

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Microbiologia**

Igor Pereira Godinho

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE CANDIDATOS VACINAIS CONTRA O VÍRUS ZIKA,  
UTILIZANDO A PROTEÍNA DO ENVELOPE VIRAL, RECOMBINANTE,  
FUNCIONALIZADA OU NÃO EM NANOBASTÕES DE OURO**

Belo Horizonte

2024

Igor Pereira Godinho

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE CANDIDATOS VACINAIS CONTRA O VÍRUS ZIKA,  
UTILIZANDO A PROTEÍNA DO ENVELOPE VIRAL, RECOMBINANTE,  
FUNCIONALIZADA OU NÃO EM NANOBASTÕES DE OURO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Flávio Guimarães da Fonseca  
Coorientadora: Thaís de Fátima Silva Moraes

Belo Horizonte

2024

043

Godinho, Igor Pereira.

Estudo pré-clínico de candidatos vacinais contra o vírus Zika, utilizando a proteína do envelope viral, recombinante, funcionalizada ou não em nanobastões de ouro [manuscrito] / Igor Pereira Godinho. – 2024.

122 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca. Coorientadora: Dra. Thaís de Fátima Silva Moraes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Zika virus. 3. Vacinas de Subunidades Antigênicas. 4. Nanomedicina. 5. Nanopartículas Metálicas. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Moraes, Thaís de Fátima Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **IGOR PEREIRA GODINHO**

Nº REGISTRO: 2022660727

Às 14:00 horas do dia **26 de abril de 2024**, reuniu-se, remotamente via Plataforma Teams, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Luiz Felipe Leomil Coelho (Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)), Estefânia Mara do Nascimento Martins (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN/CNEN), Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador) e Dra. Thaís de Fátima Silva Moraes (Coorientadora), para julgar o trabalho final "**Estudo pré-clínico de candidatos vacinais contra o vírus Zika, utilizando a proteína do envelope viral, recombinante, funcionalizada ou não em nanobastões de ouro**", do aluno **Igor Pereira Godinho**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - Orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 26 de abril de 2024

Membros da banca:

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Dra. Estefânia Mara do Nascimento Martins

De acordo:

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

(Orientador)

Dra. Thaís de Fátima Silva Moraes

(Coorientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos  
(Coordenador do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 29/04/2024, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais de Fatima Silva Moraes, Usuária Externa**, em 29/04/2024, às 13:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Usuário Externo**, em 29/04/2024, às 14:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Estefânia Mara do Nascimento Martins, Usuário Externo**, em 30/04/2024, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Guimaraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2026, às 09:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3174074** e o código CRC **BB5E7B47**.

Ao meu pai José Fernandes (*in memoriam*) e ao meu amigo Renato Fróes (*in memoriam*) que mesmo ausentes nesta data, permanecem presente na saudade, nas boas memórias, ensinamentos e conversas que me permitiram descontraír e persistir em momentos conturbados. À Monalisa (*in memoriam*), melhor amiga do homem.

## AGRADECIMENTOS

Dentre toda a escrita do trabalho, evidentemente os agradecimentos trazem consigo um sentimento de nostalgia e de lembranças por todo o processo e experiência adquirida. Agradeço primeiramente àquele que inicia, que dá o movimento, ao Orixá Èṣú, que se não propusesse a mostrar cada encruza encontrada até o momento, eu não seria uma única parcela de quem sou, neste encerramento de ciclo.

Falando em parcelas e em proporções matemática, não consigo deixar de agradecer a oportunidade de ser filho de uma mulher tão forte e que me inspira cada dia mais que passa, ainda na distância de mais de 450 quilômetros. Agradeço à minha irmã, que me ensinou a ser autêntico e me ajuda a acreditar em minhas capacidades quando eu mesmo duvido. Aos meus avós Conceição, Patrocínio e Maria, que mesmo com tantas limitações e adversidades em suas trajetórias persistiram e graças a isso eu entendo o que é a determinação de se manter focado ter esperança de que o final tudo se ajeita – mesmo que seja num abraço apertado, no fim do dia. Agradeço até mesmo meu avô Odílio (*in memoriam*) que ainda que eu não tenha conhecido, faz parte de minha ancestralidade, motivando minha caminhada. Pelos caracteres limitados, agradeço a toda a minha família, minhas tias, primas, primos e até animais de estimação, que me permitem almejar caminhos tão distantes sozinho sendo a certeza que estarão comigo até o fim. Agradeço às amizades cultivadas em Caldas, Alfenas, Belo Horizonte e em todos os lugares que ramificaram para longe, sejam outras cidades, capitais, estados ou países. A vida adulta realmente distancia pessoas que antes asseguravam entre promessas que nunca perderiam contato. Porém com essa distância podemos aprender que a presença física não define importância, mas invoca a saudade das memórias boas – que faz com que a amizade persista de forma tão firme. Garanto visitar a todos, matar essa saudade e criar novas. Amo vocês.

