido um método chave para aumentar a imunogenicidade induzida por vários candidatos vacinais.

Os adjuvantes, por sua vez, quando adicionados à fórmula da vacina, aumentam a imunogenicidade e a eficácia das vacinas. Em geral, eles agem por uma série de mecanismos com a maioria deles envolvendo as células apresentadoras de antígeno (APCs), particularmente, as células dendríticas (DCs)²⁹, as quais constituem a principal conexão entre a imunidade inata e adaptativa, além de ser um dos principais alvos de vírus para a sua absorção^{30;31}. As DCs possuem em sua superfície ligantes de PRRs (receptores de reconhecimento padrão), dentre as quais encontramos os *Toll-like receptors* (TLRs)³⁰. TLRs são proteínas celulares que detectam e interagem com componentes virais específicos, tais como, RNA viral, DNA viral ou produtos intermediários virais, os quais levam a secreção de IFN tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias, responsáveis por preparar, amplificar e polarizar a resposta imune^{30;31}.

O contato dos vírus ou de suas proteínas (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs), com os PRRs das DCs, fazem com que antígenos virais sejam apresentados na superfície da célula pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, major histocompatibility complex)³². Os antígenos virais capturados no exterior das células (antígenos exógenos), são processados e unidos ao MHC-II e apresentados à linfócitos auxiliares T CD4 (T helper ou Th), que por sua vez, levam a uma resposta celular (resposta Th1, ativando macrófagos e/ou linfócitos T CD8) ou humoral (resposta Th2, ativando linfócitos B que irão produzir anticorpos, os quais podem marcar patógenos para que estes sejam reconhecidos e eliminados por células fagocíticas). Por sua vez, os antígenos virais produzidos dentro

das células dendríticas (antígenos endógenos), após a captura e o processamento do patógeno, são unidos à MHC-I e apresentados aos linfócitos T citotóxicos (T CD8), ativando diretamente uma resposta celular ³³.

Os adjuvantes podem controlar o balanço das respostas entre os linfócitos T auxiliares (eixo Th1/Th2) e a atividade da resposta imune adquirida ^{30; 34}. Produtos químicos, componentes microbianos ou proteínas de mamífero podem ser utilizados como adjuvantes de vacinas. Os adjuvantes em desenvolvimento ou utilizados em vacinas experimentais e comerciais são: sais de alumínio e emulsões de óleos ³⁵, saponinas ³⁶, complexos imunoestimulantes (ISCOM), lipossomas, micropartículas, copolímeros de blocos não iônicos, polissacarídeos derivados ³⁷, citocinas, e uma ampla variedade de derivados de bactérias. Até o momento, existe um número limitado de adjuvantes aprovados e licenciados para uso, como por exemplo, alumínio, MF59, AS03 e AS04 ³⁰.

A maioria dos adjuvantes licenciados, tais como alumínio, provocam uma resposta Th2, a qual pode ser inefetiva contra patógenos os quais requerem uma resposta imune dominante de Th1 para depuração ³⁸. Além disso, alguns estudos tem demonstrado que o uso de alumínio como adjuvante na formulação de vacinas podem estimular a produção de IL-10, levando a supressão da resposta do tipo Th1 ³⁹.

O modo de ação dos adjuvantes varia desde adjuvantes formadores de depósito ⁴⁰, recrutamento de células imunes ⁴¹, ativação de inflamossomas ⁴², aumento da apresentação de antígeno pelas moléculas de MHC ⁴² e imunomoduladores ^{43; 44}.

Alguns peptídeos curtos fazem parte de uma classe de moléculas que demonstram ter efeitos imunomoduladores e possuem potencial para se tornarem adjuvantes seguros e de baixo custo ²⁴. Como exemplo podemos citar a *defensin*, peptídeo curto de defesa do hospedeiro, que podem provocar ação antimicrobiana direta, interrompendo a membrana celular ou atacando as bactérias internamente ⁴⁵. O LL37 (*The human cathelicidin antimicrobial peptide*) é um outro peptídeo antimicrobiano bem conhecido que mostrou induzir efeitos imunomodulatórios e parece estar associado a desordens autoimunes como psoríase ⁴⁶.

Peptídeos intracelulares são produzidos por proteassomas após a degradação de proteínas nucleares, citosólicas, e mitocondriais, e podem ser processados adicionalmente por peptidases adicionais gerando um conjunto maior de peptídeos dentro das células. Níveis relativos de peptídeos intracelulares sofrem mudanças em doenças humanas e quando as células são estimuladas, confirmando sua função biológica. Apenas alguns

peptídeos tem sido farmacologicamente caracterizados, mas sua significância biológica e mecanismos de ação permanecem incompreendidos ⁴⁷.

O peptídeo EL28 corresponde a uma sequência de 9 aminoácidos (VGSELIQKY) derivado da degradação da proteína PSR4-HUMAN (subunidade regulatória 4 do regulador 19S do proteassomo) ou PSMC1, também conhecida por Rpt2. O peptídeo EL28 foi, anteriormente, obtido por Monte et al. ⁴⁸, em células Hela expressando o proteassomo imune, após a imuno-estimulação com IFN- γ . O conteúdo peptídico intracelular foi avaliado para verificar diferenças entre as células controle (não tratadas com IFN- γ) e células estimuladas (tratadas com IFN- γ) por espectrometria de massas. A ocorrência do peptídeo EL28 foi triplicada na amostra coletada das células tratadas com IFN- γ .

O proteassomo 26S (**figura 4**), que é expresso constitutivamente na maioria das células de mamíferos, é responsável pela degradação de cerca de 90% das proteínas intracelulares, o qual também é importante para diversas funções celulares como proliferação, diferenciação, apoptose, expressão gênica, transdução de sinal e regulação metabólica ^{49; 50; 51}. Ele é constituído por um barril catalítico que carrega as 3 subunidades catalíticas do proteassomo, as quais são o β 1 que cliva após resíduos ácidos (*caspase-like*), β 2 que cliva após resíduos básicos (*tripsina-like*) e β 5 que cliva após resíduos hidrofóbicos (*quimotripsina-like*) ^{52; 53; 54; 55}. Em cada uma das extremidades do barril catalítico, o regulador 19S se liga em cada uma das subunidades e é responsável pelo reconhecimento do sinal de poliubiquitina, que contribuem para evitar a degradação indiscriminada de proteínas intracelulares ^{55; 56}. O regulador 19S possui, em sua estrutura, ATPases importantes para o desdobramento de proteínas e seu direcionamento para o interior do proteassomo. A partícula PSMC1 (ou Rpt2), proteína da qual o peptídeo EL28 é derivado (**figura 4**), é responsável pela mudança conformacional do barril catalítico, para que a proteína, que foi reconhecida pelo complexo 19S para a degradação, possa ser internalizada ⁵⁷.

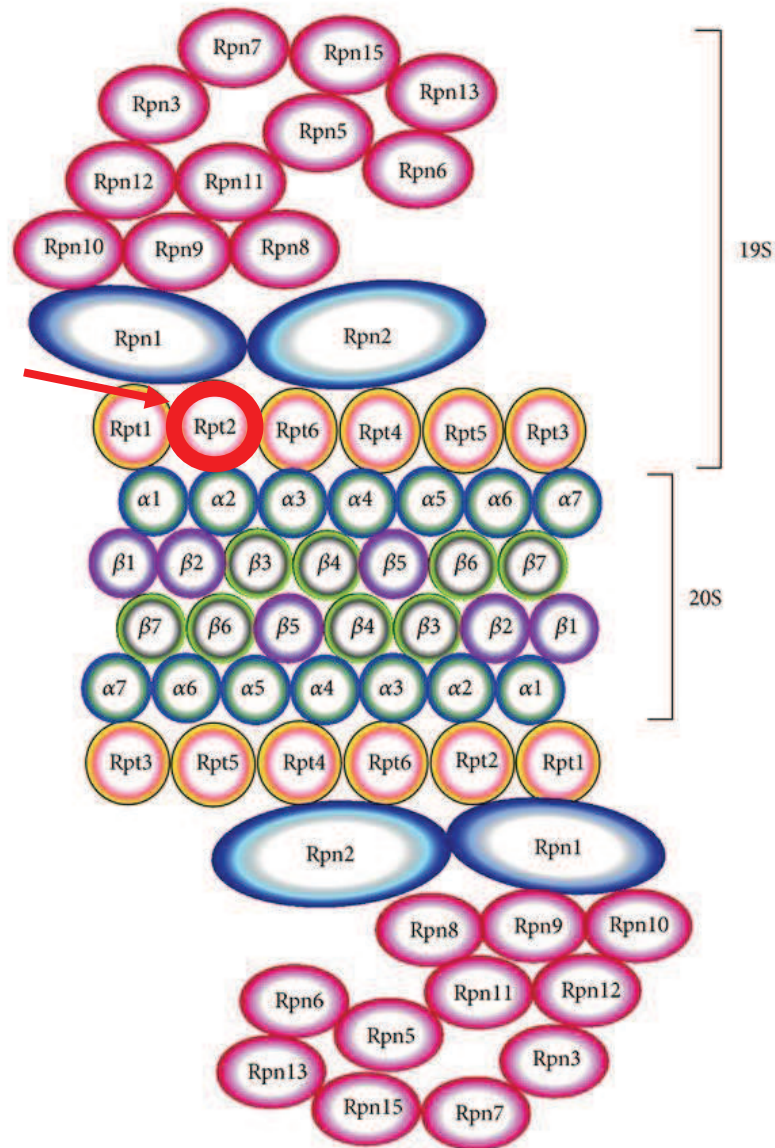


Figura 4. Imagem esquemática do proteassomo 26S e seus componentes. O proteassomo 26S é composto do barril catalítico 20S e da partícula regulatória 19S. A proteína Rpt2 (PSMC1) destacada pela seta vermelha, da qual o peptídeo EL28 é derivado. Adaptado de Groettrup et al. 2009; Yewdell et al. 2003.

Em condições de estresse ou resposta imune, as três subunidades catalíticas do proteassomo (β_1 , β_2 e β_5) podem ser substituídas por síntese *de novo*, originando β_{1i} , β_{2i} e β_{5i} que são incorporadas cooperativamente ao complexo do proteassomo imune em formação^{49; 56; 58} (**figura 5**). Essas novas subunidades do proteassomo são fortemente induzidas por citocinas pró-inflamatórias interferon gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Estudos em camundongos mostraram que, cerca de oito dias após a infecção por vírus, bactéria ou fungo, o padrão de produção do proteassomo é alterado

e a forma imune passa a ser predominante em diversas células e tecidos ^{54; 58; 59}. O IFN- γ torna-se, particularmente, importante para a apresentação de antígenos, pois, além de induzir a formação das diferentes subunidades do proteassomo, é capaz de estimular a síntese da cadeia pesada do MHC de classe I, diversas proteínas do transportador associado ao processamento de antígenos (TAP) e o ativador PA28, o qual, junto com as subunidades $\beta 1_i$, $\beta 2_i$ e $\beta 5_i$ do proteassomo imune, altera de forma quantitativa e qualitativa o conteúdo peptídico intracelular ⁵⁵.

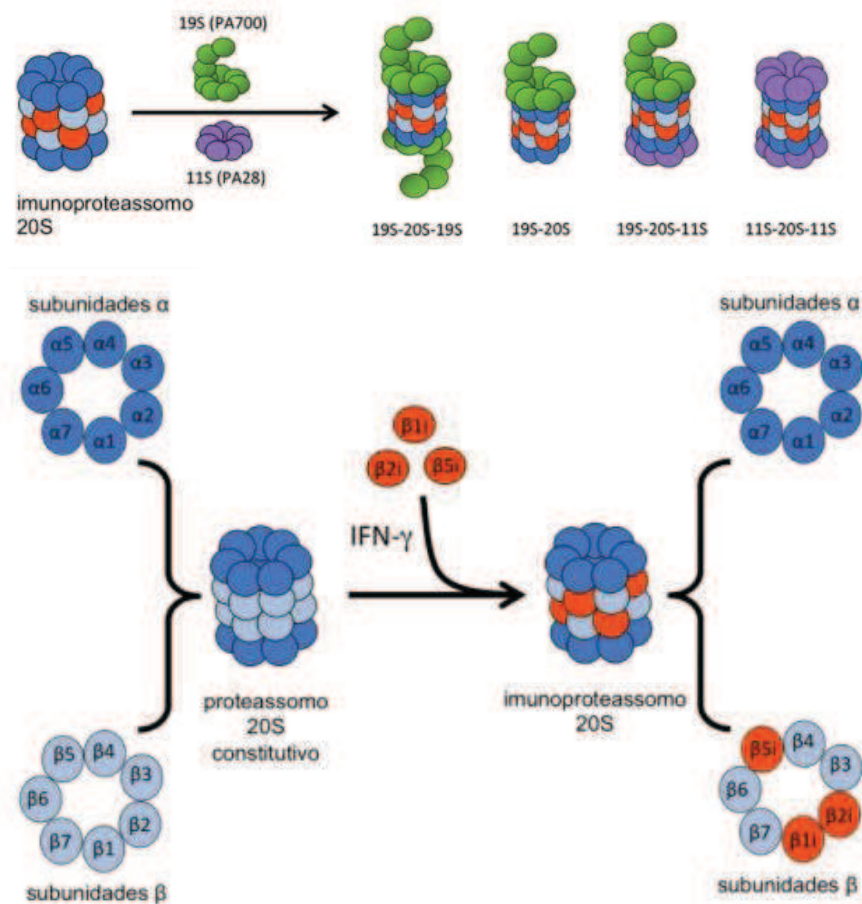


Figura 5. Imagem ilustrativa da expressão do proteassomo imune e do regulador PA28 (11s) sob indução de IFN- γ . Adaptado de Groettrup et al. 2009; Yewdell et al. 2003.

O proteassomo imune propicia uma melhor apresentação de antígenos via MHC-I. Isso ocorre porque essa forma do proteassomo produz maior quantidade de peptídeos com oito a dez aminoácidos e apresenta atividade quimotripsina aumentada, em parte, devido à substituição da subunidade $\beta 1$ pela subunidade $\beta 1_i$, que passa a ter essa característica de catálise. Assim, a apresentação de antígenos será favorecida já que as moléculas MHC-I tem preferência por se ligarem a peptídeos com cerca de nove aminoácidos e que apresentem características hidrofóbicas ou básicas em suas regiões carboxi terminais ^{54; 57}. Destaca-se, ainda, o fato de que epítomos virais são processados de maneira mais

eficiente em relação aos epítomos tumorais e próprios pelo proteassomo imune⁶⁰. Além de poderem ser apresentados como antígenos, esses peptídeos intracelulares podem ter outras funções, como modular a função de proteínas^{53; 61; 62}.

Tendo em vista que o proteassomo imune pode produzir maior número de peptídeos capazes de se ligarem corretamente ao MHC de classe I, o que o torna de grande importância para a modulação da eficiência da resposta imune através da ativação de linfócitos T citotóxicos, a função biológica do peptídeo EL28, que teve sua expressão três vezes maior no grupo de células que estavam expressando o proteassomo imune, dentro desse sistema. Em ensaios *in vitro*, EL28 estimulou as três atividades do proteassomo (quimiotripsina, tripsina e caspase), além de parecer ter um efeito sinérgico com IFN- γ em potencializar a expressão da subunidade $\beta 5i$ do proteassomo imune em células HeLa. Adicionalmente, em um ensaio *in vivo*, EL28 também aumentou a proliferação de células T CD8⁺ e a resposta imune de camundongos contra ovalbumina⁴⁸. Tendo em vista a capacidade deste peptídeo na ativação do proteassomo, assim como aumentar a apresentação de antígeno e proliferação de células T CD8⁺, propomos avaliar os efeitos deste peptídeo como adjuvante vacinal.

