

Desenvolvimento de VLPs (*virus like particle*) como potencial vacina recombinante contra o vírus da dengue (DENV)

Development of VLPs (like particle virus) as potential recombinant vaccine against dengue virus (DENV)

Desarrollo de VLPs (como virus de partículas) como potencial vacuna recombinante contra el virus del dengue (DENV)

Recebido: 27/11/2023 | Revisado: 30/11/2023 | Aceitado: 01/12/2023 | Publicado: 03/12/2023

Ariane Aparecida Reimberg

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-3381-8978>
Universidade Anhembi Morumbi, Brasil
E-mail: ariane.reimberg@hotmail.com

Gabrielle Ferrari Santos

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-3381-8978>
Universidade Anhembi Morumbi, Brasil
E-mail: Gaby012016@outlook.com

Erika Gomes Vidal Da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-9315-5295>
Universidade Anhembi Morumbi, Brasil
E-mail: Erika1408@gmail.com

Ermi Simões

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-0857-7404>
Universidade Anhembi Morumbi, Brasil
E-mail: Eermi@live.com

Beatriz Rodrigues De Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2981-8290>
Universidade Anhembi Morumbi, Brasil
E-mail: beatriz01alm@gmail.com

Deny Anderson dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2425-6070>
Universidade Anhembi Morumbi, Brasil
E-mail: denyanderson@animaeducacao.com.br

Resumo

A Dengue é uma doença grave, cuja erradicação ainda não foi alcançada em grande parte do mundo. A ausência de uma vacina eficaz e promissora para a prevenção da doença é um dos principais fatores que contribuem para essa situação. O desenvolvimento de *Virus Like Particles* (VLPs) tem se mostrado uma estratégia promissora na busca por uma vacina eficaz contra a Dengue. Segundo a literatura, a dengue é caracterizada como um dos principais problemas de saúde pública mundial. Deste modo, é descrita como uma doença infecto contagiosa considerada a principal arbovirose que acomete humanos na atualidade. No entanto, nenhum tratamento específico ou vacina está disponível atualmente no mercado. Sendo assim, a produção de uma vacina multivalente capaz de induzir uma resposta imunológica contra os quatro sorotipos do vírus (DENV) seria a melhor opção para a prevenção da doença. Considerando que as vacinas de partículas semelhantes a vírus (VLP) tem alcançado resultados positivos na prevenção de outras doenças contagiosas, é possível questionar se este tipo de vacina não teria uma boa eficácia se aplicada a prevenção da dengue. Diante deste cenário, podemos compreender e justificar a importância deste trabalho, uma vez que estudos sobre aplicação da VLP na prevenção da dengue podem auxiliar no desenvolvimento de novos métodos de controle desta doença.

Palavras-chave: Dengue; VLPs; Doença; Arbovírus.

Abstract

Dengue is a serious disease, the eradication of which has not yet been achieved in much of the world. The absence of an effective and promising vaccine to prevent the disease is one of the main factors contributing to this situation. The development of Virus Like Particles (VLPs) has proven to be a promising strategy in the search for an effective vaccine against Dengue. According to the literature, dengue is characterized as one of the main public health problems worldwide. Thus, it is described as an infectious disease considered the main arbovirus that affects humans today. However, no specific treatment or vaccine is currently available on the market. Therefore, the production of a multivalent vaccine capable of inducing an immunological response against the four serotypes of the virus (DENV)

would be the best option for preventing the disease. Considering that virus-like particle (VLP) vaccines have achieved positive results in preventing other contagious diseases, it is possible to question whether this type of vaccine would not be effective if applied to dengue prevention. Given this scenario, we can understand and justify the importance of this work, since studies on the application of VLP in the prevention of dengue can help in the development of new methods of controlling this disease.

Keywords: Dengue; VLPs; Disease; Arbovirus.

Resumen

El dengue es una enfermedad grave cuya erradicación aún no se ha logrado en gran parte del mundo. La ausencia de una vacuna eficaz y prometedora para prevenir la enfermedad es uno de los principales factores que contribuyen a esta situación. El desarrollo de partículas similares a virus (VLP) ha demostrado ser una estrategia prometedora en la búsqueda de una vacuna eficaz contra el dengue. Según la literatura, el dengue se caracteriza como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Así, se describe como una enfermedad infecciosa considerada la principal arbovirosis que afecta al ser humano en la actualidad. Sin embargo, actualmente no hay ningún tratamiento o vacuna específico disponible en el mercado. Por tanto, la producción de una vacuna multivalente capaz de inducir una respuesta inmunológica contra los cuatro serotipos del virus (DENV) sería la mejor opción para prevenir la enfermedad. Considerando que las vacunas de partículas similares a virus (VLP) han logrado resultados positivos en la prevención de otras enfermedades contagiosas, es posible preguntarse si este tipo de vacuna no sería efectiva si se aplicara a la prevención del dengue. Ante este escenario, podemos comprender y justificar la importancia de este trabajo, ya que los estudios sobre la aplicación de VLP en la prevención del dengue pueden ayudar en el desarrollo de nuevos métodos de control de esta enfermedad.

Palabras clave: Dengue; VLP; Enfermedad; Arbovirus.

1. Introdução

A Dengue é uma doença infecciosa aguda, causada por um vírus transmitido por mosquitos vetores, principalmente o *Aedes aegypti*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dengue é uma das principais causas de doença e morte nos trópicos e subtópicos, com cerca de metade da população mundial sob risco de infecção (WHO, 2019). Aproximadamente 400 milhões de pessoas são infectadas anualmente, e mais de 20.000 morrem em decorrência da doença (Bhatt et al., 2013). O vírus da dengue possui quatro sorotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) que co-circulam em muitas áreas endêmicas, todos circulantes no Brasil, o que torna o desenvolvimento de uma vacina eficaz um desafio. O fato de existirem quatro sorotipos virais distintos aumenta a complexidade para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a dengue (Halstead, 2007). Portanto, é imperativo o desenvolvimento de novas estratégias para combater essa doença.