Agradeço aos meus orientadores, seja em Alfenas com o professor Luiz Felipe ou em Belo Horizonte com o professor Flávio Fonseca e a doutora Thaís Moraes. Obrigado por toda confiança e experiências compartilhadas. Seus conselhos me incentivaram a mudar para outra cidade, recomeçar, trabalhar de apoio técnico, fazer a pós-graduação... Enfim, toda a trajetória.

Agradeço ao senhor do meu orí e meu pai Ṣàngó, que me dá forças a começar cada novo dia e encontrar o que me é justo entre tantas vivências. O fogo e o trovão trazem minha fé e minha realidade. E com o encerramento, agradeço a ti, pai Òriṣànlá, pela presença em cada passo dado. Gratidão ao ciclo que se encerra!

-Káwó Kábiṣilè!

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.” – (JOÃO GUIMARÃES ROSA. Grande Sertão: Veredas, 1956)

## RESUMO

Entre os vários arbovírus conhecidos de considerável disseminação global, o vírus Zika (ZIKV) originou-se no continente africano, se espalhando em outros continentes ao longo dos anos com as crescentes viagens internacionais. Causando sintomas leves, predominantemente em países tropicais, a doença continua surgindo de modo silencioso com consequências preocupantes. Sua ligação com a Síndrome de Guillain-Barré e a Síndrome Congênita do Zika denotam a gravidade de uma doença negligenciada e sem cobertura vacinal disponível. Com os avanços científicos em desenvolvimento de tecnologia de vacinas em decorrência da recente pandemia do SARS-CoV-2, novas plataformas vacinais vêm sendo criadas e as antigas, melhoradas. Entre tecnologias aprimoradas, as vacinas de subunidades recombinantes acrescidas do uso de nanocarreadores para entrega de antígenos e entre os materiais em destaque, as nanopartículas de ouro, vem sendo estudadas. Com propriedades físico-químicas que permitem a ligação às moléculas orgânicas como proteínas, a escolha se mostra promissora. No trabalho anterior, o grupo de pesquisa observou o potencial de aplicação das nanopartículas nas ciências biomédicas com resultados positivos, demonstrando a capacidade de expressão heteróloga de uma proteína recombinante (produzida em *Escherichia coli*, BL21) do envelope viral do ZIKV (ZIKV-E), funcionalizada em nanobastões de ouro (GNR) comerciais para aumentar sua imunogenicidade e biodisponibilidade. O trabalho ainda verificou que o adjuvante formado por lipídio monofosforil A (MPLA) combinado com 7DW8-5 (um potente análogo de  $\alpha$ -GalCer) possui uma melhor indução de resposta entre as demais formulações testadas. O presente trabalho possuiu como objetivo principal avaliar a resposta imune desenvolvida pelas vacinas experimentais em modelo C57BL/6, além do estudo pré-clínico das vacinas experimentais descritas frente a um desafio com o ZIKV em camundongos C57BL/6 fêmeas prenhes previamente imunizadas, a fim de observar possíveis alterações no neurodesenvolvimento pré-natal de fetos, verificando a transmissão vertical como relatado pela literatura. Após a imunização dos camundongos, foram detectados altos níveis de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV. Além disso, as vacinas experimentais se mostraram capazes de induzir a ativação de células do sistema imune em camundongos C57BL/6, a ativação de células de memória, e uma tendência ao aumento de IFN- $\gamma$  secretado por linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Estes resultados foram observados principalmente no grupo imunizado com a vacina experimental completa. A viabilidade fetal demonstrou ser afetada em um cenário de infecção sem o candidato vacinal, possuindo uma maior quantidade de reabsorções fetais em comparação ao número de fetos que existiria na prole em um cenário sem o desafio. Adicionalmente, os animais imunizados e posteriormente desafiados apresentaram proteção estatisticamente significativa contra a doença em comparação com os animais que receberam a solução salina (PBS) ou somente o GNR puro, sugerindo que a vacina experimental apresenta potencial protetivo.