O professor Dr. Flávio Guimarães da Fonseca e equipe, do Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG) produziu e, gentilmente, nos doou a construção DENV3E recombinante purificada, uma construção da proteína E, de DENV-3, truncada em sua região transmembrana. Em nossa escrita ela será referenciada como pE. Essa construção demonstrou baixa eficiência na ativação da resposta imune quando administrada pura, entretanto, quando administrada junto com uma molécula carreadora, aumentou significativamente a antigenicidade da proteína E⁶³.

Vários estudos tem mostrado a importância da Glicoproteína E como um importante antígeno para o desenvolvimento de vacina contra o vírus da dengue e o primeiro alvo de nAb^{64; 65; 66; 67}. Além disso, um estudo recente demonstrou a eficácia da proteína E na geração de memória de células T CD8 e CD4 em relação a expressão de IFN- γ .

1.2. Objetivo Geral

Avaliar se o peptídeo EL28 seria um bom adjuvante vacinal quando combinado com a proteína pE em um modelo experimental de infecção pelo DENV-3 em camundongos.

1.2.1. Objetivo Específico

- a) Avaliar se o modelo de infecção com DENV-3 foi capaz de causar plaquetopenia, linfopenia e hemoconcentração (contagem total/diferencial de leucócitos e hematócrito);
- b) Avaliar se o modelo de infecção com DENV-3 foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular, através do ensaio com corante Azul de Evans;
- c) Avaliar se a imunização de camundongos com pE e EL28 alterou a contagem de plaquetas, leucócitos e hematócrito;
- d) Avaliar se houve alteração na permeabilidade vascular em camundongos imunizados com pE e EL28, através do ensaio com corante Azul de Evans.
- e) Verificar se o peptídeo EL28 adicionou estímulo na proliferação de células T CD8 e T CD4, células T de memória, quando combinado com a pE, em camundongos imunizados;
- f) Avaliar se a imunização de camundongos com a pE combinado com o peptídeo EL28 apresentou efeito imuno-estimulatório na expressão de citocinas, por ELISA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Proteína Recombinante (DENVE3), Peptídeo EL28 e Vírus

A partir de clones bacterianos de *Escherichia coli*, contendo a proteína pE subclonada em vetor de expressão pQE (QIAGEN, EUA), a proteína foi produzida e, gentilmente, doada pelo professor Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG).

O peptídeo EL28, que será testado como adjuvante da vacina anti-DENV, foi sintetizado com um peptídeo de penetração celular (CPP; YGRKKRRQRRR) ligado covalentemente ao seu terminal N; a pureza foi superior a 95% ⁶⁸. As alíquotas do peptídeo EL28-CPP foram gentilmente doadas pelo professor Dr. Emer Suavinho Ferro (ICB-USP), anteriormente providenciado pela Proteimax Biotechnology LTDA, São Paulo, Brasil. O peptídeo de penetração celular (CPP) é um fragmento curto catiônico da proteína TAT, usado para aumentar o transporte de biomoléculas para dentro da célula ⁶⁹. Especificamente, essa sequência da proteína TAT (47-57) é rica em arginina que penetra diretamente a membrana plasmática, mas não através de endocitose ⁷⁰.

Nesse projeto foi utilizado o sorotipo 3 do DENV (DENV-3 05K863DK1) proveniente do estudo Eden ⁷¹, gentilmente cedido pelo Prof. Eng Eong Ooi da DUKE-NUS Medical School de Cingapura. O DENV-3 05K863DK1 é um isolado viral que foi obtido à partir de amostra de paciente que participou de um estudo realizado em Cingapura para investigação epidemiológica, clínica, viral e características específicas de hospedeiros adultos infectados por DENV, em um esforço para identificar novos marcadores de prognóstico.

2.2. Modelo Animal

Animais imunocompetentes da linhagem C57/B16 do tipo selvagem (WT) foram escolhidos para a realização desse estudo, os quais podem ser produtivamente infectados por DENV. Embora camundongos, imunologicamente intactos, demonstram ser menos suscetíveis à infecção do que camundongos imunossuprimidos, ou seja, sem capacidade de ativação imune inata ⁷², alguns outros autores, anteriormente, reportaram que camundongos WT podem sustentar a replicação da infecção por DENV ⁷³. Sendo assim, fêmeas de camundongos da linhagem C57/B16, *specific pathogen free* (SPF), com idade

de 4 semanas, foram obtidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG em gaiolas plásticas com microisoladores, depositadas em estantes especiais com ventilação própria (ALESCO®). O protocolo para utilização dos animais experimentais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA), sob o número de protocolo 169/2016. Os animais utilizados foram manipulados e sacrificados de acordo com as normas desse comitê.

2.3. Imunização e Infecção

Camundongos com 4 semanas, da linhagem C57/Bl6, foram separados em 2 grupos (mock e infectado) e cada um com 4 subgrupos separados conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Grupos experimentais e tratamentos	
MOCK	DENV3
PBS (n=6)	PBS (n=6)
pE (10µg/mL) (n=6)	pE (10µg/mL) (n=6)
EL28 (100µM) (n=6)	EL28 (100µM) (n=6)
pE +EL28 (n=6)	pE +EL28 (n=6)

Os animais foram imunizados ou receberam Solução Salina (PBS 1X) por via subcutânea na região da nuca. Foram realizadas 3 imunizações (*prime-boost-boost*) com um intervalo de 15 dias entre elas. Cada animal recebeu 10µg/mL de proteína pE, ou 100µM (51,54µg/200µL) do peptídeo EL28, ou pE associado ao peptídeo EL28 nas mesmas concentrações já citadas (**figura 6**).

Após 48 horas da última imunização, os animais foram infectados com 1×10^6 PFU de DENV3, ou receberam solução salina, intraperitonealmente. Após 2 dias, os animais foram anestesiados com cetamina 21% e xilazina 8%, em PBS, em seguida o sangue foi coletado através da punção da veia cava inferior e transferidos para tubos heparinizados, em seguida os animais foram sacrificados por deslocamento de cervical para remoção do baço.

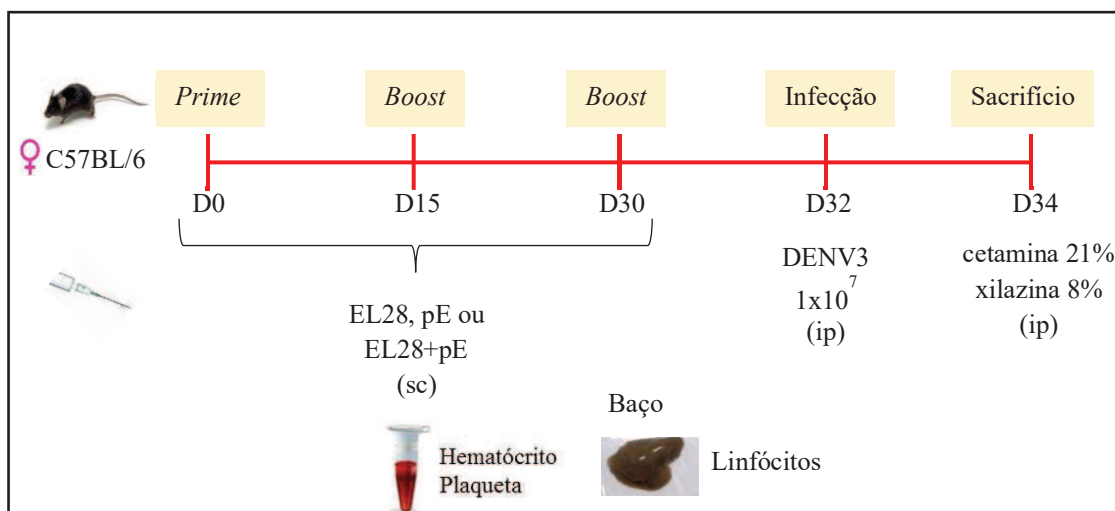


Figura 6. Desenho experimental do esquema de imunização e infecção.

2.4. Análises Hematológicas

Para avaliar ocorrência de trombocitopenia, 10µL de sangue foram adicionados em tubos contendo 900µL de oxalato de amônio para que fosse realizada a contagem de plaquetas. Ainda, para avaliar a ocorrência de Leucopenia, foram preparadas lâminas de vidro de esfregaço de sangue para contagem diferencial dos leucócitos. Para contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer, 5µL de sangue foi adicionado em tubos contendo 195µL de líquido de Turk. Além disso, para avaliar se houve alteração na hemoconcentração entre os grupos, tubos capilares foram preenchidos com $\frac{3}{4}$ da sua altura com sangue e centrifugados em centrífuga apropriada para microhematócrito por 5 minutos a 10.000 rpm.

2.5. Citometria de Fluxo

Esplenócitos foram marcados com anticorpos de superfície para reconhecimento de marcadores celulares e citocinas intracitoplasmáticas. Para tal, foi utilizada a técnica de Citometria de Fluxo (do inglês, “*Fluorescence-activated cell sorting*”, FACS).

O FACS foi realizado com esplenócitos, que foram adicionados na concentração de 10⁶ células por poço, em placas de 96 poços. Conjuntamente, 10µg/mL da proteína recombinante pE ou PMA foi adicionado por poço, como estímulo e, RPMI para os poços do controle negativo (sem estímulo), *overnight*.

Para avaliação dos marcadores (MIX2) relacionados na **Tabela 2**, as placas foram incubadas por 19 horas à 37°C, em estufa de CO₂. Posteriormente, 10µg/mL de Brefeldina foi adicionado por poço para inibir a secreção de citocinas, e então, as placas foram novamente incubadas por 5 horas à 37°C, em estufa de CO₂. Após o tempo de incubação, as placas foram centrifugadas a 300g (centrífuga BR4i, Jouan), por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante retirado. A seguir, as células foram ressuspensas em 20µL dos anticorpos do MIX2 relacionados da **Tabela 2** e incubadas em banho de gelo por 30 minutos, protegido da luz. As células ficaram incubando com 200µL do tampão de fixação, contendo paraformaldeído, por 30 minutos no gelo. Após centrifugação a 300g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, em seguida foi adicionado 100µL de permbuffer para permeabilizar a membrana da célula, e então, 40µL de anticorpo intracelular (anti-IFN-γ) foi adicionado. Após 30 minutos de incubação no gelo e protegido da luz, as células foram lavadas e centrifugadas com 100µL de FACS buffer (2% FBS em PBS.) por 2 vezes. Em seguida as amostras foram transferidas para tubos de leitura no citômetro de fluxo (FACSCalibur™, BD). Os dados foram analisados pelo programa FlowJo® e os dados estatísticos pelo GraphPad Prism 5.

Para avaliação dos marcadores do MIX1 (**Tabela 2**), a placa de 96 poços contendo os esplenócitos (1x10⁶ células) foi centrifugada a 300g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células incubadas com Fc Blocker e incubadas por mais 20 minutos no gelo. Em seguida, a placa foi centrifugada a 300g por 5 minutos a 4°C e 20µL de CD45 peCy7 na concentração de 1:100 em PBS/2%SFB foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação no gelo e protegido da luz, foram adicionados 100µL de FACS buffer por poço. A placa foi novamente centrifugada a 300g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado 200µL do tampão de fixação e homogeneizado. Após 30 minutos, a placa foi novamente centrifugada e 100µL de permbuffer 1x com 40µL de anticorpo intracelular (anti-NS3 primário, 1:160), diluído em permbuffer, foram adicionados e incubado por 30 minutos no gelo.

Tabela 2. Marcações para ensaio de Citometria de Fluxo	
Verificação da expressão da proteína NS3 de DENV (MIX1)	CD45 PecY7; Intra: NS3 FITC
Análise da expressão de células T CD8 e CD4 e distinção entre células naive e células de memória central e efetora, assim como a expressão de IFN- γ . (MIX2)	Superfície: CD3 PeCy7; CD8 BV421; CD4 FITC; CD44 PeCy5; CD62L APC; CD69 APCC γ 7 (MIX 2) Intra: IFN- γ PE

2.6. ELISA

A produção de citocinas específicas (IFN- γ , IL-10, IL-6 e IL-17), foi avaliada no sobrenadante de esplenócitos estimulados com pE. 1×10^5 células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após o estímulo com ConA e pE (*ex-vivo*) por 72 horas, 150 μ L do sobrenadante por poço, foi coletada em uma placa nova, e mais 150 μ L de BSA 0,1% foram adicionados.

2.7. Ensaio de Permeabilidade Vascular

Para avaliar se houve alterações na permeabilidade vascular foi realizado o ensaio de extravasamento vascular pela técnica de Evans Blue. Estudos que avaliam o extravasamento do corante Evans Blue são, geralmente, usados para avaliar modelos de hemorragia viral^{74; 75}. O corante Evans Blue se liga à albumina sérica com alta afinidade e, assim, o vazamento de plasma no espaço extravascular pode ser determinado durante a necropsia, removendo os órgãos e extraíndo o corante. Como os animais devem ser sacrificados, este teste só pode ser realizado uma única vez durante o curso da doença⁷⁴.

Para esse ensaio, foi realizado um experimento, independente, de imunização e infecção (**figura 7**). O mesmo protocolo experimental descrito acima foi realizado. Brevemente, fêmeas de camundongos da linhagem C57/Bl6, com idade de 4 semanas foram separadas em 4 grupos experimentais: PBS (n=3), animais receberam apenas solução salina 1x; pE (n=3), camundongos foram imunizados com 10 μ g/mL da proteína E; EL28 (n=3), camundongos receberam 100 μ M do peptídeo EL28 e; pE+EL28 (n=3), camundongos foram imunizados com pE mais o peptídeo EL28. Como no experimento anterior, foram realizadas 1 imunização e dois reforços (*prime-boost-boost*) com um intervalo de 15 dias entre eles e a infecção foi realizada 48 horas após o último reforço.

As imunizações foram realizadas por via sub-cutânea, e a infecção de 10^6 PFU de DENV-3 foi realizada por via intraperitoneal.

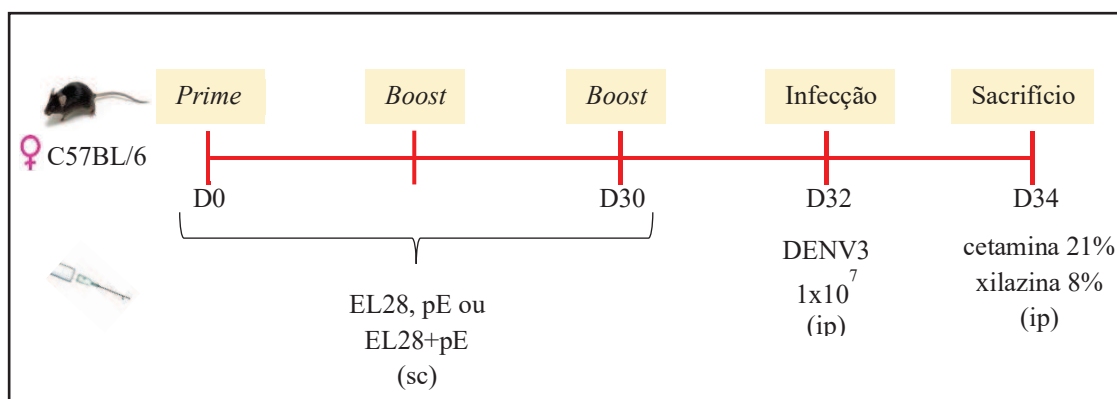


Figura 7. Desenho experimental do esquema de imunização e infecção para ensaio com azul de Evans.

