

# CAPÍTULO 9

## IMUNOGENICIDADE DO VÍRUS DENGUE ESTIMULADA POR VIA DE MUCOSA ORAL

Carlos Henrique Araujo Dias  
Marlos Gomes Martins

### RESUMO

A dengue é a arbovirose mais distribuída entre os seres humanos, sendo uma das doenças de notificação compulsória que causam sérios danos à saúde pública. Pode se manifestar desde formas assintomáticas até formas muito graves com altas taxas de mortalidade que diferem quanto ao sorotipo relacionado. Devido à falta de um tratamento específico e a dificuldade no controle dos vetores, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o vírus é tido como de grande importância para a OMS, sendo importante também o uso de métodos não invasivos. Por muito tempo, pouco se sabia a respeito da resposta imunológica através de um estímulo por via de mucosa, entretanto, vários estudos recentes tem mostrado que esta via pode ser a chave para a produção de vacinas contra uma grande diversidade de antígenos, levando a imunizações a níveis sistêmicos. Assim, esse trabalho teve como objetivo investigar como a resposta imune sistêmica reage na presença do vírus dengue quando estimulado através da mucosa oral. Para isto, foram imunizados cinco camundongos Swiss para cada sorotipo viral do dengue durante um período de dez dias, com desafios antigênicos realizados no vigésimo primeiro e trigésimo quinto dia. Os soros dos animais foram obtidos semanalmente até o quadragésimo nono dia e as titulações de IgG e IgA foram obtidas através da técnica de ELISA indireto. Os resultados demonstraram um leve aumento nos títulos de anticorpos IgA e IgG após o período de exposição às proteínas virais, contudo, sem uma resposta primária evidente. Contudo, após os desafios antigênicos, houve uma elevação significativa nos títulos de ambos os anticorpos, demonstrando o potencial imunogênico da via estudada. Assim, os resultados deste trabalho apontam para possibilidade de que a rota de mucosa oral avaliada seja capaz de levar a imunização do dengue a níveis sistêmicos nos espécimes estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dengue. Vacina. Via de mucosa.

### INTRODUÇÃO

A dengue está entre as doenças de notificação compulsória que causam graves problemas de saúde pública, sendo a arbovirose mais distribuída entre os seres humanos (ANANDARAO et al., 2005; TOLEDO et al., 2006). Possui como principal vetor o *Aedes aegypti* e existem cinco sorotipos (DENV 1–5) antigenicamente distintos, porém sorologicamente relacionados (BEASLEY; BARRET, 2008; MUSTAFA et al., 2015). O quadro clínico pode se apresentar desde formas assintomáticas até formas agressivas, como a síndrome do choque do dengue e a febre hemorrágica do dengue, com significativas taxas de mortalidade (GUZMAN; KOURI, 2002).

Como ainda não existe nenhuma droga específica contra a dengue e a vacinação é um método relativamente novo e não está disponível no Sistema de Saúde Público, a identificação precoce se torna fundamental para redução dos riscos (SINGHI et al., 2007). Com isso, o desenvolvimento de uma vacina que leve a imunização da população ao vírus, tem sido tratado como prioridade desde 1984 pela OMS, configurando um grande desafio para a comunidade científica. Entre as várias propostas se avalia o uso de partículas imunogênicas (WHITEHEAD et al., 2007)

Uma das dificuldades encontrada é a especificidade da resposta imunológica para cada sorotipo viral, assim, faz-se necessário que a vacina produzida seja tetravalente, com efeito de imunização uniforme para todos os sorotipos, pois, caso contrário, os riscos das formas com agravamento poderiam aumentar, tornando necessário, para o desenvolvimento de uma vacina efetiva, o conhecimento prévio sobre a imunogenicidade de cada sorotipo (ENDY et al., 2002; BRICKS, 2004; SILVA; RICHTMANN, 2006).

Por muito tempo, a administração de antígenos por membranas mucosas era tida como de baixa eficácia na indução de uma atividade imunológica sistêmica, entretanto, novos conhecimentos em conjunto com o avanço da tecnologia, vem tornando real o desenvolvimento de vacinas de mucosa para imunização a nível sistêmico, havendo vários estudos mostrando sucesso no estímulo da imunidade de mucosa a nível sistêmico (CRIPPS et al., 2001; BERNUDEZ-HUMARAN et al., 2004; MOORTHY; RAMASAMY, 2007). Liu *et al.*, (1998), administrando virus-like particles (VLPs) de papilomavírus em ratos, demonstrou como a via de mucosa pode induzir anticorpos tanto na superfície de membranas como também em células T específicas sistêmicas.