**Palavras-chave:** Vírus Zika, vacinas de subunidades, nanobiomedicina. nanobastões de ouro.

## ABSTRACT

Among the several known arboviruses with considerable global spread, the Zika virus (ZIKV) originated on the African continent, spreading to other continents over the years with increasing international travel. Causing mild symptoms, predominantly in tropical countries, the disease continues to emerge silently with worrying consequences. Its connection with Guillain-Barré Syndrome and Congenital Zika Syndrome denotes the seriousness of a neglected disease with no available vaccination coverage. With scientific advances in the development of vaccine technology as a result of the recent SARS-CoV-2 pandemic, new vaccine platforms have been created and old ones have been improved. Among improved technologies, recombinant subunit vaccines plus the use of nanocarriers for antigen delivery and among the highlighted materials, gold nanoparticles, have been studied. With physical-chemical properties that allow it to bind to organic molecules such as proteins, the choice appears promising. In previous work, the research group observed the potential application of nanoparticles in biomedical sciences with positive results, demonstrating the capacity for heterologous expression of a recombinant protein (produced in *Escherichia coli*, BL21) of the ZIKV viral envelope (ZIKV-E), functionalized in commercial gold nanorods (GNR) to increase its immunogenicity and bioavailability. The work also found that the adjuvant formed by monophosphoryl lipid A (MPLA) combined with 7DW8-5 (a potent analogue of  $\alpha$ -GalCer) has a better response induction among the other formulations tested. The main objective of the present work was to evaluate the immune response developed by experimental vaccines in the C57BL/6 model, in addition to the pre-clinical study of the experimental vaccines described in the face of a challenge with ZIKV with previously immunized pregnant female C57BL/6 mice, in order to observe possible changes in the prenatal neurodevelopment of fetuses, verifying vertical transmission as reported in the literature. After immunization of the mice, high levels of anti-ZIKV neutralizing antibodies were detected. Furthermore, experimental vaccines were able to induce the activation of immune system cells in C57BL/6 mice, the activation of memory cells, and a tendency to increase IFN- $\gamma$  secreted by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes. These results were observed mainly in the group immunized with the complete experimental vaccine. Fetal viability has been shown to be affected in an infection scenario without the vaccine candidate, with a greater number of reabsorptions compared to the number of fetuses that would exist in the offspring in a scenario without the challenge. Still in this data, the immunized and subsequently challenged animals had a significant statistical value compared to the animal that received the saline solution (PBS) or just pure GNR, data similar to the animals in the unchallenged group, suggesting that the experimental vaccines were satisfactorily protective.

**Keywords:** Zika virus, subunit vaccines, nanobiomedicine. gold nanorods

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> A partícula e o genoma do vírus Zika .....	19
<b>Figura 2.</b> Distribuição filogenética observada em diferentes regiões geográficas .....	21
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das possíveis rotas de transmissão estabelecidas entre indivíduos infectados e o ambiente .....	22
<b>Figura 4.</b> Distribuição anual dos casos suspeitos de síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika notificados no Brasil entre 2015 e 2023 .....	25
<b>Figura 5.</b> Distribuição dos nascidos vivos (1) e óbitos (2) confirmados para síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika por região de residência da parturiente no Brasil e por ano de nascimento entre 2015 e 2023 .....	26
<b>Figura 6.</b> Distribuição de casos prováveis de SCZ por semana epidemiológica de inícios de sintomas em Minas Gerais .....	27
<b>Figura 7.</b> Organização do genoma dos flavivírus com a indicação do processamento da poliproteína precursora .....	29
<b>Figura 8.</b> Ciclo de replicação dos flavivírus .....	32
<b>Figura 9.</b> Papel do hexâmero sNS1 no ambiente extracelular e de NS5 no escape imunológico .....	35
<b>Figura 10.</b> Representação ilustrada da ocorrência de microcefalia em recém-nascidos .....	38
<b>Figura 11.</b> A geração de uma resposta imune após imunização com um antígeno proteico convencional .....	40
<b>Figura 12.</b> Esboços representando as três características principais de nanomateriais metálicos .....	45
<b>Figura 13.</b> Trato reprodutivo de camundongo <i>ex vivo</i> .....	48
<b>Figura 14.</b> Rotas de inoculação utilizadas em modelos de camundongos com SCZ .....	49
<b>Figura 15.</b> Esquema do processo de diálise de proteína recombinante .....	57
<b>Figura 16.</b> (A) Estrutura química do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e (B) ácido $\alpha$ -lipoico (LA) .....	59
<b>Figura 17.</b> Esquema do processo de funcionalização das Nanopartículas à proteína ZIKV-E .....	60
<b>Figura 18.</b> Esquema de vacinação em camundongos C57BL/6 .....	64

<b>Figura 19.</b> Estratégia de <i>gate</i> do painel de ativação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> com expressão de I-A[b] de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E .....	<b>68</b>
<b>Figura 20.</b> Estratégia de <i>gate</i> para avaliação da capacidade dos linfócitos T produzirem de IFN- $\gamma$ após estimulação com ZIKV-E .....	<b>69</b>
<b>Figura 21.</b> Estrategia de <i>gate</i> para avaliçãõ do fenótipo de memória de células T de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E .....	<b>69</b>
<b>Figura 22.</b> Estratégia de avaliação da capacidade de secreção de TNF e IFN- $\gamma$ por células T de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E .....	<b>70</b>
<b>Figura 23.</b> Esquematzização de desafio com ZIKV em camundongos fêmeas prenhes de linhagem C57BL/6 .....	<b>74</b>
<b>Figura 24.</b> SDS-Page de ZIKV-E após o processo de diálise .....	<b>75</b>
<b>Figura 25.</b> Western-blot mostrando a reação entre a proteína ZIKV-E e os anticorpos comerciais Anti-His e 4G2 .....	<b>77</b>
<b>Figura 26.</b> Espectro de absorbância na região de UV-Vis das amostras de GNR em diferentes etapas da funcionalização com ZIKV-E .....	<b>78</b>
<b>Figura 27.</b> Medida do raio hidrodinâmico .....	<b>80</b>
<b>Figura 28.</b> Medida do Potencial Zeta .....	<b>81</b>
<b>Figura 29.</b> Imagens geradas para o GNR por TEM .....	<b>82</b>
<b>Figura 30.</b> Imagens geradas para o GNR-LA por TEM .....	<b>83</b>
<b>Figura 31.</b> Imagens geradas para o GNR-LA + ZIKV-E por TEM .....	<b>83</b>
<b>Figura 32.</b> Ativação de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> I-A[b] <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> I-A[b] <sup>+</sup> de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E .....	<b>85</b>
<b>Figura 33.</b> Dosagem de IFN- $\gamma$ secretados por linfócitos T CD8 <sup>+</sup> e em população de linfócitos TCD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> , marcados com CD107a <sup>+</sup> de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E .....	<b>86</b>
<b>Figura 34.</b> Fenótipo de memória representativos de células T CD8 <sup>+</sup> de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E .....	<b>88</b>
<b>Figura 35.</b> Dosagem de IFN- $\gamma$ secretados por linfócitos T CD8 <sup>+</sup> marcados com CD44 e CD62L de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E .....	<b>89</b>
<b>Figura 36.</b> Dosagem de TNF secretados por linfócitos T CD8 <sup>+</sup> marcados com CD44 e CD62L de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E .....	<b>90</b>