Após 48 horas da infecção, os animais ficaram expostos a uma luz quente para que ocorresse a vasodilatação, procedimento o qual facilita a aplicação do corante. Os animais ficaram expostos à essa luz por 15 minutos, em seguida, foram colocados em um contensor para a aplicação de 1% de azul de Evans na veia cauda. Os animais foram anestesiados 30 minutos após a aplicação do corante e, em seguida, foi realizada a perfusão, que consiste na retirada total do sangue através da aplicação de solução salina à partir do ventrículo esquerdo. A perfusão ocorre por 10 minutos e então os fígados são retirados e macerados, separadamente, com ajuda de um homogeneizador (*Power Gen 1000 – Thermo Scientific*) e em seguida é adicionado PBS 1x à amostra.

2.8. Análise estatística

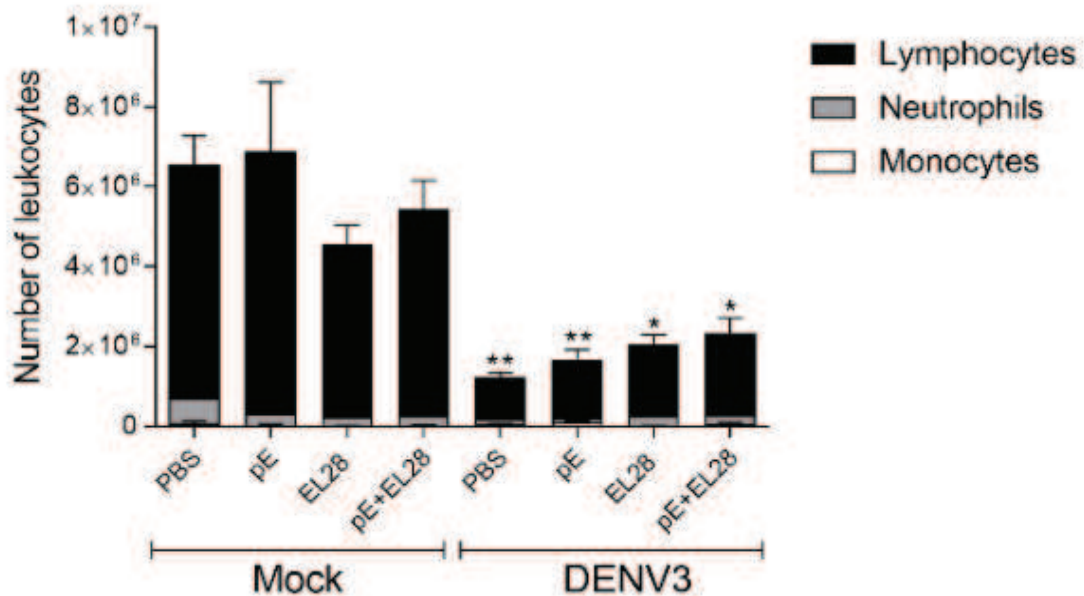
Os dados foram analisados por One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados foram expressos como: média geométrica e erro padrão e considerados, estatisticamente significativos se $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação das alterações hematológicas induzidas pela infecção com o DENV-3 após imunização com pE+EL28

Conforme mostrado na **Figura 8.A** observou-se uma diminuição na contagem de linfócitos (linfopenia – barra preta) nos animais que foram desafiados com DENV-3. De maneira similar, a infecção resultou em redução no número de neutrófilos circulantes (neutropenia) (**Fig.8.B** – barra cinza) Adicionalmente, plaquetopenia também foi observada nos camundongos infectados. Nossos resultados demonstraram que a imunização dos animais, de maneira isolada ou combinada (pE+EL28), não foi capaz de reverter as alterações hematológicas citadas anteriormente, com exceção da plaquetopenia que foi, significativamente, reduzida nos animais que receberam a imunização com o peptídeo EL28 em conjunto com pE, ou isoladamente. Por fim, foi realizada a avaliação dos níveis de hematócrito no sangue dos animais controles e infectados pelo DENV-3. Os resultados demonstram que a infecção com DENV-3 não foi capaz de induzir hemoconcentração (**Fig. 8.C**).

A



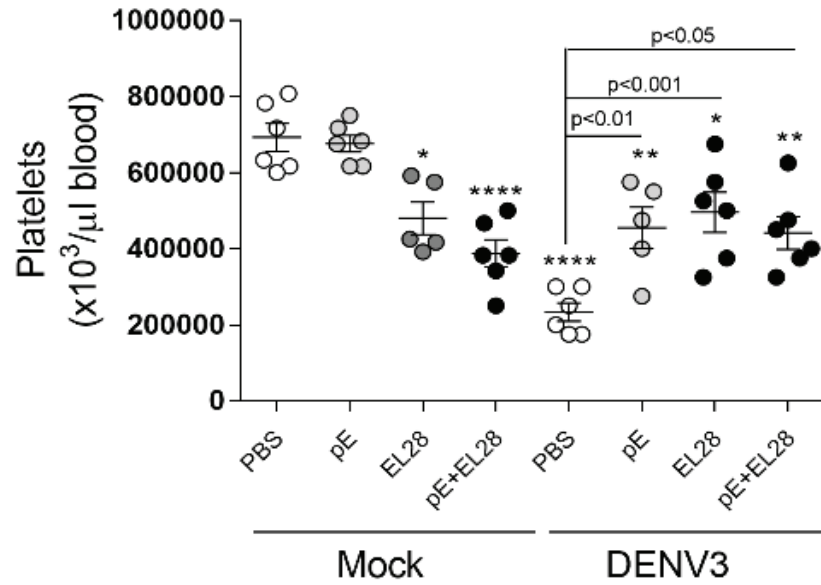
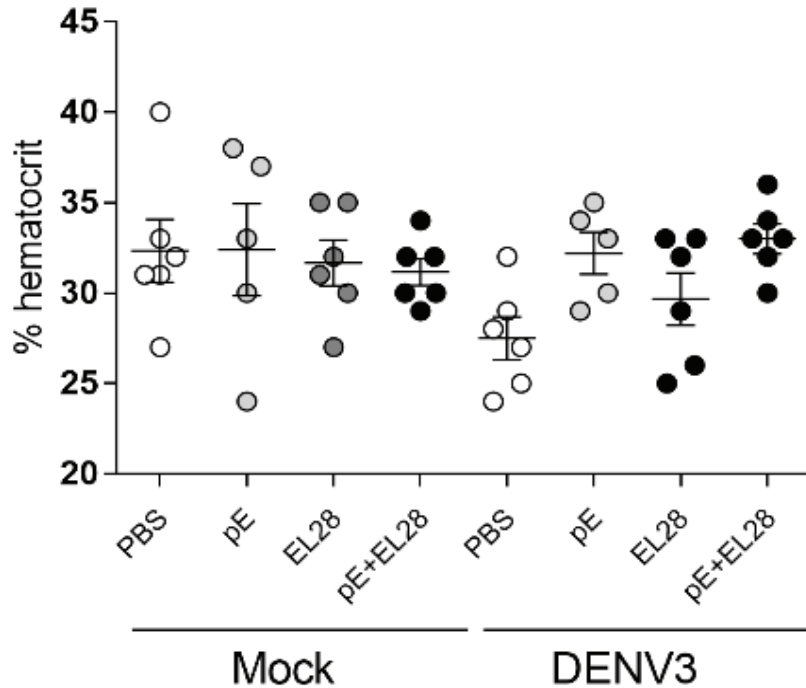
B**C**

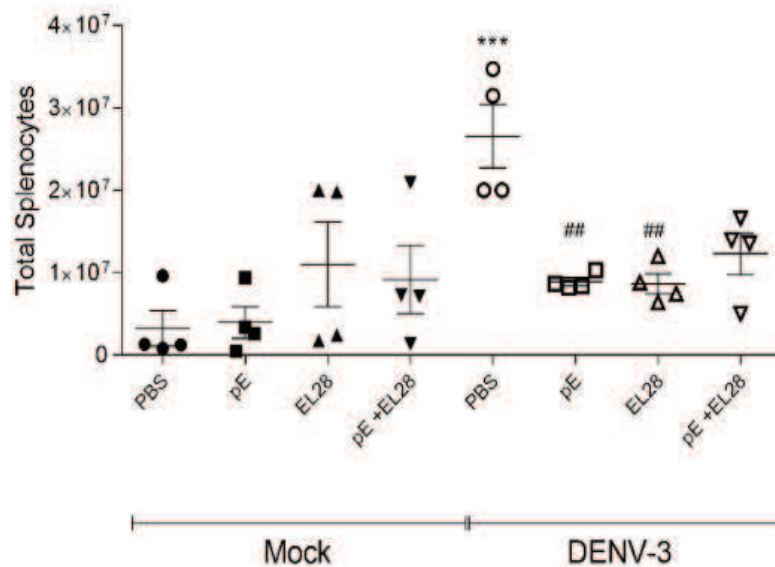
Figura 8. Avaliação das alterações hematológicas após imunização com EL28+pE e desafio com o DENV-3. A. Contagem total e diferencial de leucócitos 2 dias após o desafio com DENV3; **B.** Número de plaquetas x10³ por μL de sangue; **C.** Porcentagem de hematócrito, em sangue heparinizado, antes e depois da infecção por dengue entre os grupos imunizados e não imunizados. Os dados foram analisados por One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey.

3.2. Citometria de Fluxo

3.2.1. Análise da proliferação de linfócitos do tipo T CD8⁺ e T CD4⁺ nos esplenócitos dos camundongos imunizados com a Pe+EL28 e desafiados com o DENV-3

O resultado da contagem total de esplenócitos em câmara de Neubauer é mostrado na **Figura 9.A**. Após a contagem das células, 1×10^6 células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Os esplenócitos ficaram em cultivo por 24 horas, e então as células foram reestimuladas, *overnight*, com PMA/Ionomicina, um controle positivo que possui habilidade em estimular a expressão de citocinas em células T ativadas. Após esse período, as células foram incubadas por 4 horas com brefeldina para inibir a secreção de citocinas intracelulares (nesse caso de IFN- γ). Em seguida, o sobrenadante celular foi coletado para avaliação da produção de citocinas e o cultivo celular foi incubado com marcadores de superfície e intracelulares, conforme especificados na **Tabela 2**, e então, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram que a infecção com DENV-3 induziu, significativamente, o aumento do número total de células no baço, assim como o número de linfócitos do tipo T CD8 e CD4, conforme mostrado na **Figura 9.A, B e C**, respectivamente. Entretanto, não houve aumento significativo no número total de esplenócitos, nos subgrupos imunizados individualmente com EL28 ou em conjunto com pE+EL28 após a infecção com o DENV-3 se comparado aos animais controle não-infectados.

A



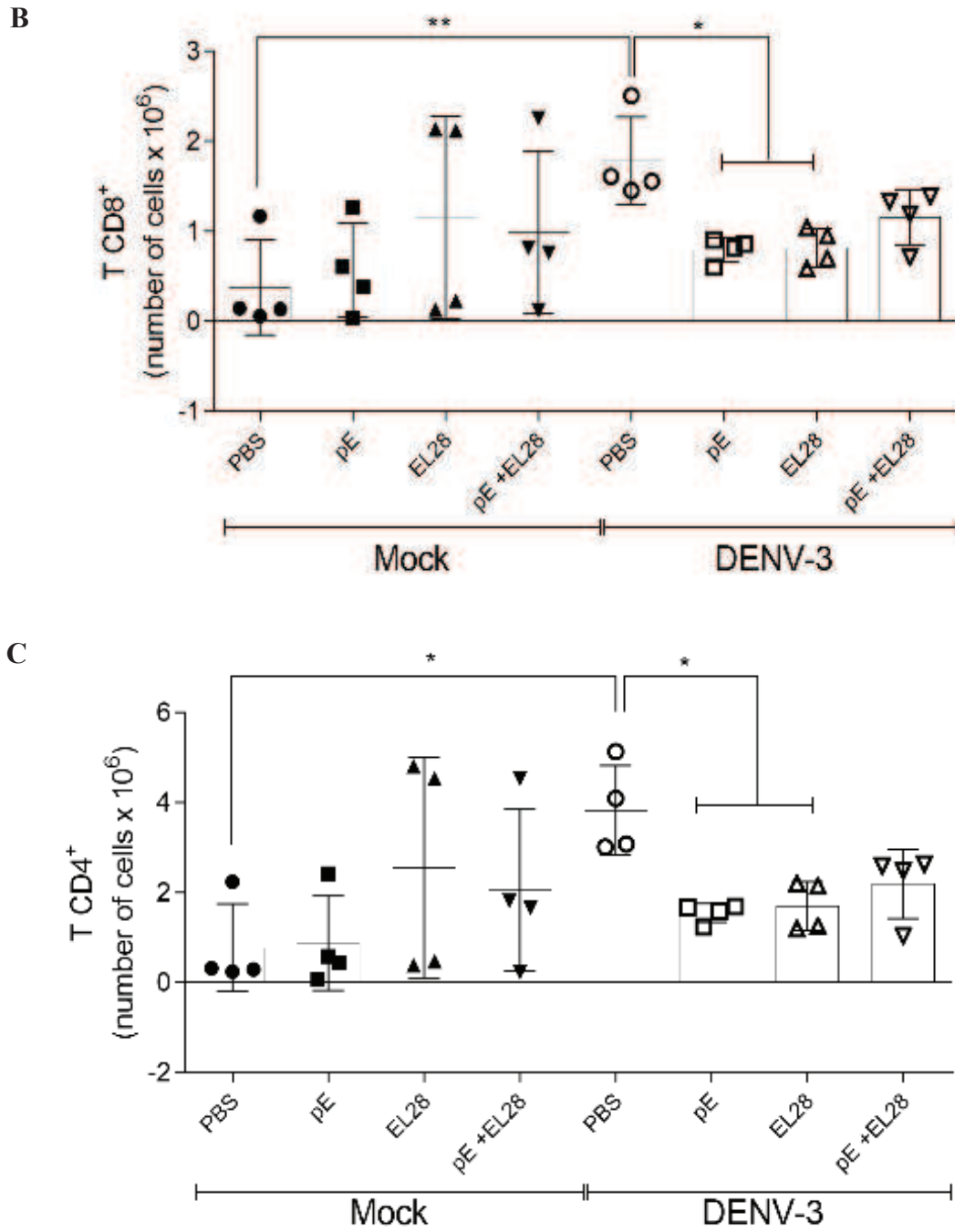
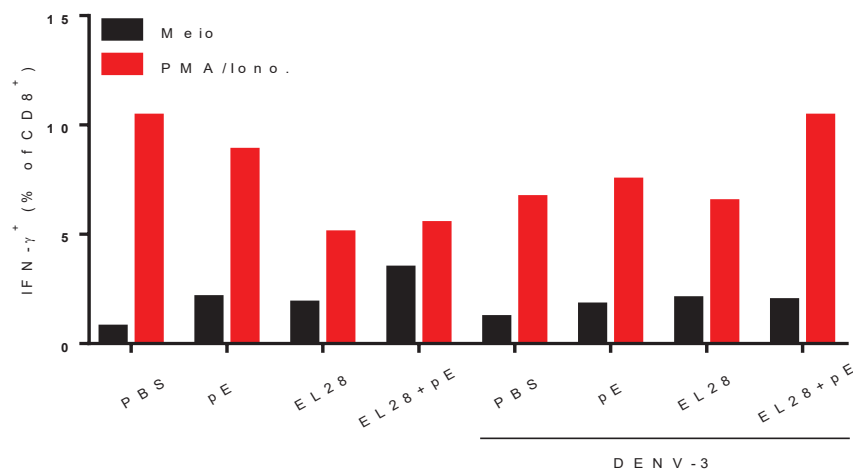


Figura 9. Efeito do peptídeo EL28 na proliferação de esplenócitos totais, linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺. A. Contagem total de células do baço; B. e C. número de células T CD8 e T CD4, respectivamente, em relação ao número total de linfócitos. Os dados foram analisados por One-way ANOVA com teste de comparação múltipla de Tukey.