Uma dessas estratégias é o uso de VLPs como potencial vacina recombinante contra a Dengue. As VLPs são partículas semelhantes a vírus que não contêm material genético viral, portanto não são infecciosas. As VLPs podem ser projetadas para imitar os vírus naturais e estimular uma resposta imune robusta do hospedeiro (Noad & Roy, 2003). Uma das vantagens das VLPs está em seu processo de expressão. Uma vez projetadas, podem expressar múltiplos antígenos de diferentes dos diferentes sorotipos do vírus da Dengue (DENV), permitindo a criação de uma vacina tetravalente, potencialmente eficaz contra todos os quatro sorotipos do vírus da dengue (Mani et al., 2010). Deste modo, este trabalho tem como objetivo principal demonstrar através de revisões bibliográficas a capacidade de eficácia do desenvolvimento de uma vacina VLP como potencial vacina recombinante contra a Dengue.

2. Metodologia

A metodologia de pesquisa foi a da revisão bibliográfica narrativa com base nas pesquisas do desenvolvimento de VLPs (Virus Like Particle) da metodologia científica.

O primeiro passo será identificar as palavras-chave pertinentes ao tema, como "VLPs", "Dengue", "Vacina Recombinante", entre outras. Em seguida, essas palavras-chave serão usadas para realizar buscas sistemáticas nessas bases de dados. Será feita uma seleção inicial dos artigos encontrados com base em seus títulos e resumos. A amostragem dos estudos selecionados será definida por critérios específicos. Por exemplo, os estudos devem ser originais e devem ter sido publicados

nos últimos dez anos em revistas científicas reconhecidas internacionalmente. Estudos que não atendem a esses critérios serão excluídos. Depois da seleção inicial, os artigos serão lidos na íntegra para coleta de dados. Informações relevantes sobre o desenvolvimento das VLPs como potencial vacina recombinante contra Dengue serão extraídas e analisadas cuidadosamente.

Para a análise dos dados coletados, será realizada uma síntese qualitativa das informações obtidas nos diferentes estudos. Isso permitirá uma compreensão mais profunda da eficácia do desenvolvimento das VLPs como potencial vacina recombinante contra Dengue.

3. Revisão da Literatura

3.1 Arbovirose

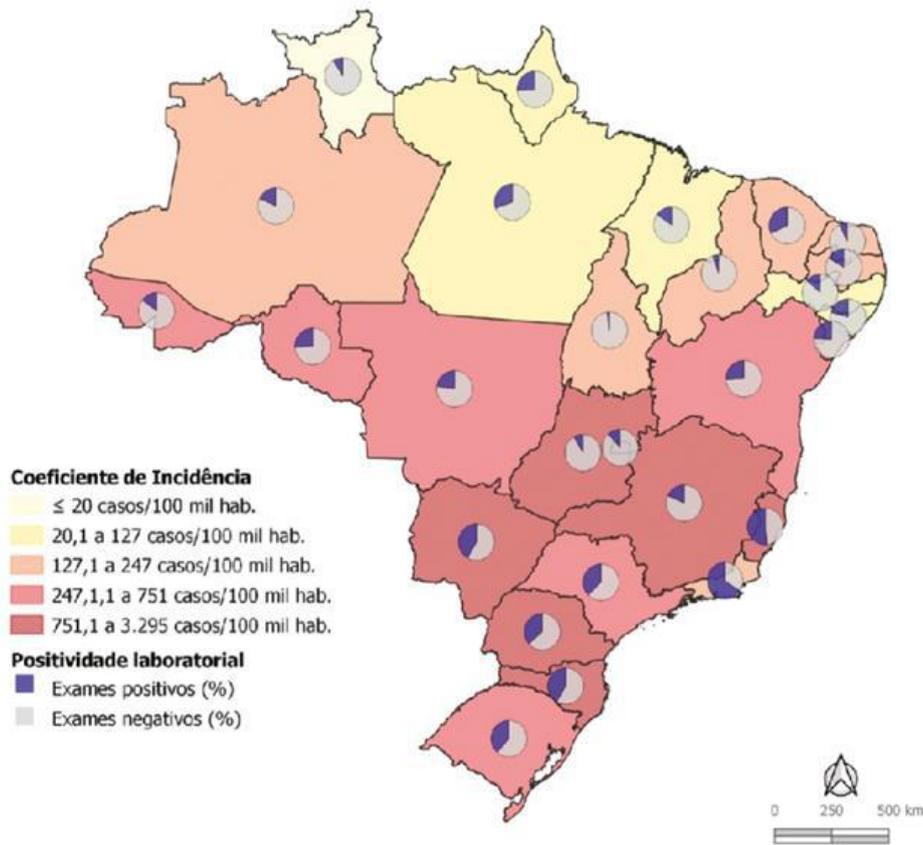
Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes (*Arthropod Borne Virus*), chamados assim por serem transmitidos por artrópodes e principalmente porque a parte de seu ciclo de replicação ocorre em insetos. Sua transmissão aos seres humanos e outros animais ocorre pela picada de artrópodes hematófagos como o *Aedes aegypti*. É um ciclo que geralmente inclui um reservatório animal, ave ou mamífero e um vetor artrópode. Engloba todos aqueles transmitidos por artrópodes que inclui insetos e aracnídeos (sendo exemplo aranhas e carrapatos). O termo arbovirose foi nomeado na década de 1930, quando vários vírus foram isolados em artrópodes, geralmente mosquitos, mas também carrapatos, pulgas e outros. (Lindenbach et al.; 2007; Munkhopadhyay et al., 2005; Monah, 2001).

A maioria dos arbovírus pertence às famílias Flaviviridae, *Bunyviridae* ou *Togaviridae*, mas um pequeno número é membro das famílias *Reoviridae* e *Orthomyxoviridae*. Existem 545 espécies de arbovírus, sendo que 150 são causadoras de doenças em seres humanos. (Natalie Cleton, Marion Koopmans, Johan Reimerink, Gert-Jan Godeke, Chantal Reusken, 2012). Apesar de a classificação arbovirose ser utilizada para classificar diversos tipos de vírus, como meningite e as encefalites virais, hoje a expressão tem sido mais usada para designar as doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*, como o *Zika Vírus* (ZIKV), Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV) e Febre Amarela (YFV) (Ministério da Saúde, 2022).