<b>Figura 37.</b> Resultados do ELISA anti-IgG ZIKV-E com soros dos animais imunizados .....	<b>91</b>
<b>Figura 38.</b> Resultados do Teste de Redução de Placas por Neutralização (PRNT) com soros dos animais imunizados .....	<b>93</b>
<b>Figura 39.</b> Análise do ganho de peso médio dos animais entre D0 a D15 .....	<b>96</b>
<b>Figura 40.</b> Pesagens de baço de camundongos C57BL/6 tratados com GNR, ZIKV-E, PBS e a vacina completa GNR+ZIKV-E desafiados ou não com ZIKV .....	<b>96</b>
<b>Figura 41.</b> Porcentagem da prole viável em animais desafiados com ZIKV após imunização com o candidato vacinal .....	<b>98</b>
<b>Figura 42.</b> Pesagens de placentas e fetos de camundongos C57BL/6 tratados com GNR, ZIKV-E, PBS e a vacina completa GNR+ZIKV-E desafiados ou não com ZIKV .....	<b>100</b>
<b>Figura 43.</b> 2.12 (PBS/ZIKV) – Foto lateral esquerda e direita do crânio de fetos de fêmea desafiada com ZIKV .....	<b>102</b>
<b>Figura 44.</b> 4.6 (GNR/ZIKV) – Alterações morfológicas entre os fetos de uma mesma fêmea desafiada com o vírus .....	<b>103</b>
<b>Figura 45.</b> 4.8 (GNR/ZIKV) – Alterações morfológicas entre os fetos de uma mesma fêmea desafiada com o vírus .....	<b>103</b>
<b>Figura 46.</b> 2.13 (PBS/ZIKV) – Foto lateral de feto e placenta e foto aproximada de crânio de fetos de fêmea desafiada com ZIKV .....	<b>104</b>
<b>Figura 47.</b> Panorama geral comparativo entre grupos de diferentes morfologias de útero extraídos de fêmeas infectadas com o vírus Zika .....	<b>105</b>
<b>Figura 48.</b> Compilado de fotos comparativas de placentas e fetos, cada imagem representando uma fêmea de cada grupo .....	<b>106</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Grupos experimentais utilizados para avaliação da Imunogenicidade .....	<b>64</b>
<b>Tabela 2.</b> Grupos experimentais utilizados para avaliação do potencial de proteção das vacinas experimentais .....	<b>73</b>
<b>Tabela 3.</b> Valores da concentração de proteína quantificados em kit RandoxUP .....	<b>76</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 7DW8-5 – Glicolípido análogo de  $\alpha$ -GalCer (alfa-galactosilceramida)
- ADE – Aumento dependente de anticorpos
- APS – Persulfato de amônio
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- C – Proteína do capsídeo viral do ZIKV
- CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention*)
- CDTN – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
- CEUA – Comitê de Ética em Uso Animal
- CMC – Carboximetilcelulose
- CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio
- DENV – vírus Dengue
- DMEM – Mínimo Essencial de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- dsRNA – RNA de dupla-fita
- E – Proteína do envelope viral do ZIKV
- EDC – N-etil-N'-((3-dimetil aminopropil) carbodiimida)
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- EUA – Estados Unidos da América
- GNP – Nanopartículas de ouro
- GNR – Nanobastão de ouro
- ICB – Instituto de Ciências Biológicas
- ICS – Citocinas intracitoplasmáticas
- ICTV – Comitê Internacional de taxonomia de vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)
- IFN – Interferon
- ISGs – genes estimulados por interferon
- JAK/STAT – Via de ativação por Janus quinase (JAK) de proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT).
- LA – Ácido  $\alpha$ -lipoico