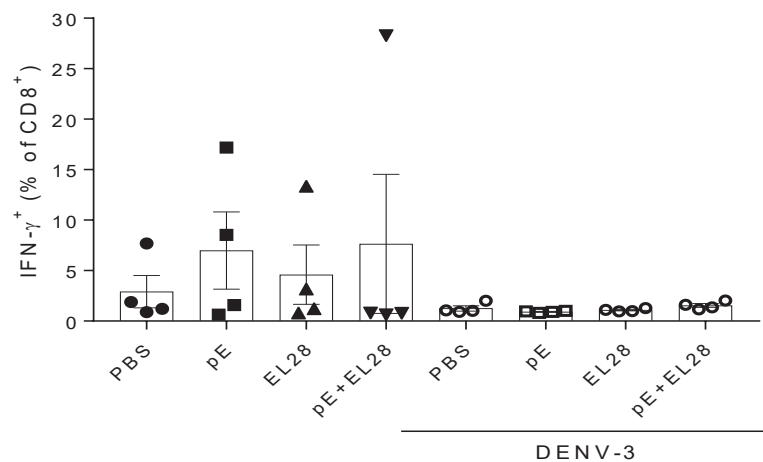
3.2.2. Análise da expressão de IFN- γ e de marcadores de superfície celular de T ativadas, células T de memória central e efetora, em linfócitos do tipo T CD8⁺ e T CD4⁺

Conforme descrito anteriormente, para confirmar a expressão de IFN- γ por células T ativadas, os esplenócitos foram incubados com PMA/Ionomicina, *overnight*, e em seguida incubados com Brefeldina por 4 horas. A expressão de IFN- γ , células T ativadas (CD69), células T de memória central (CD44^{high} CD62L^{high}) e efetora (CD44^{high} CD62L^{low}), em linfócitos do tipo T CD8⁺ e T CD4⁺, foi analisada por citometria de fluxo. A expressão de IFN- γ por linfócitos do tipo T CD8⁺ e T CD4⁺ pode ser observada na **Figura 10.A** e **11.A**, após estímulo com PMA/Ionomicina, confirmando a ativação das células T. A expressão de IFN- γ teve grande variabilidade dentro de um mesmo subgrupo de dados (**Figuras 9.B** e **11.B**, grupo mock), entretanto, após desafio com DENV-3, essa variabilidade não foi observada. Além disso, não houve diferença na expressão de IFN- γ pelos linfócitos do tipo T CD8⁺ e T CD4⁺ (**Figuras 10.B** e **11.B**). Assim como a expressão de IFN- γ , não houve diferença nos níveis de expressão de CD69 pelas células T (**Figuras 12.C** e **13.C**).

10.



10.B



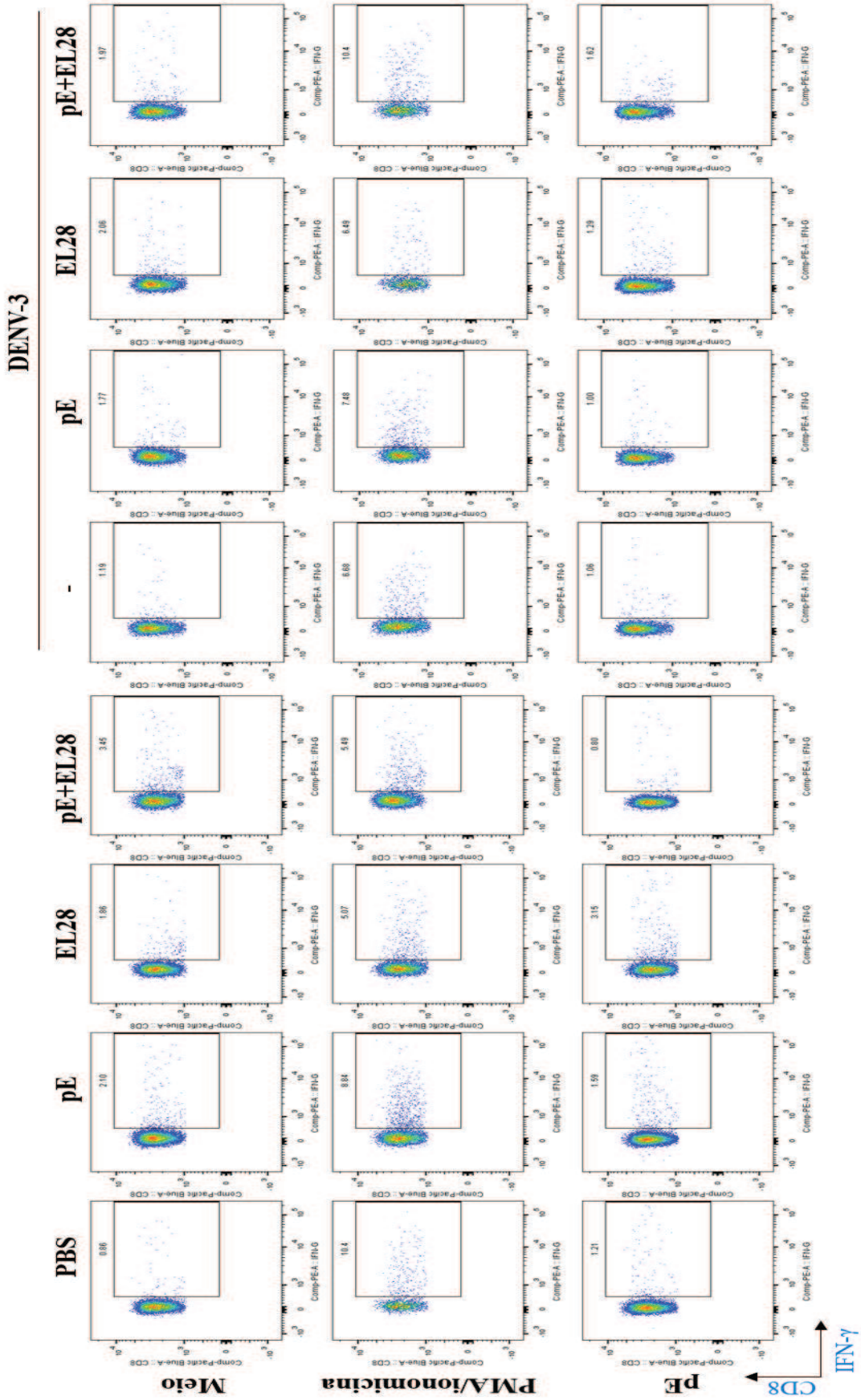
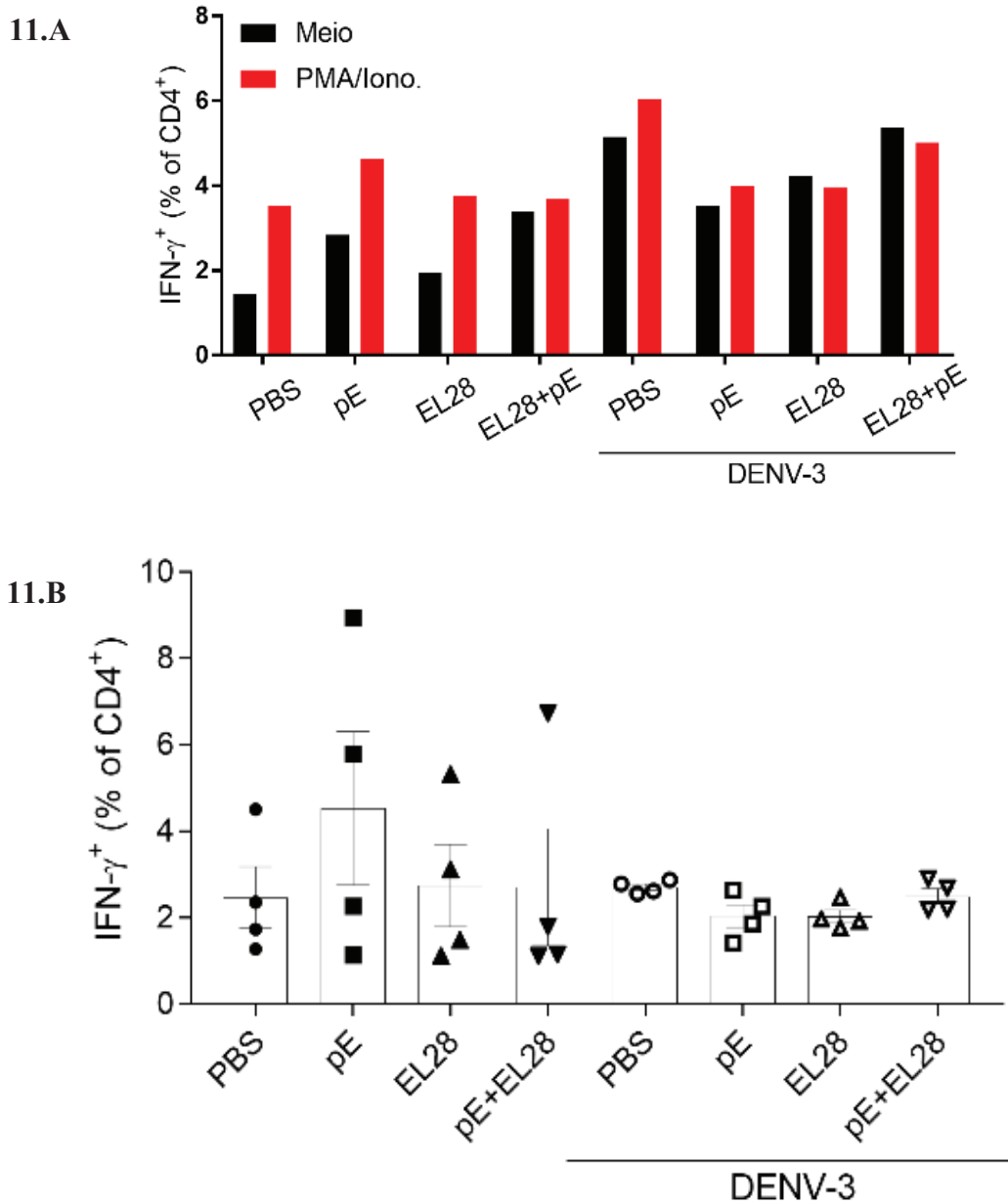


Figura 10. Efeito do peptídeo EL28 na expressão de IFN- γ por linfócitos do tipo T CD8⁺. A. Marcação representativa do subgrupo de linfócitos do tipo T CD8⁺ e células expressando IFN- γ ; **B.** Esplenócitos estimulados com PMA/Ionomicina para produção intracelular de citocinas e não estimulados (Meio). Expressão de IFN- γ por linfócitos do tipo T CD8⁺ ativadas, sem e com estímulo; **C.** Porcentagem de expressão de IFN- γ em linfócitos do tipo T CD8⁺ induzindo pelos esquemas de imunização, nos grupos não infectados (MOCK) e após desafio (DENV-3)



11.C

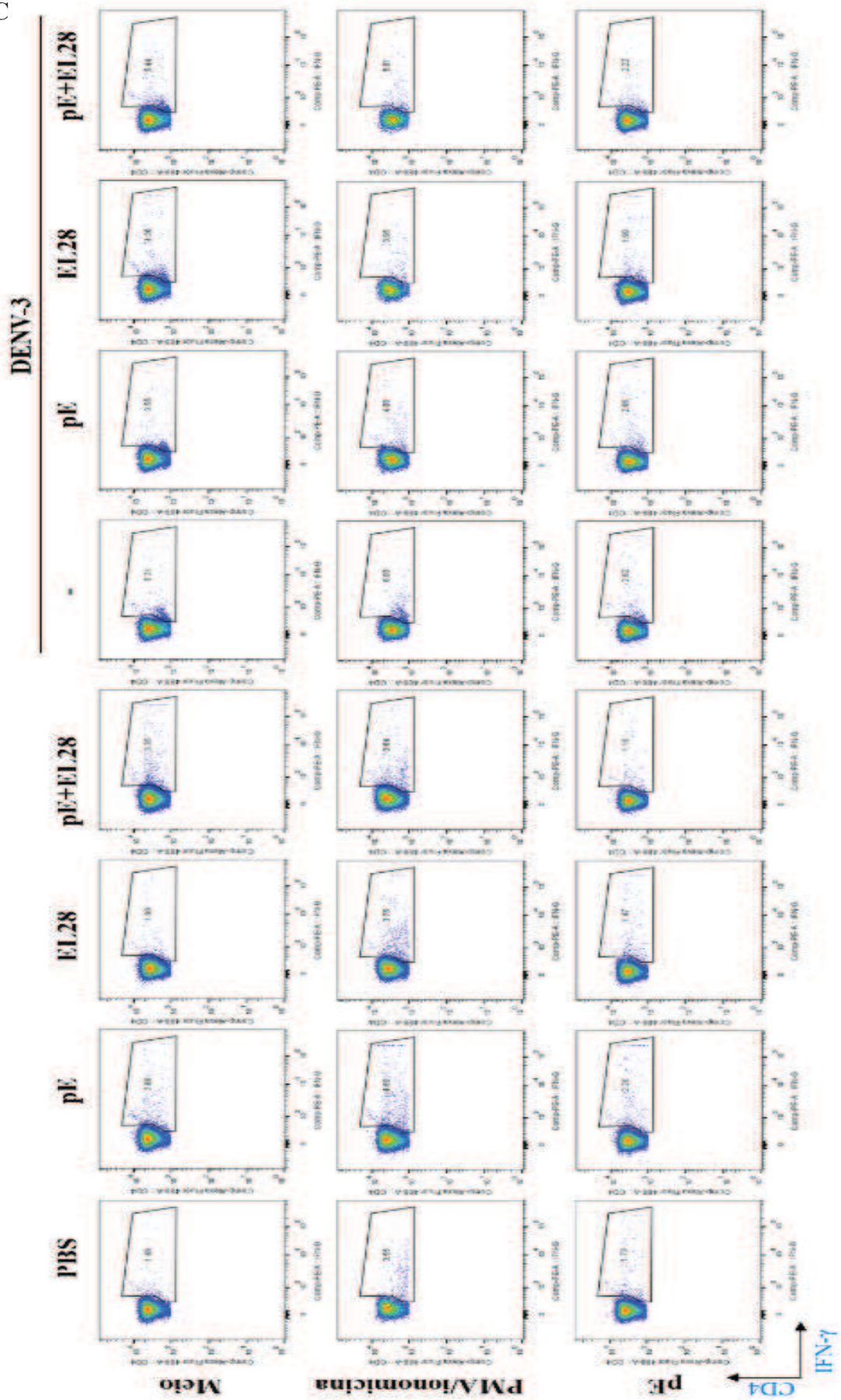
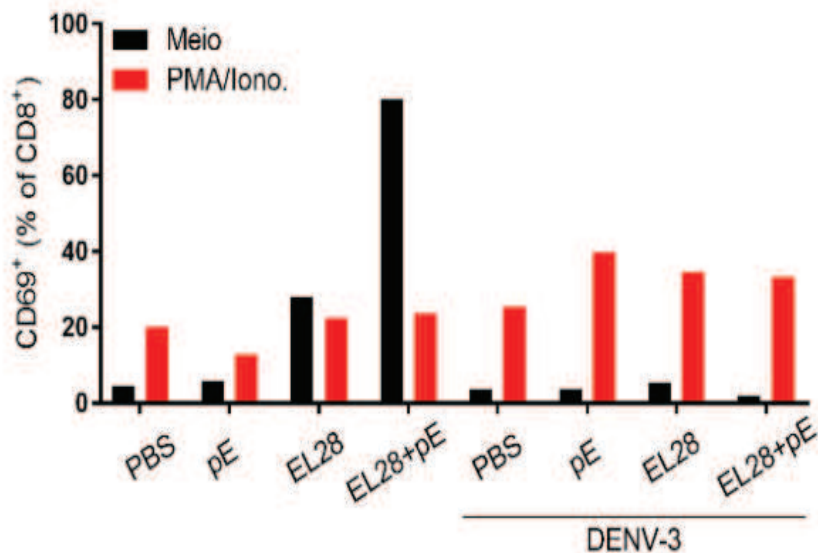
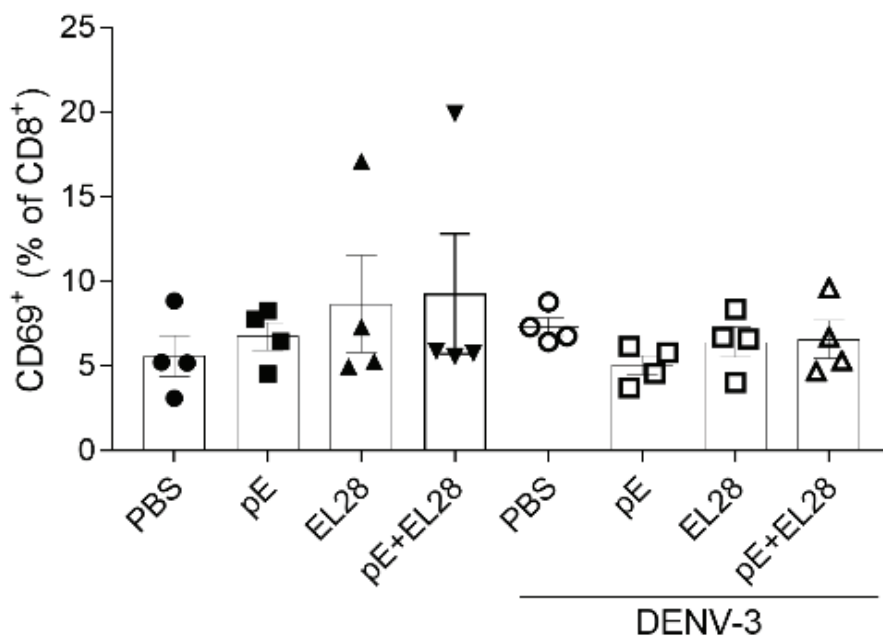