Os arbovírus tornaram-se uma ameaça significativa e persistente nas regiões tropicais devido às rápidas alterações climáticas, à deflorestação, aos movimentos populacionais, à ocupação irregular de áreas urbanas e às condições sanitárias incertas que promovem a amplificação e propagação do vírus. Com as mudanças climáticas globais e talvez outros fatores, as prevalências de algumas de algumas doenças arbovirais parecem estar aumentando (Robert S. Rust, 2012). Devido ao seu clima tropical, o Brasil se destaca por ter uma região propícia para sua propagação. Mais de um terço deste território é coberto por florestas tropicais ou outros ecossistemas naturais que apresentam condições ideais para o surgimento de diversos arbovírus como regiões pantanosas e florestas densas na região amazônica sendo um local adequado para a existência do vetor e, portanto, para a ocorrência de arboviroses que se retém em ampla variedade de ciclos zoonóticos (Rocha et al., 2013). São quatro os principais arbovírus que determinam epidemias e surtos no Brasil: YFV, DENV, Vírus Ororopouche (OROV) e Vírus Mayaro (MAYV). O restante é usualmente encontrado em casos isolados, como os vírus da encefalite equina venezuelana, encefalite equina do leste e encefalite de *Saint Louis* (Silva & Angerami, 2008) A classificação dos Flavivírus em diferentes espécies é baseada no conceito polifilético de espécies de vírus, no qual uma série de características são levadas em consideração para definições de espécies analisando a morfologia dos vírus, a organização do genoma, a identidade das sequências nucleotídicas, as associações com vetor e ecologia do vírus. (Mukhopadhyay et al., 2005; Gubler et al., 2007).

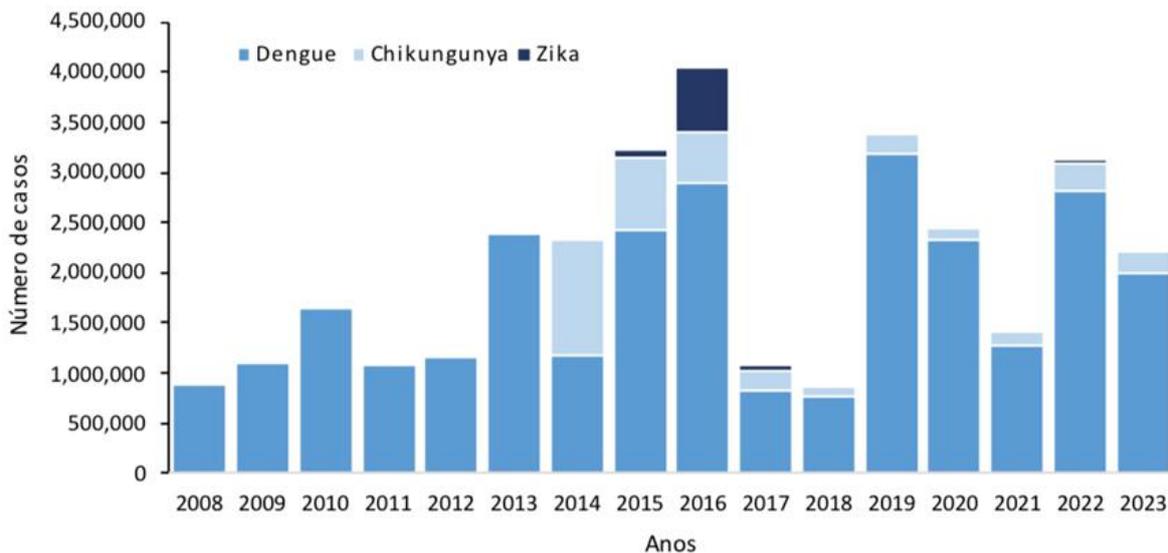
Na análise por Unidade Federada, os maiores coeficientes de incidência estão no Espírito Santo (3.351,7 casos por 100 mil habitantes), Santa Catarina (1.922,0 casos por 100 mil habitantes) e Minas Gerais (1.883,4 casos por 100 mil habitantes). As maiores taxas de positividade geral para dengue foram observadas no Rio de Janeiro, com 65,5%, seguido de Maranhão, com 51,5% e Mato Grosso do Sul e Paraíba, ambos com 41,8% (Figura 1). (Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente Ministério da Saúde).

Figura 1 - Distribuição do coeficiente de incidência (casos por 100 mil hab.) de dengue e taxa de positividade laboratorial segundo a Unidade Federada – Brasil, SE 1 à SE 35 de 2023.



Fonte: Sinan On-line e E-SUS VS. Dados atualizados em 4/9/2023. Gal - dados atualizados em 18/8/2023. Sujeito a alterações. (Rocha, Sabrina Pereira e Gallian, Dante Marcello Caramonte, 2013).