M/prM – Proteína de membrana/ precursora de membrana  
MIA – inflamação sistêmica materna  
MOI – multiplicidade de infecção  
MPLA – lipídio monofosforil A  
mRNA – RNA mensageiro  
NHS – N-hidroxisuccinimida  
NP – nanopartícula  
NS\_\_ – Proteínas não-estruturais (enumeradas individualmente, como NS1, NS2A, NS2B, etc.)  
ORF – Região de “quadro aberto” (*Open Reading Frame*)  
PCS - Espectroscopia de Correlação de Fótons  
PFU – Unidades formadoras de placa  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PNH – Primatas não-humanos  
PRNT – Teste de redução de placas por neutralização (*Plaque Reduction Neutralization Test*)  
RdRp – RNA polimerase RNA dependente  
RE – Retículo Endoplasmático  
RNA – Ácido Ribonucleico  
rpm – rotações por minuto  
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*  
SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)  
SCZ – Síndrome Congênita do Zika  
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio  
SFB – Soro fetal bovino  
SGB – Síndrome de Guillain-Barré  
SNC – Sistema nervoso central  
ssRNA+ – RNA de fita simples de polaridade positiva  
STAT (1/2) - Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição  
TEM – Microscopia Eletrônica de transmissão  
TEMED – Tetrametiletilenodiamina  
TNF – Fator de necrose tumoral  
Tris-HCl – Tris(hidroximetil)-aminometano

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UTRs – Regiões não codificadoras

UV/Vis – Ultravioleta visível

UV-VIS-NIR – Espectroscopia por absorbância ultravioleta-visível-infravermelho próximo

WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

ZIKV – Vírus Zika

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 O vírus Zika</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.1 Taxonomia</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1.2 Origem e epidemiologia</b> .....	<b>20</b>
<b>1.1.3 Organização do genoma viral</b> .....	<b>28</b>
<b>1.1.4 Ciclo viral</b> .....	<b>30</b>
<b>1.1.5 Resposta imune</b> .....	<b>32</b>
<b>1.1.5.1 Estratégias de evasão imunológica</b> .....	<b>33</b>
<b>1.1.5.2 Resposta imunológica frente a outros orthoflavivírus</b> .....	<b>35</b>
<b>1.1.5.3 Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e Síndrome Congênita do Zika (SCZ)</b> .....	<b>36</b>
<b>1.1.5.4 Resposta imunológica estimulada por vacinação</b> .....	<b>37</b>
<b>1.2 Desenvolvimento de vacinas para o ZIKV</b> .....	<b>39</b>
<b>1.2.1 Vacina de subunidades recombinantes</b> .....	<b>40</b>
<b>1.2.2 Desafios no desenvolvimento de vacinas para o ZIKV</b> .....	<b>41</b>
<b>1.2.3 Estratégias não clássicas de vacinação e Nanotecnologia</b> .....	<b>42</b>
<b>1.2.4 Nanopartículas de ouro: propriedades e interações</b> .....	<b>44</b>
<b>1.3 O modelo animal</b> .....	<b>47</b>
<b>1.3.1 Modelo animal para estudos vacinais</b> .....	<b>47</b>
<b>1.3.2 Estudos de má-formação fetal em modelo murino</b> .....	<b>47</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>50</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
<b>3.1 Objetivos gerais</b> .....	<b>52</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>52</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>53</b>

4.1 Células C6/36 ( <i>Aedes albopictus</i> ) e Vero CCL-81 ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ) .....	53
4.2 Origem dos vírus e produção de estoque trabalho .....	54
4.3 Titulação do estoque viral.....	55
4.4 Obtenção da proteína recombinante do Envelope do Vírus Zika (ZIKV-E).....	55
4.4.1 Diálise e quantificação da proteína ZIKV-E.....	56
4.5 Nanobastões de Ouro .....	58
4.5.1 Funcionalização dos Nanobastões de Ouro (GNR) .....	58
4.5.2 Verificação da eficiência da funcionalização.....	61
4.5.3 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E .....	62
4.6 Avaliação da imunogenicidade da vacina experimental GNR-ZIKV-E.....	63
4.6.1 Estratégia de imunização .....	63
4.6.2 Avaliação da Resposta Imune Celular.....	64
4.6.3 Estratégias de Avaliação da Resposta Imune Celular por Citometria de Fluxo ....	67
4.6.4 Avaliação da Resposta Imune Humoral por Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto (ELISA) .....	70
4.6.5 Avaliação da Resposta Imune Humoral por Teste de redução de placas por neutralização (PRNT) .....	71
4.7 Desafio com ZIKV .....	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	75
5.1 Obtenção e caracterização da proteína recombinante ZIKV-E.....	75
5.2 Funcionalização dos Nanobastões de Ouro (GNR) .....	77
5.2.1 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E: Diâmetro Hidrodinâmico.....	79
5.2.2 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E: Potencial Zeta .....	80
5.2.3 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E: Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	82
5.3 Avaliação da imunogenicidade da vacina experimental GNR-ZIKV-E.....	84
5.3.1 Análise da resposta imune celular.....	84