Figura 11. Efeito do peptídeo EL28 na expressão de IFN- γ por linfócitos do tipo T CD4⁺. C. Marcação representativa do subgrupo de linfócitos do tipo T CD4⁺ e células expressando IFN- γ ; **A.** Esplênocitos estimulados com PMA/Ionomicina para produção intracelular de citocinas e não estimulados (Meio). Expressão de IFN- γ por linfócitos do tipo T CD8⁺ ativadas, sem e com estímulo; e **B.** Porcentagem de expressão de IFN- γ em linfócitos do tipo T CD4⁺ induzindo pelos esquemas de imunização, nos grupos não infectados (MOCK) e após desafio (DENV-3)

12.A



12.B



12.C

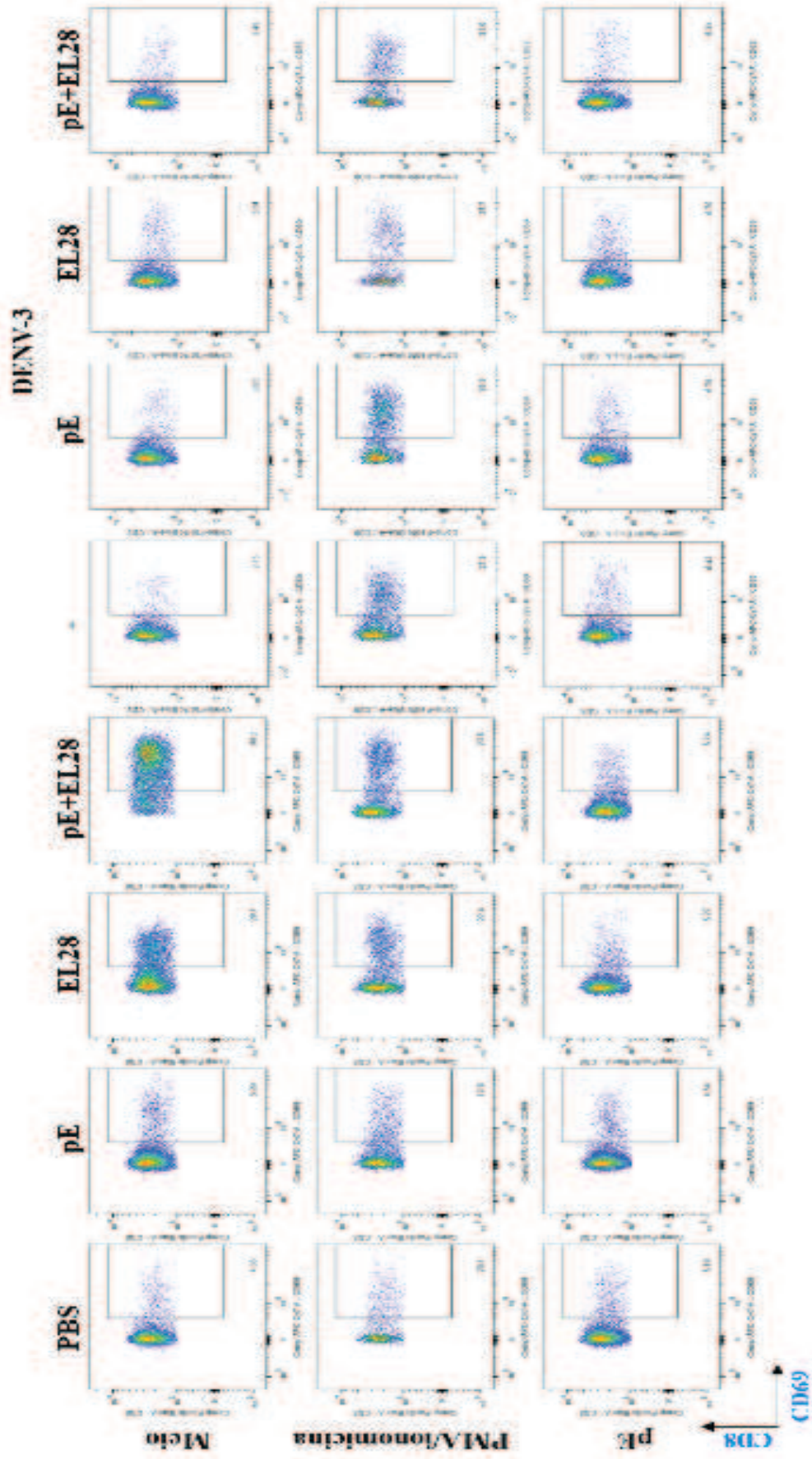
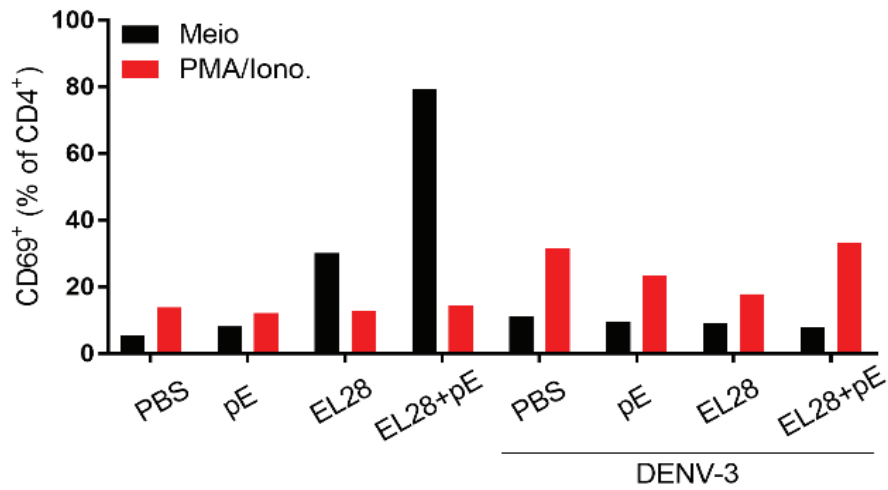
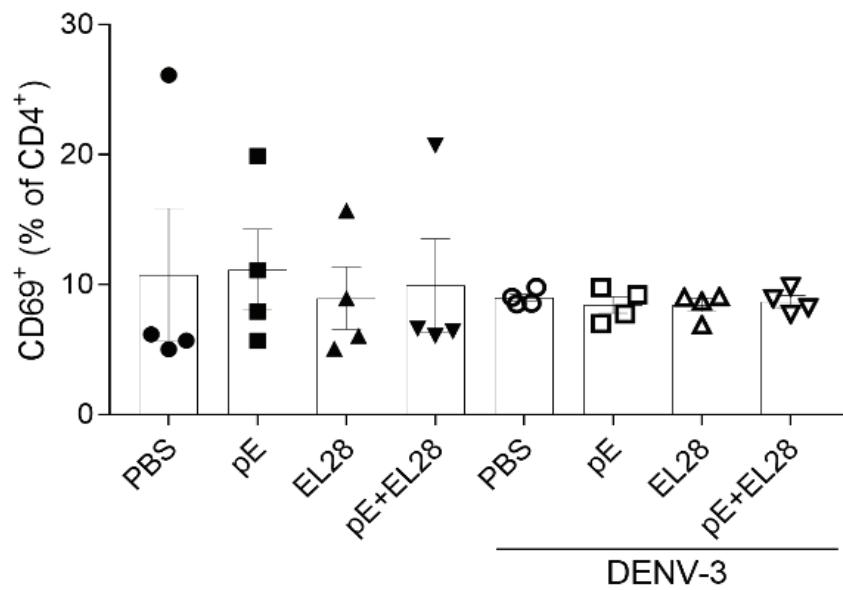


Figura 12. Efeito do peptídeo EL28 na expressão de CD69 por linfócitos do tipo T CD8⁺. C. Marcação representativa do subgrupo de linfócitos do tipo T CD8⁺ e células expressando IFN- γ ; **A.** Esplenócitos estimulados com PMA/Ionomomicina para produção intracelular de citocinas e não estimulados (Meio). Expressão de CD69 por linfócitos do tipo T CD8⁺ ativadas, sem e com estímulo; **B.** Porcentagem de expressão de CD69 em linfócitos do tipo T CD8⁺ induzindo pelos esquemas de imunização, nos grupos não infectados (MOCK) e após desafio (DENV-3)

13.A



13.B



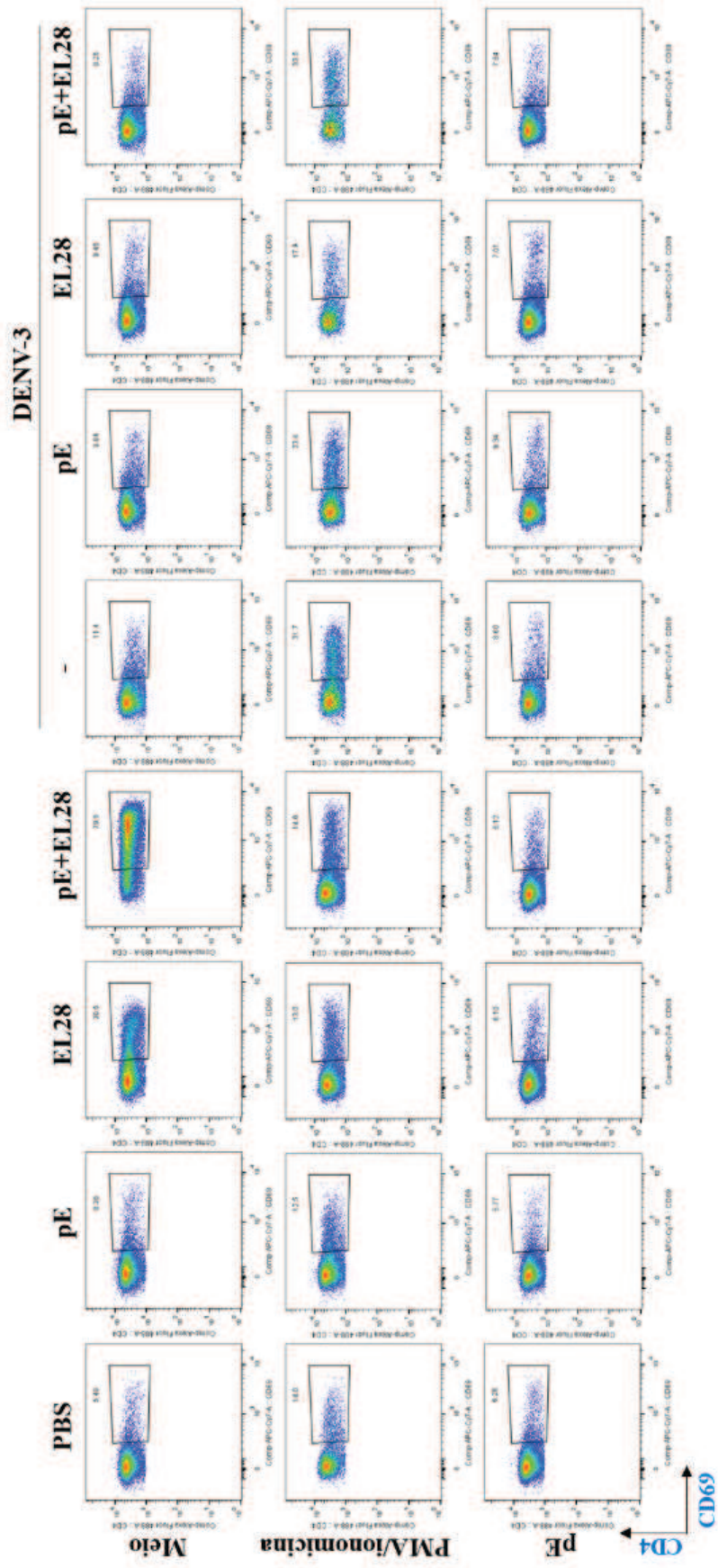
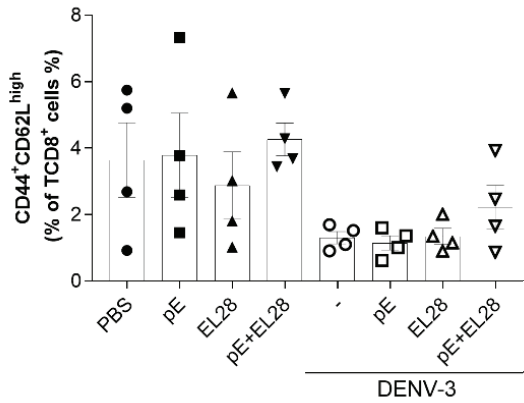
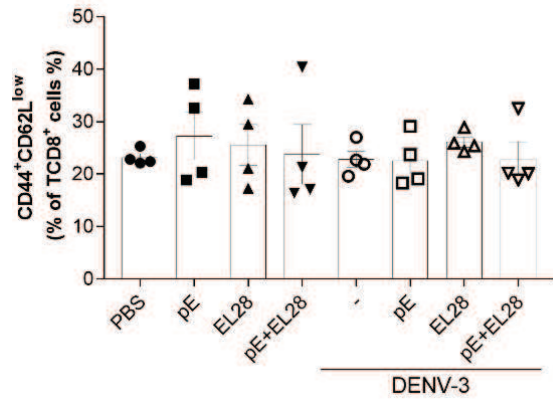