Na ativação do sistema imune pelo vírus da dengue, esta ocorre por meio das proteínas componentes do vírus, sendo as proteínas do capsídeo (C), da membrana (M), do envelope (E) e as NS1 e NS3, relacionadas com o estímulo tanto de células de ação citolítica quanto de células de memória (BRICKS, 2004). Dentre estas, a proteína E, está relacionada com todo o envoltório viral, sendo a principal proteína estrutural abrigando importantes funções biológicas, está diretamente relacionada com a imunidade, contém importantes determinantes antigênicos e define a produção de anticorpos específicos para o tipo viral, sendo os anticorpos dirigidos à mesma pertencentes à subclasse IgG2a, a qual determina imunidade de mais longa duração (FIGUEIREDO, 1999; ANTUÑANO; MOTA, 2000).

Quando comparada à rota parenteral, a rota de mucosa é considerada vantajosa por ser menos invasiva e ser uma rota natural para vários tipos de microrganismos (HOLMGREN et al., 2003), além de ser de fácil administração e apresentar um menor custo (SIM et al., 2008). Seja para diagnóstico ou meio de administração de vacinas, o uso de métodos não invasivos para dengue é considerado importante para estudos clínicos e epidemiológicos (CUZZUBBO et al, 1998). Assim, esse trabalho teve como objetivo investigar como a resposta imune sistêmica reage na presença do vírus dengue quando estimulado através da mucosa oral.

## MATERIAS E MÉTODOS

Para o presente estudo foi utilizada a proteína viral E dos quatro sorotipos do dengue. O material viral foi quantificado e diluído para  $0,1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  pelo método de Bradford (1976). Para avaliação da resposta imune de cada sorotipo viral foram utilizados 5 camundongos *Swiss* albinos fêmeas, com mais de 30 g e oito semanas de idade, originados do biotério da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Brasil. Todos os animais foram providos de água e alimento ad libitum. Todo o experimento foi conduzido sob as recomendações do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisa – CEDEP/UNIVASF, registrado com o protocolo nº 0005/181113.

A imunização dos animais foi realizada pela via oral por meio da administração de  $10\mu\text{g}/100\mu\text{L}$  de proteínas virais com o auxílio de uma micropipeta, sendo administradas 10 doses consecutivas com intervalos de 24h. Reforços foram dados no 21º e no 35º dia contando a partir do início das imunizações (BESERRA-JUNIOR et al., 2003). A colheita de sangue foi realizada nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 a contar do início das imunizações por punção do plexo retro-orbital dos camundongos. Os soros foram obtidos por meio da centrifugação do material sanguíneo por 10 minutos a 2500 RPM (NETO; FERREIRA; PAULA 2011) e armazenados em refrigerador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A determinação do teor de anticorpos específicos foi quantificada pelo método de ELISA indireto descrito em OLIVEIRA et al. (2008). Inicialmente, as microplacas foram sensibilizadas overnight com  $10\mu\text{g}/\text{poço}$  de proteínas do vírus dengue diluídos em tampão carbonato  $0,05\text{M}$  (pH 9,6). No dia seguinte, o conteúdo foi desprezado e as placas lavadas três vezes com tampão PBS tween 20. Em seguida as placas foram bloqueadas com PBS molico 5% + BSA 2,5% (PBS-leite),  $200\mu\text{L}$  por poço, e incubadas vedadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Após isto, o conteúdo foi desprezado e foram adicionados  $50\mu\text{L}$  dos soros diluídos a 1:100 em PBS-leite por poço, em duplicata. As placas então foram incubadas por mais 1 hora a temperatura