<b>5.3.2 Avaliação da resposta de memória de células T CD8.....</b>	<b>87</b>
<b>5.3.3 Análise da Resposta Imune Humoral por Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto (ELISA) .....</b>	<b>91</b>
<b>5.3.4 Avaliação da Resposta Imune Humoral por Teste de redução de placas por neutralização (PRNT) .....</b>	<b>92</b>
<b>5.4 Desafio com ZIKV .....</b>	<b>94</b>
<b>5.5 Análises morfológicas <i>in situ</i>.....</b>	<b>102</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>107</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>108</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>109</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>119</b>

## 5 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O vírus Zika

O vírus Zika (ZIKV) é um orthoflavivírus transmitido majoritariamente por mosquitos do gênero *Aedes* que chamou muita atenção nos últimos anos devido ao aumento da prevalência de síndromes neurológicas consequentes de sua infecção, posteriormente considerado um problema de saúde pública de importância global (ASIF *et al.*, 2017). O primeiro caso registrado da doença no Brasil ocorreu em 2015, em Pernambuco (FERREIRA *et al.*, 2022). As principais complicações que ganharam destaque durante o surto de ZIKV foram a síndrome de Guillain-Barré (SGB) e Síndrome Congênita do Zika (SCZ) em recém-nascidos, sendo associada também ao aborto espontâneo e más-formações neurológicas (LABIB; CHIGBU, 2022; SEKARAN *et al.*, 2022).

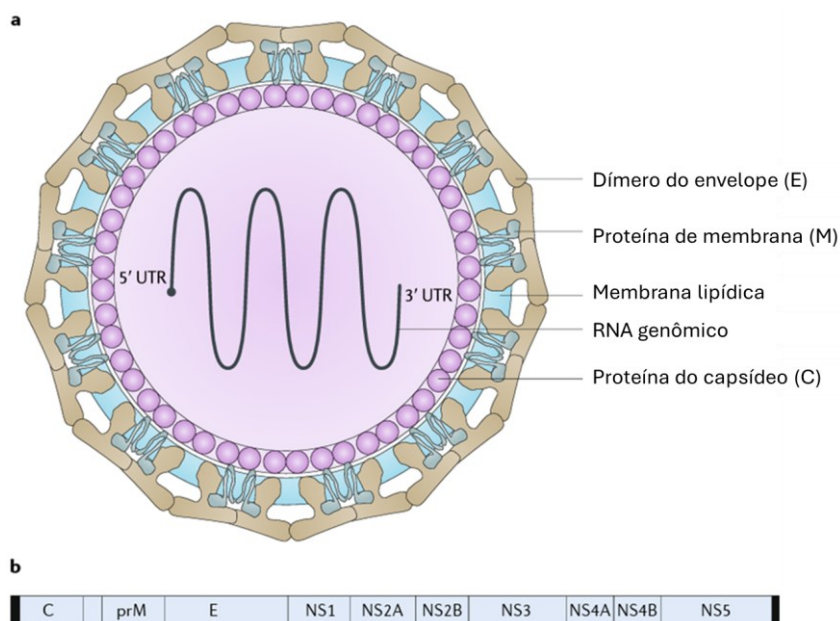
#### 1.1.1 Taxonomia

20

O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) é considerado a base global de dados e referências a taxonomia de vírus conhecidos, abrangendo mais de 10 mil espécies em seu banco de dados, retificado periodicamente caso novas descobertas ou alterações sejam realizadas, sendo a última feita por Zerbini *et al.* (2023). Segundo o levantamento de dados até o presente estudo, o vírus da espécie *Orthoflavivirus zikaense* está incluído no domínio *Riboviria*, reino *Orthonavirae*, filo *Kitrinoviricota*, classe *Flasurovicetes*, ordem *Amarillovirales*, família *Flaviviridae* e gênero *Orthoflavivirus*, compartilhando este último com outras 53 espécies de flavivírus conhecidos, muitos de grande importância médica e veterinária.

Cada uma das porções de táxons possui uma característica ímpar que trará a classificação como informada (ICTV, 2024). Por exemplo, membros do domínio *Riboviria* apresentam RNA polimerase RNA dependente (RdRp), uma enzima que é essencial para a replicação do genoma viral; do reino *Orthonavirae* apresentam vírus que normalmente possuem RNA como material genético, sendo de fita simples de polaridade positiva (ssRNA+) ou RNA

5 de dupla fita (dsRNA); membros do filo *Kitrinoviricota* são vírus ssRNA+ que infectam células de eucariotos, e que se diferem de outros filós como *Pisuviricota* e *Lenarviricota*. A classe e a ordem dos *Flasuviricetes* e *Amarillovirales*, respectivamente, abrangem todas as espécies da família *Flaviviridae*, que se destaca como incluindo vírus de RNA envelopados com composição físico-química semelhante entre todos os membros, que infectam mamíferos, aves  
10 e artrópodes, com seu ssRNA+ possuindo uma porção 5' com um grupo metil, formando uma estrutura *cap*, além de ser traduzido em uma poliproteína clivada posteriormente por proteases virais e do hospedeiro em porções de proteínas estruturais (apontadas na figura 1) e não estruturais, normalmente relacionados com ciclos de replicação ocorrendo no citoplasma e a endocitose ser mediada por clatrina. Por fim, o gênero *Orthoflavivirus* surge com as mesmas  
15 características estabelecidas, mas se volta mais para vírus causadores de encefalites, febre hemorrágica e microcefalia, possuindo transmissão vetorial por artrópodes ou não-vetorial por contato com sangue e secreções de indivíduos infectados. A espécie *Orthoflavivirus zikaense* com tais níveis taxonômicos superiores foi estipulada em 1999 (ICTV, 2024).