Figura 13. Efeito do peptídeo EL28 na expressão de CD69 por linfócitos do tipo T CD4⁺. C. Marcação representativa do subgrupo de linfócitos do tipo T CD8⁺ e células expressando IFN- γ ; **A.** Esplenócitos estimulados com PMA/Ionicina para produção intracelular de citocinas e não estimulados (Meio). Expressão de CD69 por linfócitos do tipo T CD4⁺ ativadas, sem e com estímulo; **B.** Porcentagem de expressão de CD69 em linfócitos do tipo T CD4⁺ induzindo pelos esquemas de imunização, nos grupos não infectados (MOCK) e após desafio (DENV-3)

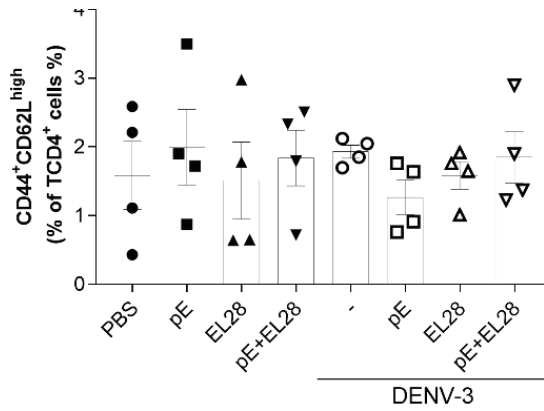
14.A



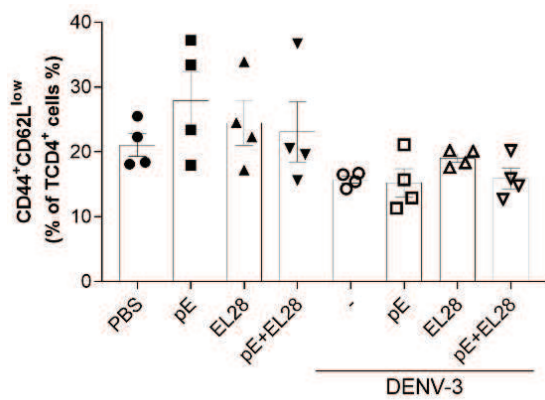
14.B



14.C



14.D



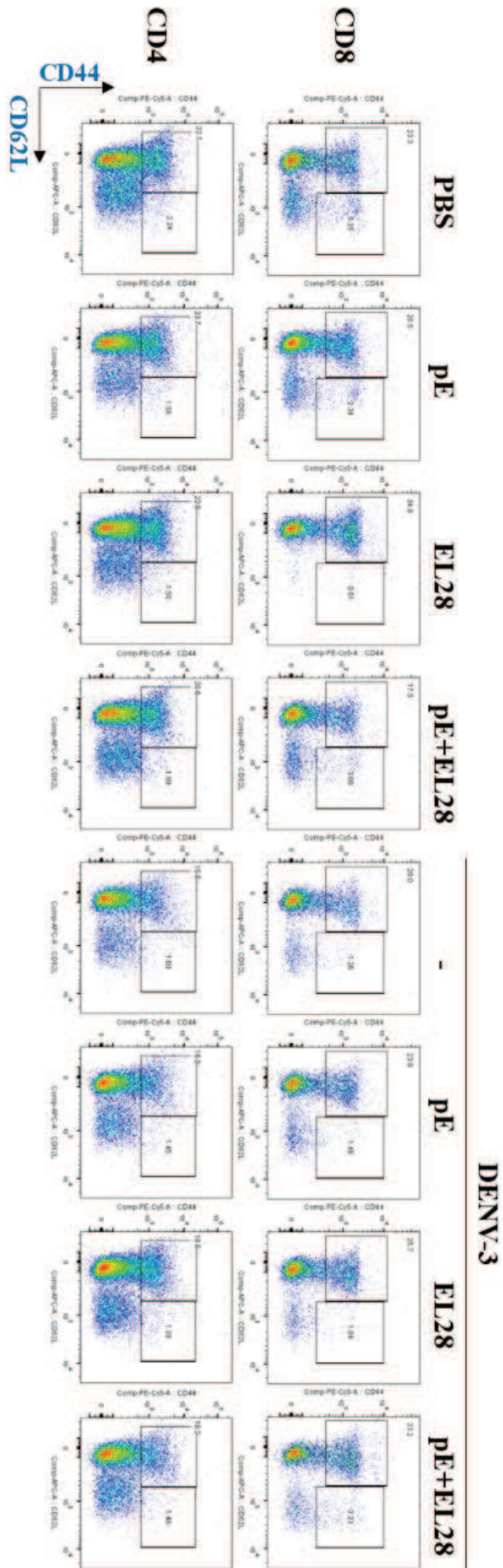
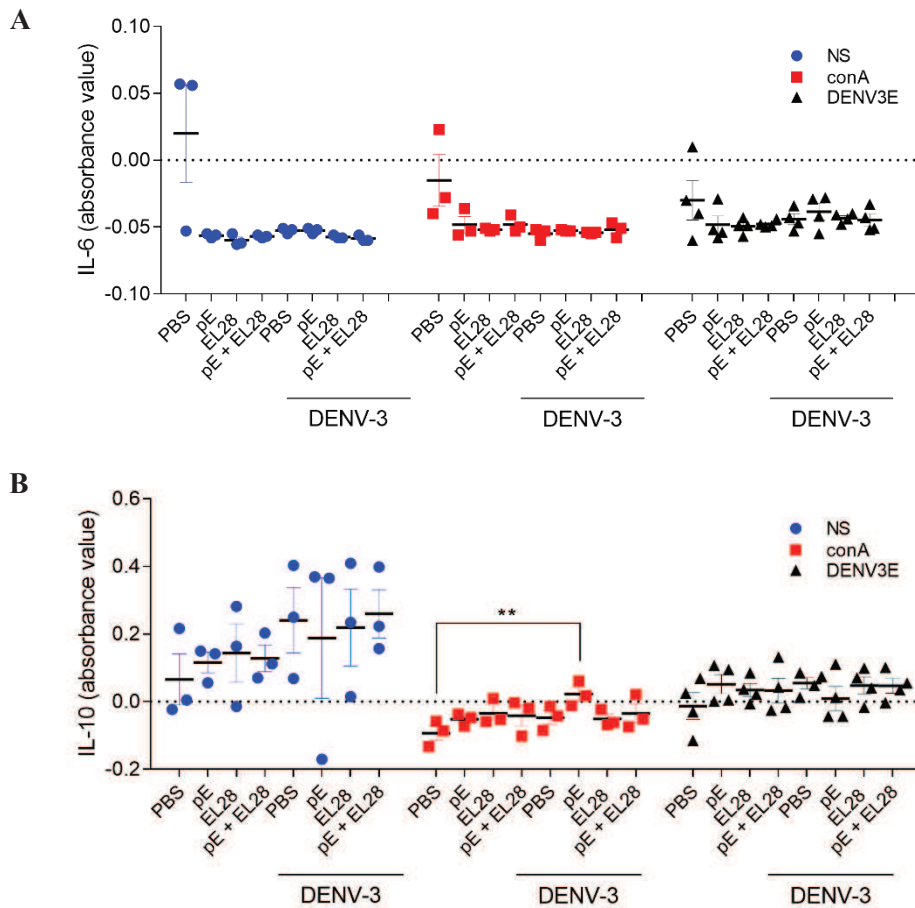


Figura 14. Distinção entre células T de memória central e memória efetora. E. Marcação representativa do subgrupo de linfócitos do tipo T CD8⁺ expressando os marcadores de superfície CD44^{high} CD62L^{high} e CD44^{high} CD62L^{low} (células T de memória central e efetora, respectivamente); **A. e B.** Respectivamente, porcentagem de linfócitos do tipo T CD8⁺ e CD4⁺ de memória central; **C. e D.** Respectivamente, porcentagem de linfócitos do tipo T CD8⁺ e CD4⁺ de memória efetora.

3.3. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

3.3.1. Avaliação da secreção de citocinas

Para avaliar o efeito do peptídeo EL28, isoladamente ou combinado com pE sobre a resposta imune celular, a secreção de citocinas (IL-6, IL-10, IL-17 e IFN- γ) foi analisada no sobrenadante da cultura celular pela técnica de ELISA. Os esplenócitos ficaram em cultivo por 24 horas, e então as células foram reestimuladas, *overnight*, com pE e conA, o qual possui habilidade para ativar células T. A expressão das citocinas analisadas ficou abaixo dos níveis detectados pelo ensaio conforme demonstrado nas **Figuras 15.A, B, C e D**.



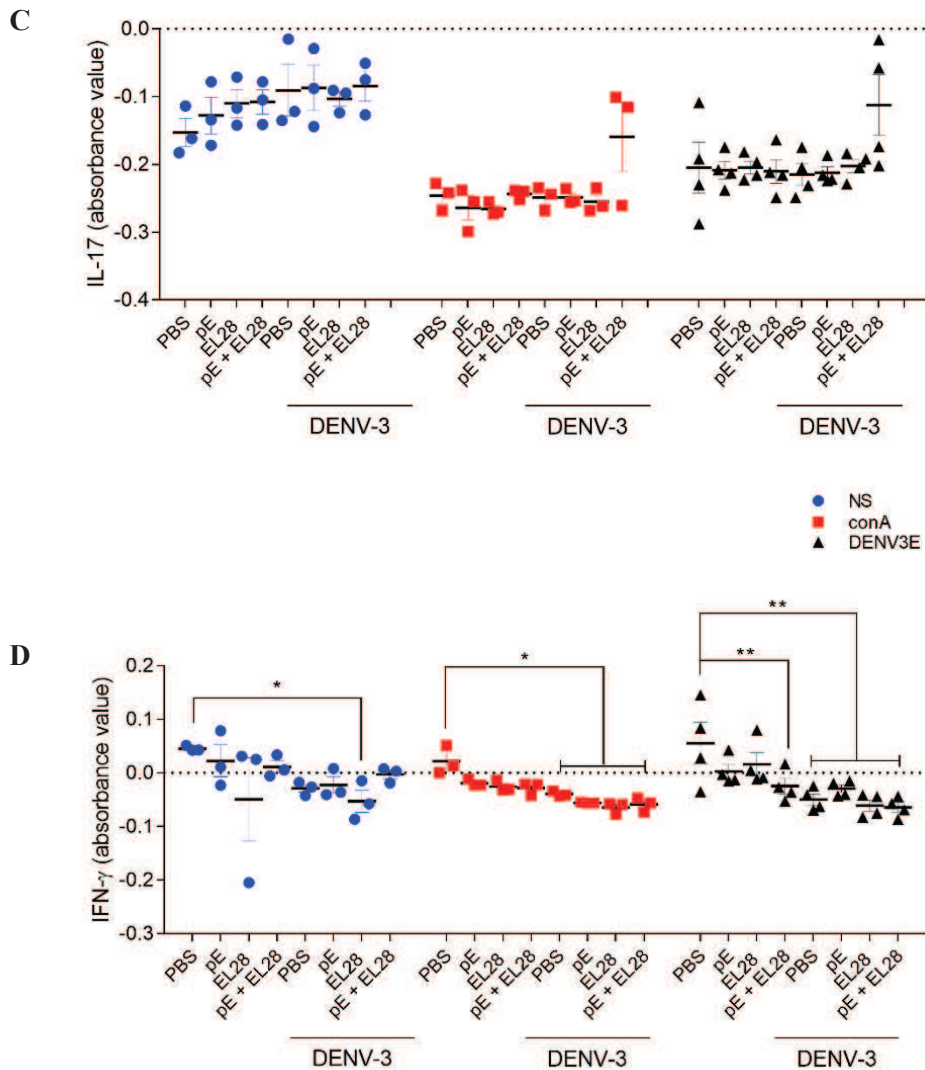
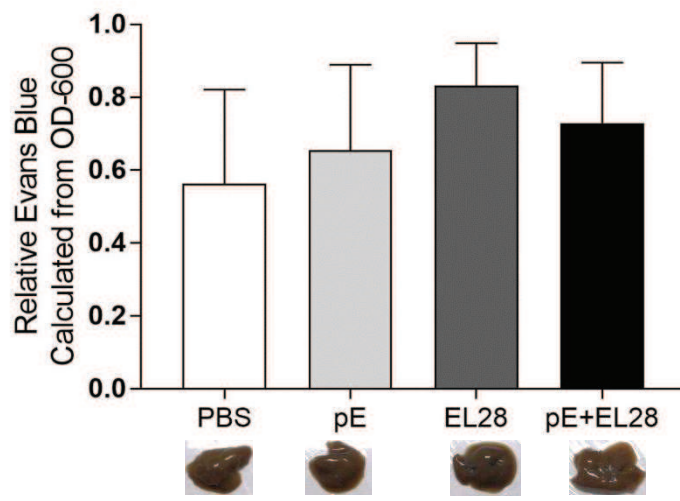


Figura 15. Gráficos demonstrativo da avaliação da secreção de citocinas por ensaio de ELISA. IL-6 (12.A), IL-10 (12.B), IL-17 (12.C) e IFN- γ (12.D). Os níveis de expressão das citocinas e de IFN- γ ficaram abaixo dos níveis de detectados pelo ensaio.

3.4. Ensaio de Permeabilidade Vascular (Modelo de perfusão Azul de Evans)

O extravazamento do corante Azul de Evans dos fígados de camundongos infectados foi avaliado para verificar se houve alteração na permeabilidade vascular após a infecção com DENV-3 e se o peptídeo EL28 combinado ou não com pE sendo capaz de reverter esse aumento, visto que trata-se de um sinal diretamente relacionado à ocorrência de manifestação grave da doença. Corroborando com o resultado do hematócrito, nosso modelo de infecção não foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade vascular nos camundongos infectados com DENV-3, conforme mostrado na **Figura 16**.



DENV-3

Figura 16. Quantificação do extravazamento do corante azul de Evans no tecido hepático. Imagens representativas dos fígados de camundongos depois da perfusão com salina estão representados abaixo das respectivas barras de dados.

4. DISCUSSÕES

A Glicoproteína E, um polipeptídeo imunodominante, é o principal alvo de anticorpos neutralizantes nas infecções pelo DENV. Por esta razão, tem sido usada como antígeno de escolha para esforços de desenvolvimento de vacinas.

A construção da pE (DENV3E), quando administrada pura, apresentou baixa eficiência no estímulo de resposta imune, conforme demonstrado por ⁶³, mas quando administrada com o antígeno carreador MWNT (*multi-walled carbon nanotubes*), mostrou-se mais imunogênica. A baixa eficiência imunogênica de DENV3E pura a torna uma candidata para testar a eficiência do peptídeo EL28 como adjuvante vacinal, tendo em vista sua função como potente imunoestimulante (*in vitro* e em camundongos), conforme resultados obtidos por Monte et al ⁴⁸.