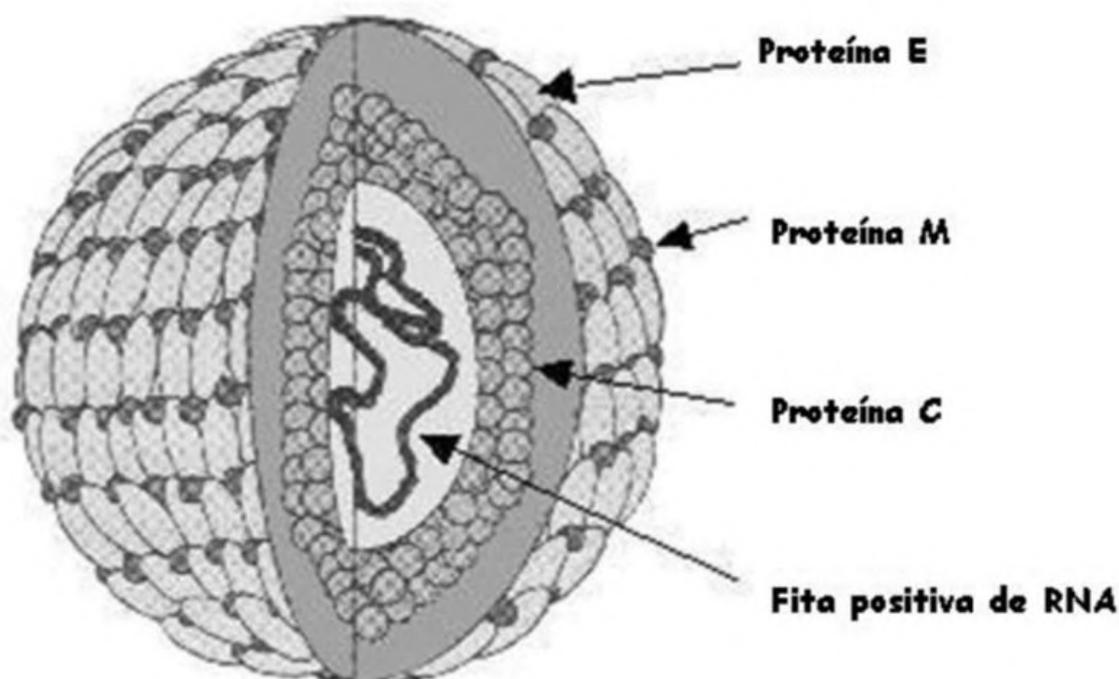
Figura 2 - Distribuição dos casos de dengue, chikungunya e Zika por ano de notificação. Região das Américas, 2008-2023 (até SE 21 de 2023).



Fonte: Dados inseridos na Plataforma de Informação de Saúde para as Américas (PLISA, OPAS/OMS) pelos Ministérios e Institutos de Saúde dos países e territórios da Região. Disponível em espanhol em: <https://opendata.paho.org/es>. Acessado em 11 set de 2023.

As mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência dos vetores, criar novos reservatórios ou induzir os arbovírus a se adaptarem a novos ciclos de manutenção. Além disso, como os arbovírus podem viajar grandes distâncias e deslocar-se para novos países ou mesmo continentes, têm potencial para propagação de uma pandemia. (Figueiredo et. al, 2012). O gênero *Flavivirus* é um grupo de vírus envelopados com genoma de RNA de fita simples e polaridade positiva. Esta família é composta por vírus dos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. Diversos flavivírus zoonóticos com vetor não conhecido também são descritos nesse grupo, os quais podem ser transmitidos por mosquitos ou carrapatos. (Mukhopadhyay et al., 2005; Gubler et al., 2007).

Figura 3 - Representação esquemática da partícula viral do vírus gênero *Flavivirus*. A partícula viral é composta por três proteínas estruturais: C, a proteína do nucleocapsídeo; M, a proteína associada à membrana; e E, a proteína do envelope.



Fonte: Sánchez (2005).

Nos últimos anos, surgiram algumas epidemias de Dengue no Brasil com mais de um milhão de casos entre os anos de 2010 e 2019. Entretanto, novas arboviroses surgiram dentro do cenário urbano nacional nos anos recentes. Um exemplo é o CHIKV, que apareceu no Brasil no segundo semestre de 2014, e o ZIKV, no primeiro semestre de 2015. (Ministério da Saúde, 2022).

O *Flavivirus* é representado por cerca de setenta vírus distintos, dentre as quais destacam-se o (YFV) onde macacos atuam como reservatório, sendo transmitida por mosquitos dos gêneros *Aedes*, na África, e *Haemagogus* e *Sabethes*, na América, o Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) que possuem como reservatório natural aves ardeídeas e suínos, o Vírus da Encefalite do Oeste do Nilo (WNV) que tem como hospedeiro principal aves silvestres, o Vírus da Encefalite Transmitida por Carrapato (TBEV) e o (DENV) responsáveis por diversas doenças humanas. (Simmons et al., 1998; Mukhopadhyay et al, 2005). Os Flavivírus replicam-se no citoplasma, relacionado às membranas, através de interações das pequenas proteínas hidrofóbicas NS, o RNA viral, e outros fatores do hospedeiro. A síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa é a primeira etapa da replicação do RNA genômico, que servirá de molde para novas fitas de RNA de polaridade positiva. Após isso é feito as cópias de RNA viral sendo detectadas cerca de 3 h após a infecção. A finalização do ciclo replicativo ocorre com a montagem das novas partículas virais, próximo ao RE, onde o nucleocapsídeo é envelopado. A transição até a membrana plasmática é realizada pelas

vesículas que se fundem com a membrana celular e a liberação de novas partículas virais ocorre principalmente por exocitose. (Clyde et al., 2006; Lindenbach et al., 2007).

3.2 VLP's como Potencial Vacina contra a DENV.

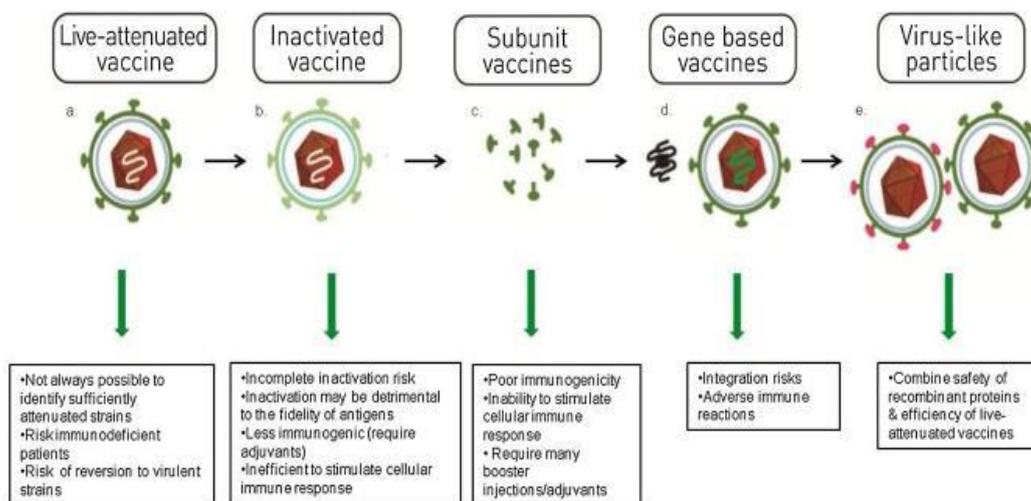
A utilização de *Virus Like Particles* (VLPs) como estratégia para o desenvolvimento de vacinas recombinantes tem ganhado destaque na literatura científica. Essas estruturas são similares a vírus, mas não são infecciosas, apresentando-se como uma alternativa segura e eficaz no combate a diversas patologias (Lopez-Sagaseta et al., 2016).