20

25

**Figura 1. A partícula e o genoma do vírus Zika.** (A) O RNA genômico é empacotado em uma partícula viral envelopada, formada pelas proteínas estruturais, enquanto as proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação viral e na evasão imunológica. (B) Proteínas estruturais do capsídeo (C), membrana precursora (prM) e envelope (E) e proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) são flanqueadas por porções 5' e 3' de regiões não codificadoras (UTRs (caixas pretas)). O alvo principal dos anticorpos neutralizantes é o envelope. Fonte: Adaptado de Abbink, Stephenson e Barouch (2018).

5

Membros da família *Flaviviridae* possuem 4 gêneros, entre eles os *Hepacivirus* (causadores de doenças como a Hepatite C), *Pestivirus* e *Pegivirus*, além dos *Orthoflavivirus* que incluem vírus de grande importância clínica. Entre estes últimos, são reconhecidos como patógenos humanos os vírus da febre amarela (YFV), Dengue (DENV), Zika, encefalite japonesa, Nilo Ocidental e o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (SIMMONDS *et al.*, 2017; ICTV, 2024).

O capsídeo dos orthoflavivírus possui cerca de 40-60 nm (nanômetros) de diâmetro, de forma esférica com um envelope lipídico que apresenta simetria pseudo-icosaédrica T=3. Os genomas são constituídos por ácido ribonucleico de fitas simples com sentido positivo (ssRNA+) de 9–11 mil bases. Os lipídeos presentes no envelope são derivados das membranas das células hospedeiras, além de possuírem moléculas de carboidratos na forma de glicolipídios e glicoproteínas (SIMMONDS *et al.*, 2017; ICTV, 2024).