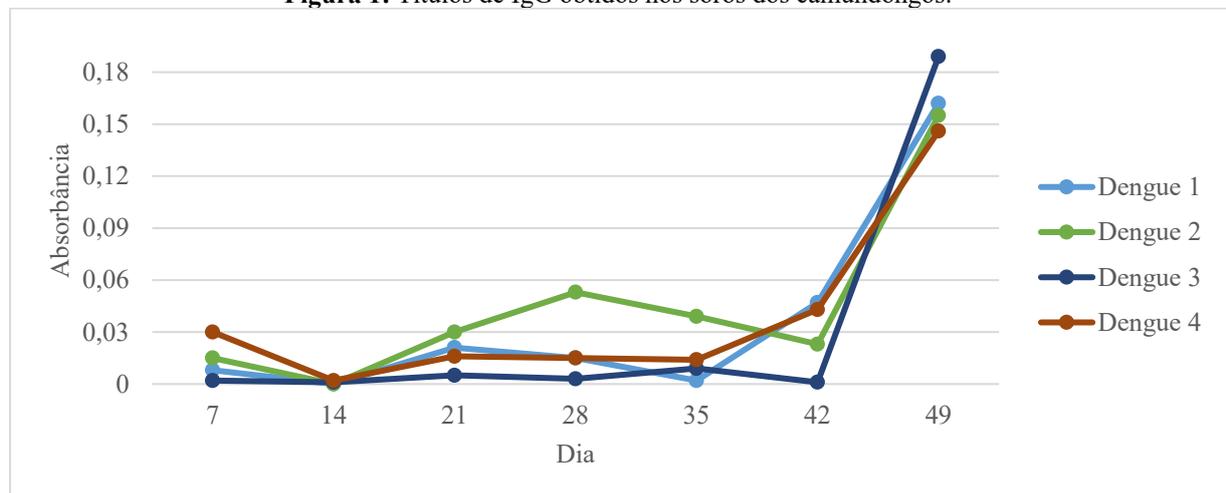
ambiente e, posteriormente, foram lavadas cinco vezes com PBS tween 20. Depois de lavadas, foram adicionados em cada poço 50µL do conjugado (imunoglobulina anti-mouse IgA/IgG + peroxidase) previamente diluído em PBS-leite (1:5000), sendo incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente. Depois de lavadas mais três vezes com PBS tween 20, 100µL da solução de revelação TMB foram adicionados em cada poço e, após 10-15 minutos ao abrigo da luz, foi realizada a leitura no leitor de ELISA com filtro 630nm.

Para todos os dados analisados foi utilizado o software Origin Microcal 8.0. Para determinação das médias foi utilizado  $\pm$  o desvio padrão para os resultados do ELISA. Os valores foram analisados pela análise da variância pelo método de ANOVA, sendo os resultados considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

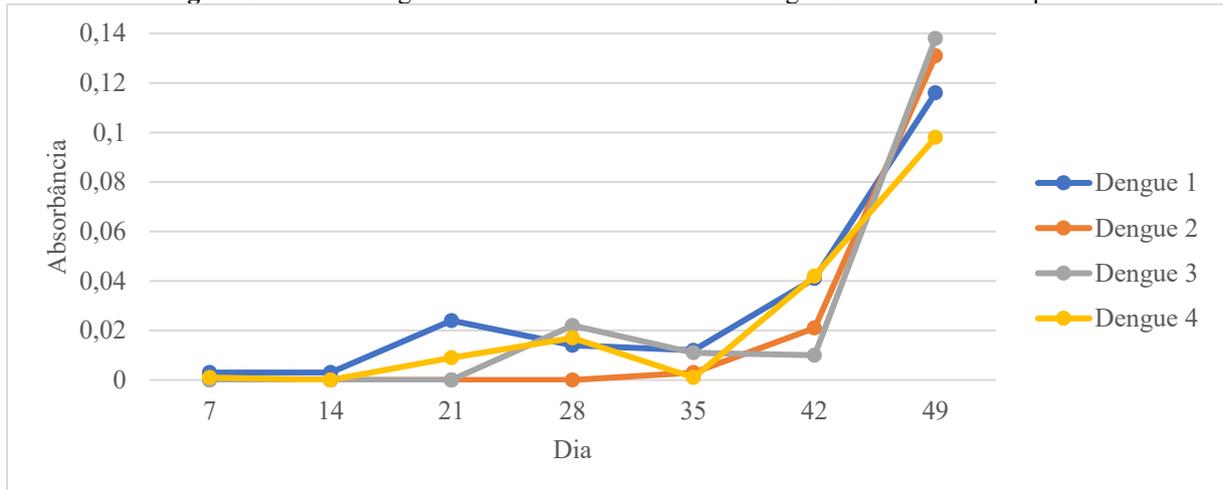
Como pode ser observado nas Figuras 1 e 2, os títulos dos anticorpos IgA e IgG contra os quatro sorotipos do dengue se comportaram de forma similar, com um leve aumento após o período de imunização e sua posterior redução entre os dias 35 e 42 após o início das imunizações, entretanto, sem uma resposta imunológica primária evidente. Após o 42º dia pode ser observado o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de todos os títulos, característicos de uma resposta imunológica secundária.