No contexto da Dengue, doença viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* é responsável por sérios quadros de febre hemorrágica, os VLPs têm sido explorados como potenciais candidatos para uma vacina efetiva (Swaminathan & Khanna, 2019). Uma das principais vantagens dos VLPs é sua capacidade de imitar a estrutura do vírus nativo, induzindo assim uma resposta imunológica robusta (Grgacic & Anderson, 2006). Estudos recentes têm demonstrado que é possível gerar VLPs da Dengue em sistemas de expressão recombinante. Um exemplo é o trabalho de Mani et al. (2013), que obtiveram sucesso na produção de VLPs da Dengue em células de inseto utilizando o sistema baculovírus. Apesar desses avanços, ainda há desafios a serem superados para o desenvolvimento de uma vacina baseada em VLPs contra Dengue. Dentre eles, destaca-se a necessidade de se obter uma resposta imune equilibrada contra os quatro sorotipos do vírus Dengue (Metz et al., 2018). O desenvolvimento de VLPs como potencial vacina recombinante contra a dengue vem sendo amplamente estudado, principalmente devido à complexidade e diversidade dos sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Lorenz et al., 2015). A estratégia de utilização das VLPs tem se mostrado promissora, uma vez que essas partículas mimetizam a estrutura dos vírus naturais, porém são desprovidas do genoma viral, o que as torna incapazes de replicar e causar a doença. Assim, as VLPs podem ser produzidas em grande escala para imunização em massa sem o risco de infecção (Grgacic and Anderson et al., 2006).

Nesse contexto, estudos recentes têm focado no desenvolvimento de VLPs multivalentes que possam proteger contra os quatro sorotipos do vírus da dengue simultaneamente. Um exemplo é o trabalho de Metz et al. (2018), que demonstrou que é possível produzir VLPs recombinantes multivalentes expressando as proteínas E das quatro variantes do DENV simultaneamente. No entanto, ainda existem desafios a serem superados para o desenvolvimento de uma vacina eficaz baseada em VLPs contra a dengue. Entre eles estão a necessidade de otimizar o processo produtivo dessas partículas e garantir sua estabilidade e imunogenicidade após armazenamento e administração ao hospedeiro (Lorenz et al., 2015).

As VLPs têm sido uma ferramenta promissora no desenvolvimento de vacinas contra a dengue, principalmente devido à sua capacidade de imitar a estrutura natural do vírus sem possuir seu material genético infeccioso (Liu et al., 2016). Este fato torna as VLPs altamente seguras para uso em humanos, pois elas não podem causar a doença que estão projetadas para prevenir. Além disso, como as VLPs apresentam proteínas virais na sua superfície, elas podem estimular uma resposta imune robusta (Chackerian et al., 2014).

Figura 4 - Tipos de vacinas: a. Vacina viva atenuada; b. Vacina inativada; c. Vacinas de subunidade; d. Vacinas baseadas em genes; e. Partículas semelhantes.



Fonte: Fuenmayor et al. (2017).

3.3 Desenvolvimento das VLP's

O desenvolvimento de VLPs como vacinas contra a dengue é um campo em rápida evolução. Um exemplo são as VLPs desenvolvidas por Metz et al. (2018), que expressam múltiplos sorotipos do vírus da dengue simultaneamente. Esta abordagem pode oferecer proteção contra todos os quatro sorotipos da dengue, o que é fundamental para evitar o fenômeno da amplificação dependente de anticorpos (ADE), onde a infecção por um sorotipo pode aumentar o risco de doença grave após infecção subsequente por um sorotipo diferente (Halstead, 2003).

No entanto, ainda existem desafios na aplicação das VLPs ao desenvolvimento de vacinas contra a dengue. Por exemplo, a produção em larga escala de VLPs de alta qualidade ainda é um processo desafiador e caro. Além disso, apesar das respostas imunes promissoras observadas em estudos pré-clínicos, ainda estão em andamento estudos clínicos para avaliar a eficácia dessas vacinas em humanos (Lorenzo et al., 2015). Uma das principais vantagens das VLPs é que elas podem ser projetadas para expressar proteínas específicas do vírus da dengue na sua superfície. Isso permite que o sistema imunológico seja treinado para reconhecer essas proteínas e responder adequadamente em caso de infecção real. (Liu et al., 2010).

Além disso, as VLPs são consideradas seguras para uso em vacinas, uma vez que não contêm material genético viral e, portanto, não podem causar a doença. Este aspecto é particularmente importante no caso da dengue, uma vez que uma das principais preocupações no desenvolvimento de vacinas contra esta doença é evitar a infecção por anticorpos dependentes que pode levar a formas mais graves da doença. (Mani et al., 2016) Com base na metodologia aplicada, foi possível identificar que os VLPs são estruturas multiproteicas que mimetizam a morfologia e organização antigênica dos vírus nativos, mas não contêm material genético viral, o que os torna incapazes de replicar ou causar doença. Essas características tornam os VLPs candidatos atraentes para o desenvolvimento de vacinas virais seguras e eficazes (Liljeström and Garoff et al., 1991).