A plaquetopenia é uma característica clínica marcante da infecção pelo DENV em humanos ⁷⁶ e modelos experimentais ⁷⁷. Os resultados das amostras de sangue de camundongos imunizados com pE+EL28 demonstraram uma reversão da plaquetopenia induzida pela infecção com DENV-3 (**Figura 8.B**). O mesmo não foi observado em relação ao número de leucócitos (**Figura 8.A**). Os resultados obtidos pela análise de citometria de fluxo, na qual avaliamos a proliferação de células T CD8 e T CD4, demonstraram que a infecção com DENV-3 foi capaz de aumentar o número total de células no baço (**Figura 9**).

A concentração de 100µM de peptídeo por dose, utilizada nesses experimentos, foi baseada em estudo publicado anteriormente, cujo os resultados foram bastante satisfatórios em relação à imunoestimulação ⁴⁸. Entretanto, grupos de estudo que avaliam peptídeos como adjuvantes de vacinas utilizam uma proporção maior de peptídeo em relação a quantidade de proteína (até 1:50) ^{78 79 80}. Em nossos experimentos a quantidade em massa de proteína em relação a quantidade de proteína foi de 1:5 (10µg de pE e 51,54µg de EL28-CPP), bem menos do que o utilizado em trabalhos já publicados. Apesar dos nossos resultados demonstrarem que o peptídeo EL28 sozinho não foi capaz de induzir aumento da proliferação de células no baço, a associação do peptídeo com a pE foi capaz de minimizar a trombocitopenia induzida pelo DENV-3 nos animais imunizados. Estes resultados sugerem que um novo experimento, visando caracterizar uma melhor dose de peptídeo por proteína, deveria ser realizado de modo que poderia resultar em efeitos mais significativos no cenário sob infecção.

Peptídeos CPPs, como o utilizado como carreador do peptídeo EL28, vem sendo incorporados à formulação de vacinas de antígenos ou formulação^{81; 82}. CPPs podem entregar antígeno diretamente no citoplasma das APCs seguindo a via não endocítica. A maioria dos estudos em que se utilizam CPP na formulação de vacinas, geralmente, apenas o uso de CPPs são insuficientes para a eficácia da vacina, sendo necessário um adjuvante adicional⁶⁹. Nesse sentido, a formulação utilizada neste trabalho está de acordo com considerações dadas em relação ao uso de CPPs, visto que o CPP estava conjugado com o peptídeo EL28, o qual demonstrou importante efeito sobre a estimulação da resposta imune⁴⁸. Além disso, a forma como CPPs são incorporados ao sistema de entrega é de grande importância, conforme demonstrado por Mohri et al. 2018, onde CPP foi conjugado com polímeros biocompatíveis e administrados em camundongos junto com antígenos do vírus influenza, no qual o modo de incorporação influenciou a eficácia e o zeta-potencial do enxerto das nanopartículas formadas e presumivelmente a conformação da unidade CPP⁸³. Portanto, há a necessidade de uma melhor avaliação da incorporação da ferramenta EL28-CPP à pE, em relação à condensação entre peptídeo e antígeno, à estabilidade e ao zeta-potencial do complexo formado⁷⁸.

Conforme demonstrado por Monte et al, o peptídeo EL28 parece ter um efeito sinérgico com IFN- γ quando foi capaz de aumentar a expressão da subunidade $\beta 5_i$, apesar de o peptídeo EL28 sozinho não ter sido capaz de induzir essa expressão. IFN- γ é sugerido em vários estudos ser capaz de induzir a diferenciação Th1^{84; 85; 86; 87}. Tendo em vista esse efeito sinérgico de EL28 com IFN- γ e, sabendo que estudos com a proteína pE apenas não foi capaz de induzir, significativamente, expressão de IFN- γ ⁶³, suponho que o efeito imunestimulador de EL28 fosse mais indicado na formulação de vacinas que funcionem como indutores iniciais da resposta celular, como por exemplo, vacinas derivadas de subunidades como NS3⁷⁸, NS4⁸⁸ e NS1⁸⁹ e derivadas de DNA que provocam um estímulo na proliferação de células T CD8⁺⁹⁰, ou seja, EL28 quando combinado com um “gatilho” da resposta Th1 pode melhorar a resposta inicialmente estimulada, apesar de outras vacinas, com construções diferentes da proteína E, apresentarem aumento da produção de citocinas relacionadas à Th1 (IL-2, IL-12p70, IL-17, IFN- γ)^{91; 92; 93}.

Como dito anteriormente, a vacinação tem sido uma intervenção médica eficiente com o objetivo de reduzir morbidades e mortes causadas por diversas doenças. No século passado, tecnologias inovadoras permitiram o desenvolvimento de novas vacinas contra várias doenças⁹⁴. Entre diferentes modalidades, as estratégias de imunização *prime-boost* podem aumentar a imunidade no hospedeiro^{95; 96}. Este tipo de estratégia é definido como

um regime de imunização na qual utiliza-se um mesmo imunógeno durante a primeira dose (*prime*) e os reforços (*boost*), denominada imunização homóloga, ou então, é utilizada uma combinação de imunógenos diferentes durante a primeira dose e o reforço (imunização heteróloga) ⁹⁵. O principal objetivo da estratégia *prime-boost* é o de estimular altos níveis de imunidade comparada a resposta imune obtida de uma única vacinação ou pela inoculação com um mesmo antígeno. Além disso, essa abordagem busca provocar uma resposta imune tanto humoral, quanto celular, com o objetivo de induzir uma imunidade mais duradoura ^{96; 97}. Em nossos estudos, utilizamos a estratégia *prime-boost-boost* (1 dose e 2 reforços) com o mesmo imunógeno, a qual foi eficiente para estimular uma resposta imune contra a proteína E combinado com o antígeno MWT ⁶³, conforme documentando anteriormente. No entanto, alguns estudos têm demonstrado que estratégias *prime-boost* baseadas em combinações de diferentes antígenos durante as imunizações poderiam ser vantajosas no campo da dengue, ajudando a induzir um balanço da resposta imune contra os 4 sorotipos ^{98; 99}. Vacinas de subunidades, geralmente, induzem uma resposta humoral (Th2), enquanto vacinas de DNA e vacinas do vírus vivo atenuado uma resposta imune mediada por célula (Th1). Sabendo que o número de doses, o tempo entre cada dose, a rota de vacinação e adjuvantes, poderiam afetar os resultados esperados da imunização ⁹⁵, e ainda, tendo em vista o efeito sinérgico do peptídeo EL28 com IFN- γ ⁴⁸, o qual é capaz de induzir uma resposta Th1 ^{65,66,67,68}, um regime de imunização *prime-boost*, combinando diferentes antígenos, como por exemplo, um *prime* com vacina de DNA combinada com o peptídeo EL28, e um *boosting* com pE poderia ser uma melhor opção para induzir tanto uma resposta humoral, quanto uma resposta imune celular, com foco na indução de resposta protetora de anticorpo, exarcebando, portanto, o efeito do peptídeo EL28, no qual poderíamos ter observado melhor seu efeito como adjuvante.

Diferentes modelos animais são usados para testar drogas antivirais em testes pré-clínicos ou para o estudo de desenvolvimento de vacinas. Vários modelos animais para DENV estão sendo testados e todos eles apresentam vantagens e desvantagens. Camundongos imunocomprometidos, deficientes para o receptor dos IFN- α/β (A129) e IFN- α/β e receptores γ (AG129), até o momento são os modelos animais mais populares para a avaliação terapêutica e da patogênese de DENV ^{100; 101}, entretanto, não são um modelo ideal para estudos de vacina, devido à ausência de componentes dependentes da resposta imune antiviral de IFNs ^{102; 103}. Um grande obstáculo ao desenvolvimento de vacinas do flavivírus não-encefálico de DENV tem sido a ausência de modelos animais

relevantes¹⁰⁴. Em alguns modelos de animais imunocompetentes, a presença de DENV é, transitoriamente, detectada no soro¹⁰⁵. Além disso, a ausência de sinais evidentes de doença após a infecção por DENV tem sido uma grande desvantagem dos modelos WT até o momento^{100; 105}. Uma explicação para isto é a capacidade do vírus em, especificamente, bloquear a resposta de interferons murinos. Quando camundongos, e outros hospedeiros não-naturais são infectados, a resposta a interferons é ativada e interfere com a replicação precoce do vírus, resultando em uma infecção local muito limitada que não causa a doença¹⁰⁴. Portanto, o modelo animal imunocompetente, apesar de suas desvantagens, é um modelo adequado para avaliação do efeito de vacinas sobre todos os componentes da resposta imune. Em nosso estudo utilizamos um modelo animal em camundongos de linhagem imunocompetente (C57BL/6) infectados por um isolado clínico do DENV-3, nos quais os sinais de maior gravidade da doença, tais como, hemoconcentração e aumento da permeabilidade vascular (**Figura 8.C** e **Figura 16**, respectivamente), não foram observados, apesar de a infecção pelo DENV ter causado linfopenia e plaquetopenia, alterações hematológicas comumente encontradas em pacientes com dengue (**Figura 8.A** e **8.B**, respectivamente). Essa ausência, de sinais clínicos indicativos de dengue grave, pode ser explicada pela idade dos animais utilizada no momento da infecção (~ 9 semanas de vida) ou seja, camundongos adultos jovens. Diversos estudos já demonstraram que camundongos imunocompetentes adultos são resistentes a infecção por diversos isolados clínicos de arbovirus (ST John et al., 2013; Costa et al., 2013; Fagundes et al., 2011). Em geral, doença mais grave é observada apenas em animais jovens (~ 4 semanas ou menos de vida) ou em animais adultos infectados com linhagens virais adaptadas ao hospedeiro murino (Costa et al., 2013; Fagundes et al., 2011). No presente estudo, camundongos mais jovens não puderam ser utilizados no momento da infecção visto que o protocolo de imunização proposto era longo. Para uma melhor avaliação dos efeitos causados por EL28+pE, modificações no esquema de imunização devem ser realizadas.

5. CONCLUSÕES

- A associação do peptídeo EL28+pE não ofereceu vantagem em relação a administração de ambas moléculas isoladas em relação à estimulação da resposta imune de camundongos C57/BL6;
- A proporção peptídeo/proteína utilizada em nossos experimentos foi bem menor do que a utilizada em trabalhos já publicados. Uma dose resposta do peptídeo em relação à quantidade de pE deverá ser realizada em estudos posteriores;
- EL28 parece ter um efeito sinérgico com IFN- γ , conforme demonstrado em estudo anterior, isso supõe que seja necessário um “gatilho” de resposta Th1, a qual seria amplificada por EL28;
- Nosso esquema de imunização é, relativamente, longo. O modelo animal utilizado é mais suscetível à infecção quando infectados até 5 semanas de idade;
- Modificações no esquema de imunização devem ser realizadas para que um efeito exacerbado do peptídeo EL28 possa ser observado;
- O peptídeo EL28 poderá ser testado com outras vacinas de subunidade ou de DNA para avaliação do seu efeito como adjuvante vacinal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563266> >.
- 2 SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, M. D. S. **Boletim epidemiológico 13** 2019.
- 3 NORMILE, D. **Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in. Science**: 415 p. 2013.
- 4 KATZELNICK, L. C., FONVILLE, J.M., GROMOWSKI, G.D., BUSTOS ARRIAGA, J., GREEN, A., JAMES,. **Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. Science**: 1338-1343 p. 2015.
- 5 ESTOFOLETE, C. F. et al. Unusual clinical manifestations of dengue disease - Real or imagined? **Acta Trop**, v. 199, p. 105134, Aug 2019. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31415737> >.
- 6 ST JOHN, A. L. et al. Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. **Elife**, v. 2, p. e00481, Apr 2013. ISSN 2050-084X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638300> >.
- 7 KATZELNICK, L. C. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **American Association for the Advancement of Science**, 2017.
- 8 LIMA, F. R. et al. Evaluation of the traditional and revised World Health Organization classifications of dengue cases in Brazil. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 10, p. 1299-304, Oct 2013. ISSN 1980-5322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212835> >.
- 9 KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annu Rev Microbiol**, v. 62, p. 71-92, 2008. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429680> >.
- 10 MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 587-619, 2011. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219187> >.
- 11 ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 532-43, Jul 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760609> >.

- 12 HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 421-67, 2003. ISSN 0065-3527. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689700> >.
- 13 NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 9, p. 1376-81, Sep 2005. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229765> >.
- 14 ROSEN, L. The pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. A critical appraisal of current hypotheses. **S Afr Med J**, v. Suppl, p. 40-2, Oct 1986. ISSN 0256-9574. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3775560> >.
- 15 LEE S, N. M. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. **Immune Netw** p. 15:51–57 2015.
- 16 CAPEDING MR, T. N., HADINEGORO SR, ISMAIL HI, CHOTPITAYASUNONDH T, CHUA MN, LUONG CQ, RUSMIL K, WIRAWAN DN, NALLUSAMY R, PITISUTTITHUM P, THISYAKORN U, YOON IK, VAN DER VLIET D, LANGEVIN E, LAOT T, HUTAGALUNG Y, FRAGO C, BOAZ M, WARTEL TA, TORNIEPORTH N. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **Lancet**, p. 1358-65, 2014.
- 17 VILLAR L, D. G., ARREDONDO-GARCÍA JL, RIVERA DM, CUNHA R, DESEDA C, REYNALES H, COSTA MS, MORALES-RAMÍREZ JO, CARRASQUILLA G, REY LC, DIETZE R, LUZ K, RIVAS E, MIRANDA MONTOYA MC, CORTÉS SUPELANO M, ZAMBRANO B, LANGEVIN E, BOAZ M, TORNIEPORTH N, SAVILL. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **N Engl J Med**, 2015.
- 18 SRIDHAR, S. et al. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. **N Engl J Med**, v. 379, n. 4, p. 327-340, Jul 2018. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29897841> >.
- 19 HALSTEAD SB, R. P. Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. **Vaccine**, p. 1195-206, 2016.
- 20 SÁEZ-LLORENS, X. et al. Immunogenicity and safety of one versus two doses of tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 2-17 years in Asia and Latin America: 18-month interim data from a phase 2, randomised, placebo-controlled study. **Lancet Infect Dis**, v. 18, n. 2, p. 162-170, 02 2018. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29122463> >.
- 21 RUPP, R. et al. Safety and immunogenicity of different doses and schedules of a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TDV) in healthy adults: A Phase 1b randomized study. **Vaccine**, v. 33, n. 46, p. 6351-9, Nov 2015. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26384447> >.

- 22 GEORGE, S. L. et al. Safety and Immunogenicity of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Flavivirus-Naive Adults: A Randomized, Double-Blinded Phase 1 Clinical Trial. **J Infect Dis**, v. 212, n. 7, p. 1032-41, Oct 2015. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25791116> >.
- 23 WHITEHEAD, S. S. et al. In a randomized trial, the live attenuated tetravalent dengue vaccine TV003 is well-tolerated and highly immunogenic in subjects with flavivirus exposure prior to vaccination. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 5, p. e0005584, 05 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28481883> >.
- 24 DONG, J. C.; KOBINGER, G. P. Hypothesis driven development of new adjuvants: short peptides as immunomodulators. **Hum Vaccin Immunother**, v. 9, n. 4, p. 808-11, Apr 2013. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563510> >.
- 25 ABDULHAQQ, S. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. **Immunol Res**, v. 42, n. 1-3, p. 219-32, 2008. ISSN 0257-277X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066740> >.
- 26 FOGED, C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. **Ther Deliv**, v. 2, n. 8, p. 1057-77, Aug 2011. ISSN 2041-5990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826868> >.
- 27 LIU, M. A.; ULMER, J. B. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. **Adv Genet**, v. 55, p. 25-40, 2005. ISSN 0065-2660. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291211> >.
- 28 FERRARO, B. et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. **Clin Infect Dis**, v. 53, n. 3, p. 296-302, Aug 2011. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765081> >.
- 29 AZMI, F. et al. Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 3, p. 778-96, 2014. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24300669> >.
- 30 COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492-503, Oct 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029960> >.
- 31 OBEID, J.; HU, Y.; SLINGLUFF, C. L. Vaccines, Adjuvants, and Dendritic Cell Activators-- Current Status and Future Challenges. **Semin Oncol**, v. 42, n. 4, p. 549-61, Aug 2015. ISSN 1532-8708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26320060> >.