**Figura 1:** Títulos de IgG obtidos nos soros dos camundongos.



Fonte: Próprio autor, 2022.

**Figura 2.** Títulos de IgA obtidos nos soros dos camundongos no decorrer do tempo.



Fonte: Próprio autor, 2022.

Algo importante a ser ressaltado é que em diversos estudos envolvendo a imunização pela rota de mucosa, é que esta tende a demonstrar um comportamento de tolerância, no qual a produção dos anticorpos se inicia alta e tende a se tornar não reativa ao longo do tempo, sendo a rota oral a mais desafiadora quando se trata de métodos vacinais (OGRA; FADEN; WELLIVER, 2001; SMET; ALLAIS; CUVELIER, 2014). No entanto, os valores obtidos no soro correspondente ao 49º dia, corroboram com um pensamento completamente oposto, visto que, mesmo não tendo sido observado a resposta imune primária como já citado, é possível observar uma resposta imune significativa ( $p < 0,05$ ) em todos os testes.

O surgimento de uma resposta tardia é comum em trabalhos avaliando a via de mucosa. Sim *et al.* (2008), em seu trabalho induzindo a produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus da dengue sorotipo 2 através do estímulo imunológico via mucosa, detectou um aumento dos títulos de anticorpos ao 69ª dia de experimento, o que corrobora com a ideia de que o achado neste estudo corresponde a uma ativação do sistema imune contra os vírus utilizados nas imunizações.

Infelizmente as limitações da técnica não permitem maiores esclarecimentos para explicar o ocorrido. É necessário a princípio, utilizar diluições menores do soro para um melhor esclarecimento do que de fato ocorreu durante o experimento. Em outros trabalhos envolvendo a resposta imunológica de mucosa, diluições mais baixas que as utilizadas nesse trabalho foram propostas para determinação da titulação dos anticorpos. No trabalho de Jomaa *et al.* (2005), foi utilizada uma diluição inicial de 1:50 para IgG e 1:10 para IgA, diluições muito inferiores às utilizadas neste trabalho, tornando importante a realização de novos testes com a concentração dos soros mais elevadas.

O fato de ter sido detectada uma resposta imune ao 49º dia torna a via imunogênica promissora, levando-se em consideração o desenvolvimento de uma resposta imune sistêmica utilizando-se apenas a proteína E e sem uso de qualquer tipo de adjuvante. Em geral, a mucosa é pouco responsiva contra apenas proteínas sem a estrutura completa do patógeno, apesar da atividade sistêmica humoral desencadeada por estímulos imunogênicos pela via oral já ter sido descrita em outros ensaios (JUNIOR et al., 2003; MOORTHY; RAMASAMY, 2007).

Apesar da via de mucosa não ser considerada uma via clássica para o vírus dengue, este estudo demonstrou que a mucosa oral é capaz de apresentar algum efeito imunoestimulante para a proteína E do vírus. Contudo, poucos estudos podem ser encontrados na literatura com o intuito de elucidar o potencial imunoestimulante destes compartimentos para o dengue. O que torna necessário, a continuidade dos estudos, sobretudo envolvendo avaliações mais detalhadas do real potencial imunogênico do vírus dengue pelas rotas de mucosas.

## CONCLUSÃO

A administração oral da proteína E do vírus dengue foi capaz de estimular o sistema imune de camundongos Swiss, induzindo a produção de anticorpos IgA e IgG para os quatro sorotipos testados (DENV 1–4). Assim, a rota de mucosa oral se apresentou como sendo uma possível candidata a propostas vacinais para a dengue. Contudo, estes experimentos se caracterizam como iniciais no âmbito das pesquisas vacinais, sendo necessário a continuidade dos estudos a fim de que se possa compreender de forma mais consistente o potencial imunogênico do dengue através da via estudada.

## REFERÊNCIAS:

ANANDARAO, R.; SWAMINATHAN, S.; FERNANDO, S.; JANA, A. M.; KHANNA, N. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. **Protein expression and purification**, v. 41, n. 1, p. 136-147, 2005.