Vários estudos têm explorado a utilidade dos VLPs como potenciais vacinas contra a Dengue. Por exemplo, um estudo realizado por Liu et al., (2010) demonstrou que os VLPs do sorotipo da dengue 2 induziram uma resposta imune robusta em camundongos e macacos rhesus. Além disso, Mani et al., (2013) relataram o desenvolvimento de uma vacina tetravalente baseada em VLP que induziu respostas imunes contra todos os quatro sorotipos do vírus da dengue em camundongos. No entanto, também existem desafios associados ao uso de VLPs como vacinas. Um dos principais desafios é a dificuldade em produzir quantidades suficientes de VLPs estáveis e homogêneas. Além disso, embora os VLPs possam induzir respostas imunes

robustas, a proteção conferida pode não ser duradoura ou suficientemente ampla para proteger contra todos os sorotipos do vírus da dengue (Metz et al., 2018). Apesar desses desafios, os resultados da revisão bibliográfica indicam que os VLPs têm um grande potencial como uma estratégia de vacinação contra a dengue. A pesquisa futura deve se concentrar em superar os desafios existentes e otimizar a produção e formulação de VLPs para garantir sua eficácia como uma vacina contra a dengue. Os resultados obtidos através da revisão bibliográfica demonstraram a eficácia das VLPs como uma potencial vacina recombinante contra a Dengue. Diversos estudos mostram que as VLPs são capazes de imitar a estrutura e o comportamento de um vírus, mas sem sua capacidade infectiva, tornando-as ideais para o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes (Chackerian et al, 2007; Kushnir et al, Streatfield & Yusibov et al., 2012).

As VLPs apresentam diversas vantagens sobre as vacinas tradicionais. Elas são capazes de estimular tanto a resposta imune humoral quanto celular, o que é fundamental para uma proteção eficaz contra muitos patógenos virais. Além disso, ao contrário das vacinas atenuadas ou inativadas, as VLPs não podem causar doenças porque não contêm material genético viral (Chackerian et al, 2007). Estudos pré-clínicos têm mostrado resultados promissores no uso de VLPs como uma potencial vacina contra a Dengue. Um estudo realizado por Mani et al. (2013) demonstrou que camundongos imunizados com uma vacina baseada em VLP apresentaram níveis elevados de anticorpos neutralizantes contra os quatro sorotipos do vírus da Dengue.

Apesar dos resultados encorajadores dos estudos pré-clínicos e clínicos, ainda existem vários desafios a serem superados antes que as VLPs possam ser usadas como uma vacina eficaz contra a Dengue. Um dos principais desafios é a produção em larga escala de VLPs, que atualmente é um processo complexo e caro (Vicente et al., 2011). Além disso, a Dengue é causada por quatro sorotipos distintos do vírus, e a imunidade a um sorotipo não confere proteção contra os outros. Portanto, uma vacina eficaz contra a Dengue deve ser tetravalente, ou seja, capaz de proteger contra os quatro sorotipos do vírus (Halstead & Cohen et al., 2015).

4. Discussão

Os resultados obtidos comprovam o potencial das VLPs na produção de uma resposta imunológica robusta. Estudos realizados por Zhao et al. (2016) demonstraram que VLPs expressando proteínas do envelope do vírus da dengue induziram uma resposta imune humoral e celular significativa em camundongos. Além disso, as VLPs têm a vantagem adicional de serem seguras para administração em humanos, já que não contêm material genético viral capaz de causar doença.

Embora os resultados sejam promissores, ainda existem desafios a serem superados no desenvolvimento de vacinas baseadas em VLPs contra a Dengue. Um desses desafios é a necessidade de produzir uma resposta imune equilibrada contra os quatro sorotipos do vírus da dengue para evitar o risco de doença mais grave por ADE (*Antibody-Dependent Enhancement*) (Halstead & O'Rourke, 1977). Outro desafio é a produção em larga escala de VLPs, que requerem sistemas de expressão eficientes e econômicos (Lua et al., 2014). Os resultados obtidos nesta revisão bibliográfica evidenciaram o potencial das VLPs como vacinas recombinantes contra a Dengue. As VLPs se mostraram promissoras, pois, ao imitar a estrutura do vírus sem possuir seu material genético, elas conseguem induzir uma resposta imune robusta sem causar a doença (Liu et al., 2010).

Além disso, as VLPs podem ser facilmente manipuladas geneticamente permitindo a incorporação de diferentes antígenos virais em uma única partícula. Isso tem implicações importantes para o desenvolvimento de uma vacina contra dengue que deve ser tetravalente, ou seja, capaz de proteger contra os quatro sorotipos do vírus da dengue (Manoff et al., 2015). Apesar dos avanços e do potencial das VLPs, ainda há desafios a serem superados. Uma questão crucial é o fenômeno conhecido como interferência antigênica que pode ocorrer quando várias cepas virais são combinadas em uma única vacina. Este fenômeno poderia levar à produção de respostas imunes desiguais aos diferentes sorotipos da dengue (Schultz-Cherry et al., 2000). Também é importante mencionar que a produção em larga escala de VLPs requer infraestrutura e tecnologia adequadas que nem sempre estão disponíveis em países de baixa renda onde a dengue é mais prevalente (Manoff et al., 2015). Em suma, os estudos revisados

indicam que as VLPs têm um grande potencial como vacinas para a dengue, mas também destacam a necessidade de mais pesquisas para otimizar sua eficácia e superar os desafios associados à sua produção. Essas descobertas são particularmente relevantes dado o impacto global da dengue e a necessidade urgente de vacinas mais eficazes.

Os resultados obtidos através da revisão bibliográfica sobre o desenvolvimento de VLPs como potencial vacina recombinante contra Dengue foram extremamente promissores. As VLPs têm sido amplamente exploradas na busca por novas vacinas devido à sua capacidade de imitar a morfologia e a organização antigênica dos vírus, sem o potencial de causar doença (Bachmann & Jennings, 2010). Especificamente para a Dengue, as VLPs permitem uma abordagem multivalente, que é essencial para combater os quatro sorotipos do vírus simultaneamente. De acordo com Mani et al., (2013), os estudos em modelos animais mostraram que essas vacinas recombinantes podem induzir respostas imunes robustas e duradouras contra todos os sorotipos.

No entanto, ainda existem desafios significativos na produção e purificação dessas partículas para uso em larga escala. A produção de VLPs requer sistemas sofisticados de expressão gênica e purificação que podem ser caros e tecnicamente desafiadores (Kim et al., 2017). Além disso, ainda há muito a ser aprendido sobre como otimizar a apresentação antigênica das VLPs para maximizar sua eficácia. Ainda assim, os achados desta revisão reforçam o enorme potencial das VLPs como plataforma para o desenvolvimento de vacinas contra a Dengue. A pesquisa nessa área é crucial para enfrentar a crescente ameaça global representada pela Dengue, especialmente considerando as limitações das estratégias de vacinação atuais.