- 32 NAGPAL, G. et al. Computer-aided prediction of antigen presenting cell modulators for designing peptide-based vaccine adjuvants. **J Transl Med**, v. 16, n. 1, p. 181, 07 2018. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29970096> >.
- 33 ORESKOVIC, Z. et al. Aspects of intradermal immunization with different adjuvants: The role of dendritic cells and Th1/Th2 response. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0211896, 2019. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30742635> >.
- 34 DI PASQUALE, A. et al. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. **Vaccines (Basel)**, v. 3, n. 2, p. 320-43, Apr 2015. ISSN 2076-393X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26343190> >.
- 35 DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R.; DIDIERLAURENT, A. M. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. **Semin Immunol**, May 2018. ISSN 1096-3618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29801750> >.
- 36 DEN BROK, M. H. et al. Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. **Nat Commun**, v. 7, p. 13324, 11 2016. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27819292> >.
- 37 SUN, B. et al. Polysaccharides as vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 36, n. 35, p. 5226-5234, 08 2018. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30057282> >.
- 38 SCHIJNS VEJC, L. E. Trends in vaccine adjuvants. **Expert Rev Vaccines**, p. 10:539–550, 2011.
- 39 CHEN, J.; NI, G.; LIU, X. S. Papillomavirus virus like particle-based therapeutic vaccine against human papillomavirus infection related diseases: immunological problems and future directions. **Cell Immunol**, v. 269, n. 1, p. 5-9, 2011. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21477796> >.
- 40 BOWERSOCK, T. L.; MARTIN, S. Vaccine delivery to animals. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 38, n. 2, p. 167-194, Jul 1999. ISSN 1872-8294. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837755> >.
- 41 SEUBERT, A. et al. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **J Immunol**, v. 180, n. 8, p. 5402-12, Apr 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390722> >.
- 42 AWATE, S. et al. Activation of adjuvant core response genes by the novel adjuvant PCEP. **Mol Immunol**, v. 51, n. 3-4, p. 292-303, Jul 2012. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521769> >.

- 43 APOSTÓLICO, J. E. S. et al. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. **J Immunol Res**, v. 2016, p. 1459394, 2016. ISSN 2314-7156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27274998> >.
- 44 COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants--a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, v. 15, n. 3, p. 248-56, Feb 1997. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9139482> >.
- 45 HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 12, p. 1551-7, Dec 2006. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160061> >.
- 46 VANDAMME, D. et al. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. **Cell Immunol**, v. 280, n. 1, p. 22-35, Nov 2012. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246832> >.
- 47 DE ARAUJO, C. B. et al. Intracellular Peptides in Cell Biology and Pharmacology. **Biomolecules**, v. 9, n. 4, Apr 2019. ISSN 2218-273X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30995799> >.
- 48 MONTE, E. R. C. et al. Interferon- gamma activity is potentiated by an intracellular peptide derived from the human 19S ATPase regulatory subunit 4 of the proteasome. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 74-82, 2017. ISSN 1874-3919.
- 49 DAHLMANN, B. Role of proteasomes in disease. **BMC Biochem**, v. 8 Suppl 1, p. S3, Nov 2007. ISSN 1471-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047740> >.
- 50 AKTEPE, T. E. et al. The Host Protein Reticulon 3.1A Is Utilized by Flaviviruses to Facilitate Membrane Remodelling. **Cell Rep**, v. 21, n. 6, p. 1639-1654, Nov 2017. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29117567> >.
- 51 DREWS, O. et al. Mammalian proteasome subpopulations with distinct molecular compositions and proteolytic activities. **Mol Cell Proteomics**, v. 6, n. 11, p. 2021-31, Nov 2007. ISSN 1535-9476. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660509> >.
- 52 DEMO, S. D. et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. **Cancer Res**, v. 67, n. 13, p. 6383-91, Jul 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616698> >.
- 53 CUNHA, F. M. et al. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **J Biol Chem**, v. 283, n. 36, p. 24448-59, Sep 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617518> >.

- 54 GROETTRUP, M.; KIRK, C. J.; BASLER, M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 1, p. 73-8, 01 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010787> >.
- 55 KLOETZEL, P. M. Antigen processing by the proteasome. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 3, p. 179-87, Mar 2001. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11265247> >.
- 56 HEINK, S. et al. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9241-6, Jun 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944226> >.
- 57 YEWDELL, J. W.; REITS, E.; NEEFJES, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 12, p. 952-61, Dec 2003. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647477> >.
- 58 FOSS, G. S. et al. Constitutive and interferon-gamma-induced expression of the human proteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1402, n. 1, p. 17-28, Mar 1998. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551082> >.
- 59 MUCHAMUEL, T. et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. **Nat Med**, v. 15, n. 7, p. 781-7, Jul 2009. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19525961> >.
- 60 NUSSBAUM, A. K. et al. Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8+ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. **J Immunol**, v. 175, n. 2, p. 1153-60, Jul 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002717> >.
- 61 BERTI, D. A. et al. Identification of intracellular peptides in rat adipose tissue: Insights into insulin resistance. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2668-81, Aug 2012. ISSN 1615-9861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740317> >.
- 62 FERRO, E. S.; HYSLOP, S.; CAMARGO, A. C. Intracellular peptides as putative natural regulators of protein interactions. **J Neurochem**, v. 91, n. 4, p. 769-77, Nov 2004. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525330> >.
- 63 VERSIANI, A. F. et al. Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant Dengue virus 3 envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice. **J Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 26, Apr 2017. ISSN 1477-3155. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28376812> >.

- 64 ZANETI, A. B. et al. Dendritic Cell Targeting Using a DNA Vaccine Induces Specific Antibodies and CD4. **Front Immunol**, v. 10, p. 59, 2019. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30761131> >.
- 65 BAL, J. et al. Evaluation of cell-surface displayed synthetic consensus dengue EDIII cells as a potent oral vaccine candidate. **Microb Cell Fact**, v. 17, n. 1, p. 146, Sep 2018. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30217208> >.
- 66 SUBRAMANIYAN, V. et al. In silico prediction of monovalent and chimeric tetravalent vaccines for prevention and treatment of dengue fever. **J Biomed Res**, 11 2017. ISSN 1674-8301. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29497025> >.
- 67 KULKARNI, A. et al. Neutralizing Antibody Response and Efficacy of Novel Recombinant Tetravalent Dengue DNA Vaccine Comprising Envelope Domain III in Mice. **Iran J Med Sci**, v. 42, n. 2, p. 152-160, Mar 2017. ISSN 0253-0716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28360441> >.
- 68 MONTE ER, R. C., LLANOS RP, RUSSO LC, DE CASTRO LM, GOZZO FC, DE ARAUJO CB, PERON JP, SANT'ANNA OA, FERRO ES, RIOLI V. Interferon-gamma activity is potentiated by an intracellular peptide derived from the human 19S ATPase regulatory subunit 4 of the proteasome. **J. Proteomics** p. 151:74-82, 2017.
- 69 SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. Cell-penetrating peptides in vaccine delivery: facts, challenges and perspectives. **Ther Deliv**, Aug 2019. ISSN 2041-6008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31462173> >.
- 70 MATSUSHITA, K.; MORRELL, C. N.; LOWENSTEIN, C. J. A novel class of fusion polypeptides inhibits exocytosis. **Mol Pharmacol**, v. 67, n. 4, p. 1137-44, Apr 2005. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608145> >.
- 71 LOW, J. G. et al. Early Dengue infection and outcome study (EDEN) - study design and preliminary findings. **Ann Acad Med Singapore**, v. 35, n. 11, p. 783-9, Nov 2006. ISSN 0304-4602. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160194> >.
- 72 SHRESTA, S. et al. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **J Virol**, v. 78, n. 6, p. 2701-10, Mar 2004. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990690> >.
- 73 ST JOHN, A. L. et al. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 22, p. 9190-5, May 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21576486> >.

- 74 GOWEN, B. B. et al. Assessing changes in vascular permeability in a hamster model of viral hemorrhagic fever. **Virology**, v. 7, p. 240, Sep 2010. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846417> >.
- 75 SHRESTA, S. et al. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. **J Virology**, v. 80, n. 20, p. 10208-17, Oct 2006. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005698> >.
- 76 DHANOA, A. et al. Risk factors and clinical outcome of profound thrombocytopenia in adult patients with DENV infections. **Platelets**, v. 28, n. 7, p. 724-727, Nov 2017. ISSN 1369-1635. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28287000> >.
- 77 SARATHY, V. V. et al. Characterization of a murine model of non-lethal, symptomatic dengue virus infection. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 4900, 03 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29559699> >.
- 78 ALIZADEH, S. et al. Simultaneous use of natural adjuvants and cell penetrating peptides improves HCV NS3 antigen-specific immune responses. **Immunol Lett**, v. 212, p. 70-80, Aug 2019. ISSN 1879-0542. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31254535> >.
- 79 KADKHODAYAN, S. et al. Generation of GFP Native Protein for Detection of Its Intracellular Uptake by Cell-Penetrating Peptides. **Folia Biol (Praha)**, v. 62, n. 3, p. 103-9, 2016. ISSN 0015-5500. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27516189> >.
- 80 _____. The Efficiency of Tat Cell Penetrating Peptide for Intracellular Uptake of HIV-1 Nef Expressed in E. coli and Mammalian Cell. **Curr Drug Deliv**, v. 14, n. 4, p. 536-542, 2017. ISSN 1875-5704. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27719633> >.
- 81 YANG, J. et al. Cell-penetrating Peptides: Efficient Vectors for Vaccine Delivery. **Curr Drug Deliv**, v. 16, n. 5, p. 430-443, 2019. ISSN 1875-5704. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30760185> >.
- 82 VÁŇOVÁ, J. et al. The Utilization of Cell-Penetrating Peptides in the Intracellular Delivery of Viral Nanoparticles. **Materials (Basel)**, v. 12, n. 17, Aug 2019. ISSN 1996-1944. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31443361> >.
- 83 MOHRI, K. et al. Effects of the Chemical Structures of Oligoarginines Conjugated to Biocompatible Polymers as a Mucosal Adjuvant on Antibody Induction in Nasal Cavities. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 66, n. 4, p. 375-381, 2018. ISSN 1347-5223. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29607903> >.

- 84 BRADLEY, L. M.; DALTON, D. K.; CROFT, M. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. **J Immunol**, v. 157, n. 4, p. 1350-8, Aug 1996. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8759714> >.
- 85 WAKIL, A. E. et al. Interferon gamma derived from CD4(+) T cells is sufficient to mediate T helper cell type 1 development. **J Exp Med**, v. 188, n. 9, p. 1651-6, Nov 1998. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9802977> >.
- 86 DAS, G.; SHERIDAN, S.; JANEWAY, C. A. The source of early IFN-gamma that plays a role in Th1 priming. **J Immunol**, v. 167, n. 4, p. 2004-10, Aug 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489982> >.
- 87 LIGHVANI, A. A. et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15137-42, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752460> >.
- 88 SINGH, S. et al. Recombinant adenoviral vector expressing HCV NS4 induces protective immune responses in a mouse model of Vaccinia-HCV virus infection: a dose and route conundrum. **Vaccine**, v. 32, n. 23, p. 2712-21, May 2014. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631092> >.
- 89 BRAULT, A. C. et al. A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 14769, 11 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29116169> >.
- 90 TANG, J. et al. A novel self-assembled nanoparticle vaccine with HIV-1 Tat₄₉₋₅₇/HPV16 E7₄₉₋₅₇ fusion peptide and GM-CSF DNA elicits potent and prolonged CD8⁺ T cell-dependent anti-tumor immunity in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 6, p. 1071-82, Feb 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178528> >.
- 91 NANTACHIT, N.; SUNINTABOON, P.; UBOL, S. Responses of primary human nasal epithelial cells to EDIII-DENV stimulation: the first step to intranasal dengue vaccination. **Virology**, v. 13, p. 142, 08 2016. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27538960> >.
- 92 SUN, J. et al. Elaboration of tetravalent antibody responses against dengue viruses using a subunit vaccine comprised of a single consensus dengue envelope sequence. **Vaccine**, v. 35, n. 46, p. 6308-6320, 11 2017. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28987441> >.
- 93 GAO, N. et al. Japanese encephalitis virus prM-E antigen immunization conferred protection against challenge by four different serotypes of Dengue viruses in mice. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 103, n. 12, p. 4977-4986, Jun 2019. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31037380> >.

- 94 PLOTKIN, S. A.; PLOTKIN, S. L. The development of vaccines: how the past led to the future. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 12, p. 889-93, 10 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963800> >.
- 95 KARDANI, K.; BOLHASSANI, A.; SHAHBAZI, S. Prime-boost vaccine strategy against viral infections: Mechanisms and benefits. **Vaccine**, v. 34, n. 4, p. 413-423, Jan 2016. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26691569> >.
- 96 WOODLAND, D. L. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. **Trends Immunol**, v. 25, n. 2, p. 98-104, Feb 2004. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102369> >.
- 97 HU, Z. et al. Heterologous prime-boost vaccination against tuberculosis with recombinant Sendai virus and DNA vaccines. **J Mol Med (Berl)**, Nov 2019. ISSN 1432-1440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31786669> >.
- 98 SIMMONS, M. et al. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 5, p. 420-6, Nov 2001. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11716093> >.
- 99 MELLADO-SÁNCHEZ, G. et al. DNA priming E and NS1 constructs--homologous proteins boosting immunization strategy to improve immune response against dengue in mice. **Viral Immunol**, v. 18, n. 4, p. 709-21, 2005. ISSN 0882-8245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359237> >.
- 100 ZELLWEGER, R. M.; SHRESTA, S. Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. **Front Immunol**, v. 5, p. 151, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782859> >.
- 101 CHAN, K. W. et al. Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. **Antiviral Res**, v. 123, p. 5-14, Nov 2015. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26304704> >.
- 102 CALVERT, A. E. et al. Non-structural proteins of dengue 2 virus offer limited protection to interferon-deficient mice after dengue 2 virus challenge. **J Gen Virol**, v. 87, n. Pt 2, p. 339-46, Feb 2006. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432020> >.
- 103 ZELLWEGER, R. M. et al. CD8+ T cells prevent antigen-induced antibody-dependent enhancement of dengue disease in mice. **J Immunol**, v. 193, n. 8, p. 4117-24, Oct 2014. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217165> >.
- 104 ALVES DOS SANTOS, E.; FINK, K. Animal Models for Dengue and Zika Vaccine Development. **Adv Exp Med Biol**, v. 1062, p. 215-239, 2018 2018. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29845536> >.

105

YAMANAKA, A.; KONISHI, E. A simple method for evaluating dengue vaccine effectiveness in mice based on levels of viremia caused by intraperitoneal injection of infected culture cells. **Vaccine**, v. 27, n. 28, p. 3735-43, Jun 2009. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464557> >.