ANTUÑANO, F. J. L.; MOTA, J. Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 7, p. 285-292, 2000.

BEASLEY, D. W. C.; BARRET, A. D. T. The infectious Agents. In: HALSTEAD, S. B. **Dengue**. London: Imperial College Press. 2008.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; CORTES-PEREZ, N. G.; LE LOIR, Y.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M.; TAMEZ-GUERRA, R. S.; OCA-LUNA, R. M.; LANGELLA, P. An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. **Journal of medical microbiology**, v. 53, n. 5, p. 427-433, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRICKS, L. F. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatrics**, v. 26, n. 4, p. 268-281, 2004.

CRIPPS, A. W.; KYD, J. M.; FOXWELL, A. R. Vaccines and mucosal immunisation. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2513-2515, 2001.

CUZZUBBO, A. J.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; SUNTAYAKORN, S.; AASKOV, J.; DEVINE, P. L. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3737-3739, 1998.

ENDY, T. P.; NISALAK, A.; CHUNSUTTIWAT, S.; LIBRATY, D. H.; GREEN, S.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Spatial and temporal circulation of dengue virus serotypes: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American journal of epidemiology**, v. 156, n. 1, p. 52-59, 2002.

FIGUEIREDO, L. T. M. Vacinas contra o dengue. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 32, n. 1, p. 21-25, 1999.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2002.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C.; ERIKSSON, K.; MHARANDI, A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. **Vaccine**, v. 21, p. S89-S95, 2003.

JOMAA, M.; KYD, J. M.; CRIPPS, A. W. Mucosal immunisation with novel *Streptococcus pneumoniae* protein antigens enhances bacterial clearance in an acute mouse lung infection model. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 59-67, 2005.

BESERRA JÚNIOR, J. E. A.; FLORINDO, M. I.; ARAGÃO, M. E. F. D.; MARTINS, M. G.; MARTINS, V.; LIMA, M. D. G. S. Resposta imune humoral de camundongos imunizados pelas vias oral e nasal com papaya lethal yellowing virus. **Ciência Animal**, v. 13, p. 17-22, 2003.

LIU, X. S.; ABDUL-JABBAR, I.; QI, Y. M.; FRAZER, I. H.; ZHOU, J. Mucosal immunisation with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice. **Virology**, v. 252, n. 1, p. 39-45, 1998.

MOORTHY, G.; RAMASAMY, R. Mucosal immunisation of mice with malaria protein on lactic acid bacterial cell walls. **Vaccine**, v. 25, n. 18, p. 3636-3645, 2007.

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical journal armed forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

NETO, A.; FERREIRA, J. M.; PAULA, L. B. Índices de estresse oxidativo em sujeitos com diferentes níveis de composição corporal e aderência a prática de atividade física. **Brazilian journal of biotricity**, v. 5, n. 2, p. 117-131, 2011.

OGRA, P. L.; FADEN, H.; WELLIVER, R. C. Vaccination strategies for mucosal immune responses. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 2, p. 430-445, 2001.

OLIVEIRA, T. R.; LONGHI, M. T.; DE MORAIS, Z. M.; ROMERO, E. C.; BLANCO, R. M.; KIRCHGATTER, K.; NASCIMENTO, A. L. Evaluation of leptospiral recombinant antigens MPL17 and MPL21 for serological diagnosis of leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assays. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1715-1722, 2008.

SILVA, L. J.; RICHTMANN, R. Vaccines under development: group B streptococcus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. s115-s124, 2006.

SIM, A. C.; LIN, W.; TAN, G. K.; SIM, M. S.; CHOW, V. T.; ALONSO, S. Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. **Vaccine**, v. 26, n. 9, p. 1145-1154, 2008.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de pediatria**, v. 83, p. S22-S35, 2007.

SMET, R.; ALLAIS, L.; CUVELIER, C. Recent advances in oral vaccine development: Yeast-derived  $\beta$ -glucan particles. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 5, p. 1309-1318, 2014.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S99-S102, 2001.

TOLEDO, A. L. A. D.; ESCOSTEGUY, C. C.; MEDRONHO, R. D. A.; ANDRADE, F. C. D. Confiabilidade do diagnóstico final de dengue na epidemia 2001-2002 no Município do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 933-940, 2006.

WHITEHEAD, S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518-528, 2007.