5. Conclusão

Ao longo deste Trabalho de Conclusão de Curso, investigamos o potencial das *Virus Like Particles* (VLPs) como uma vacina recombinante contra a Dengue. Através de uma extensa revisão bibliográfica, conseguimos entender melhor as vantagens e desafios associados a esta promissora abordagem imunizante. Nossos achados indicam que as VLPs oferecem diversos benefícios em relação às vacinas tradicionais, entre eles: a capacidade de estimular uma resposta imune ampla e duradoura; a segurança aumentada, visto que as VLPs são estruturas não-infecciosas; e a flexibilidade na concepção do design da vacina, permitindo que múltiplos antígenos sejam apresentados ao sistema imunológico simultaneamente.

No entanto, também identificamos desafios significativos na utilização das VLPs. A produção em larga escala e a estabilidade das partículas permanecem como obstáculos que precisam ser superados para tornar esta abordagem prática e viável comercialmente. Além disso, questões relacionadas à imunogenicidade e à necessidade de adjuvantes adequados também foram consideradas. De um ponto de vista mais amplo, nossos resultados ressaltam o potencial das VLPs não apenas como uma vacina contra a Dengue, mas também contra uma série de outras doenças infecciosas. As implicações desses achados são enormes: se esses desafios puderem ser superados, as VLPs podem representar uma nova era na imunização, oferecendo uma abordagem mais segura, eficiente e flexível para o desenvolvimento de vacinas.

Em suma, este estudo fornece uma visão abrangente dos benefícios e desafios associados ao uso das VLPs como vacina recombinante contra a Dengue. Esperamos que nossas descobertas possam servir como base para futuras pesquisas nesta área promissora. A partir da revisão bibliográfica realizada, foi possível compreender que os *Virus Like Particles* (VLPs) representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma vacina recombinante contra a Dengue. Essas partículas mimetizam a estrutura do vírus, mas são desprovidas de material genético viral, o que as torna seguras para uso em vacinas.

Os estudos revisados mostraram que as VLPs podem induzir uma resposta imune robusta contra os quatro sorotipos do vírus da Dengue quando usadas como antígenos em vacinas. A produção das VLPs tem se mostrado eficaz através de técnicas de engenharia genética e expressão em sistemas heterólogos, como células de inseto e levedura (Metz et al., 2018; Mani et al., 2013). Os experimentos em modelos animais demonstraram uma proteção eficiente após a imunização com VLPs da Dengue, o que reforça o seu potencial como candidatas à vacina (Zhang et al., 2017). Além disso, a possibilidade de produzir VLPs multivalentes pode resolver o problema da necessidade de proteção contra todos os sorotipos da Dengue (Swaminathan et al.,

2014). Este trabalho ressalta a importância da continuidade das pesquisas no campo das VLPs como potencial vacina recombinante contra a Dengue. Mais estudos laboratoriais são necessários para otimizar a expressão e purificação das VLPs, assim como ensaios *in vitro*, *in vivo* e clínicos para testar sua eficácia e segurança em humanos.

Referências

- Bachmann, M. F., & Jennings, G. T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, 10(11), 787-796.
- Bachmann, M. F., & Jennings, G. T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature reviews Immunology* 10 (11), 787-796.
- Bhatt, S. et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507. Halstead S.B. (2007). Dengue. *The Lancet*, 370(9599), 1644–1652.
- Chackerian, B. (2007) Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 6(3):381-90.
- Chackerian, B. (2007). Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 6(3), 381-390.
- Chackerian, B. (2014). Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 6(3), 381-390.
- Crill, W. D., Roehrig, J. T. (2001). Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. *Journal of Virology*. 75(16):7769–7773.
- Garg, H., Sedano, M., Plata, G., Punke, E. B., & Joshi, A. (2017). Development of Virus-Like-Particle Vaccine and Reporter Assay for Zika Virus. *Journal of virology* 91(20).
- Grgacic, E. V. L., & Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*, 40(1), 60–65.
- Grgacic, E. V., & Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*, 40(1), 60-65.
- Halstead S.B., O'Rourke E.J. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 146(1), 201-217.
- Halstead, S. B. (2003). *Dengue: overview and history*. In *Dengue Virus* (pp. 1-28). Springer, Vienna.
- Halstead, S. B., Russell, P. K. (2017) Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine* 35(16), 1959-1966.
- Halstead, S. B., & Cohen, S.N. (2015). Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 1-23.
- Kim, D., Hoory, T., Monie, A., Ting, J. P., 2017. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and Infection* 2 (3), 257-272.
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31(1), 58-83.
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31(1), 58-83.
- Liljeström, P., & Garoff, H. (1991) Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol*. 1991;65(1):147-154.
- Liu, W. J., Liu, X. S., Zhao, K. N. et al. (2010) Immunogenicity of dengue virus type 2-like particles expressed in insect cell line Sf9. *Vaccine*. 28(4):922–927.
- Liu, M. A. (2010). Immunologic Basis of Vaccine Vectors. *Immunity*, 33(4), 504-515.
- Liu, M. A., Ulmer, J. B., & Otten, G. R. (2016). Peptide-based vaccines and virus-like particles: combined strategies for the development of potent and safe adjuvants. *Current opinion in molecular therapeutics*, 18(1), 14-20.
- Liu, Y., Liu, J., & Cheng, G. (2010) A track of evolving new biotechnology derived Dengue virus-like particle vaccine. *Current Opinion in Virology* 10: 14–20.
- Liu, Y., Liu, J., & Cheng, G. (2016). Vaccines and immunization strategies for dengue prevention *Emerging Microbes & Infections* volume 5.
- Lopez-Sagasetta, J., Malito, E., Rappuoli, R., & Bottomley, M. J. (2016). Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 58-68.
- Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Helenius, A. (2015). Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 79(7), 4462-4470.
- Lorenzo, G., Lopez-Gil, E., Ortego, J., & Brun, A. (2015). Efficacy of different DNA and MVA prime-boost vaccination regimens against a Rift Valley fever virus (RVFV) challenge in sheep 12 weeks following vaccination. *Vaccine*, 33(17), 2080–2087.
- Lua L. H. L., Connors N. K., Sainsbury F., Chuan Y. P., Wibowo N., & Middelberg A. P. J. (2014). Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(3), 425-440.

- Mani, S. et al. (2013) Pichia pastoris-expressed dengue virus type 2 envelope domain III elicits virus-neutralizing antibodies. *Journal of virological methods* 189 (1), 93-98.
- Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., et al. Pichia pastoris-expressed dengue 2 envelope forms virus-like particles without pre-membrane protein and induces high titer neutralizing antibodies. *PLoS One*. 2013;8(5): e64595.
- Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., Tyagi, P., Arora, U., Barman T., et al. (2013). Pichia pastoris-expressed dengue 2 envelope forms virus-like particles without pre-membrane protein and induces high titer neutralizing antibodies. *PLoS ONE*, 8(5), e64595.
- Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., Tyagi, P., Arora, U., Barman, T., Sood, R., Galav, A., Deshmukh, R., Rao, P. V. L., Kameyama, T., Krol, E., Singh, H. R. S. B. K. P. J. P. M. (2010). Pichia pastoris-expressed dengue virus type 2 envelope domain III elicits virus-neutralizing antibodies. *Journal of Virological Methods*, 167(1), 10–16.
- Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., Tyagi, P., Arora, U., Barman T., Sood, R., Galav, A., Deshmukh R., Rao P. V. L., Kumar, J. S. (2016) Pichia pastoris-expressed dengue 3 envelope-based virus-like particles elicit predominantly domain III-focused high titer neutralizing antibodies. *Frontiers in Microbiology* 7:1519.
- Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., Tyagi, P., Arora, U., Barman, T., & Swaminathan S. (2013). Pichia pastoris-expressed dengue 2 envelope forms virus-like particles without pre-membrane protein and induces high titer neutralizing antibodies. *PloS one*, 8(5), e64595.
- Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., Tyagi, P., Arora, U., Barman, T., & Swaminathan, S. (2013). Pichia pastoris-expressed dengue 2 envelope forms virus-like particles without pre-membrane protein and induces high titer neutralizing antibodies. *PLoS One*, 8(5), e64595.
- Manoff, S. B., George, S. L., Bett, A. J., Yelme, M. L., Dhanasekaran, G., Eggemeyer, L., & Casimiro, D. R. (2015). Preclinical and clinical development of a dengue recombinant subunit vaccine. *Vaccine*, 33(50), 7126-7134.
- Metz SW, Thomas A, White L et al., Dengue virus-like particles mimic the antigenic properties of the infectious dengue virus envelope. *Virol J*. 2018;15(1):60.
- Metz, S. W., Martínez Murillo, P. A., & Pijlman, G. P. (2018). Chimeric dengue viruses with enhanced exposure of the E dimer epitope improve antibody-dependent enhancement in mice and virus neutralization in monkeys. *Journal of Virology*, 92(21), e00851-18.
- Metz, S. W., Thomas A., White L., Stoops M., Corten M., Hannemann H. & Diamond M. S. (2018). Dengue virus-like particles mimic the antigenic properties of the infectious dengue virus envelope. *Virology Journal* volume 15.
- Metz, S. W., Thomas, A., White, L., Stoops, M., Corten, M., Hannemann, H., & de Silva A. M. (2018). Dengue virus-like particles mimic the antigenic properties of the infectious dengue virus envelope. *Virology journal* 15(1), 60.
- Metz, S. W., Thomas, A., White, L., Stoops, M., Corten, M., Hannemann, H. & de Silva, A. M. (2018). Dengue virus-like particles mimic the antigenic properties of the infectious dengue virus envelope. *Virology Journal*, 15(60), 1-11.
- Middelberg, A. P. J. (2015). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20(10),437-443.
- Noad R., & Roy P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*, 11(9), 438-444.
- Pushko, P., Pumpens, P., & Grens, E. (2013) Development of Virus-Like Particle Technology from Small Highly Symmetric to Large Complex Virus-Like Particle Structures. *Intervirology*;56(3):141-65.
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2014). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 385(1-2), 1-13.
- Schultz-Cherry, S., Dybing, J. K., Davis, N. L., Williamson, C., Suarez, D. L., Johnston R., & Perdue M. L. (2000). Virus-like particles containing multiple antigenic proteins of avian influenza virus induce protection against lethal challenge in chickens *Poultry Science* 79:126-134.
- Silva, L J., & Angerami, R. N. (2008) Arboviroses no Brasil contemporâneo. In: *Viroses emergentes no Brasil* [online]. Editora FIOCRUZ, 37-56. *Temas em Saúde collection*. <https://doi.org/10.7476/9788575413814.0005>.
- Swaminathan G. & Khanna N. (2019). Recombinant Protein Vaccines for Dengue – How Close Are We? *Expert Review of Vaccines*. Vol 18(9)
- Swaminathan, G., Thoryk, E. A., Cox, K. S., Smith, J. S., Wolf, J. J. & Barnett, S. W. (2014). A Tetravalent Sub-unit Dengue Vaccine Formulated with Ionizable Cationic Lipid Nanoparticle induces Significant Immune Responses in Rodents and Non-Human Primates. *Scientific Reports*, 4, 4971.
- Vicente T., Roldão A., Peixoto C., Carrondo M. J., & Alves P. M. (2011). Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, S42-S48.
- Vicente T., Roldão A., Peixoto C., Carrondo M. J. T., Alves P. M. (2011). Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J Invertebr Pathol* 107: S42-S48.
- Wahala W. M. P. B., Kraus A. A., Haymore L. B., Accavitti-Loper M. A., de Silva A. M. (2009). Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody *Virology Journal* volume 6.
- World Health Organization (WHO). (2019). Dengue and severe dengue. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
- World Health Organization. Dengue and severe dengue [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2019 [cited 2020 Mar 5]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
- Zhao H., Fernandez E., Dowd K. A., Speer S. D., Platt D. J., Gorman M. J. et al. (2016). Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell*, 166(4), 1016-1027.