### 1.1.2 Origem e epidemiologia

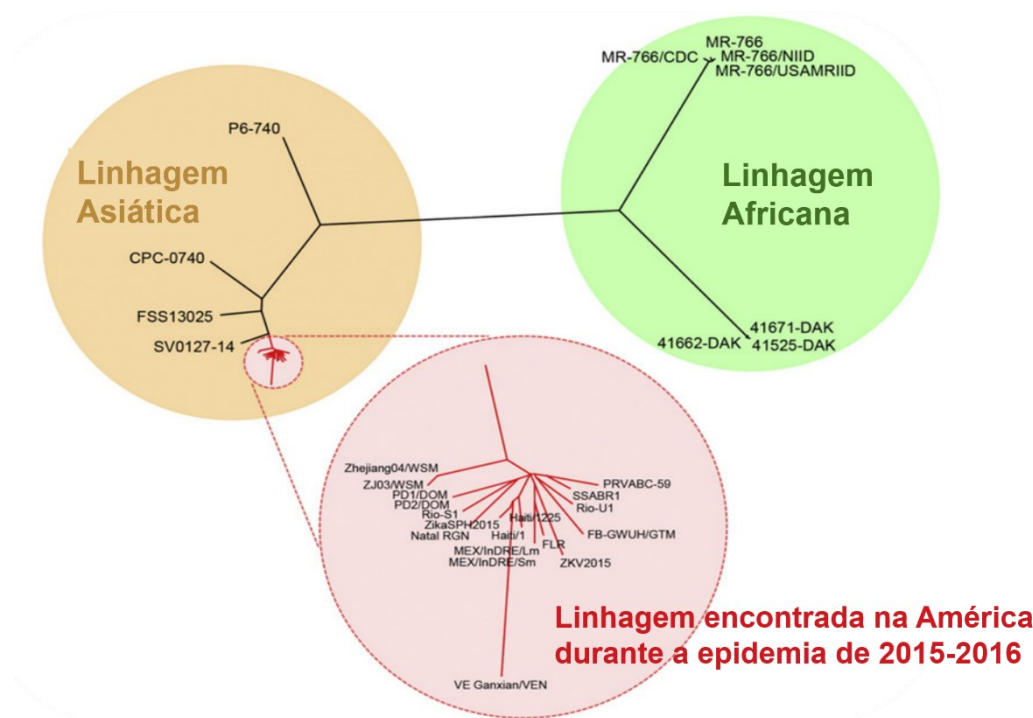
20

Anteriormente aos casos relatados no ocidente, o vírus havia sido primeiramente observado no ano de 1947 em macacos Rhesus na floresta de Zika, em Uganda (África) (DICK *et al.*, 1952). Com base em estudos sorológicos mais recentes, concluiu-se que o ZIKV era endêmico em certas regiões da África e da Ásia há pelo menos 50 anos, circulando silenciosamente na África Ocidental há mais de 20 anos (YEASMIN *et al.*, 2022); contudo, as limitações nos testes sorológicos e a potencial reatividade cruzada com outros orthoflavivírus dificulta a interpretação confiável dos dados, além do período de testagem e o tempo para liberação de resultados (LEDER *et al.* 2017; GIRON *et al.*, 2019). Com a chegada do vírus nas Américas, foram iniciados estudos focados em compreender o modo de transmissão os quais denotaram que o ZIKV transitava entre um ciclo de transmissão silvestre envolvendo primatas não humanos (PNHs) e outro ciclo entre humanos habitantes de regiões onde ocorria a presença de mosquitos do gênero *Aedes*, inclusos o *A. aegypti* e o *A. albopictus* (GREGORY *et al.*, 2017).

Dois linhagens principais de ZIKV foram identificadas e descritas como linhagem asiática e linhagem africana, as quais diferem em cerca de 5% no nível de aminoácidos, inclusive no caso da proteína do envelope. A linhagem asiática foi identificada pela primeira

35

- 5 vez na Ásia e, posteriormente, se espalhou para as ilhas do Pacífico e para as Américas (KUNO; CHANG, 2007; WHO, 2022). Devido à similaridade das sequências, as linhagens asiáticas e americanas são consideradas como um único sorotipo, assim como apontado por Asif *et al.* (2017) (Figura 2).

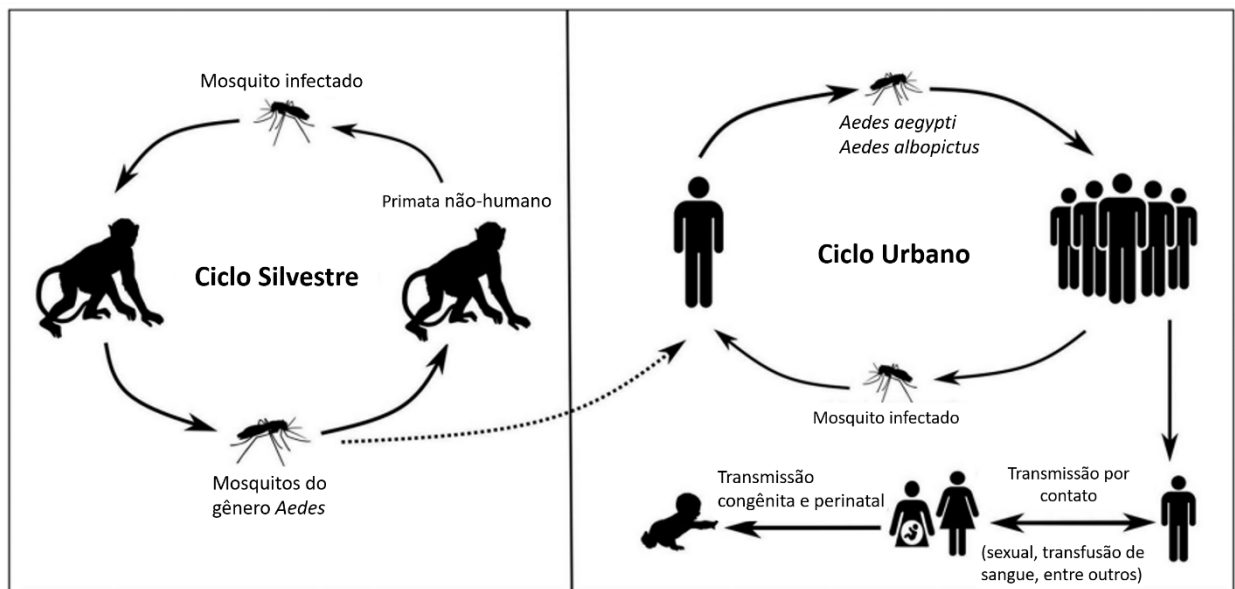


- 10 **Figura 2. Distribuição filogenética observada em diferentes regiões geográficas.** Para as duas linhagens observadas, se observa que os vírus observados nas Américas são descritos na linhagem asiática. Fonte: Adaptado de SONG *et al.* (2017).

- 15 Com a apresentação clínica semelhante à outras infecções causadas por orthoflavivírus (como a febre Dengue e febre Amarela), sintomas como febre acompanhada de poliartralgia, mialgia, exantema maculopapular e cefaleia dificultam o diagnóstico diferencial. No entanto, o vírus permaneceu como uma das infecções virais negligenciadas da medicina tropical, com pouco investimento para desenvolvimento de tratamentos e vacinas, tendo em vista a redução no número de casos nos últimos anos. A observação da síndrome de Guillain-Barré e microcefalia entre os casos de Zika representou um aumento no potencial da gravidade clínica da doença alertada pela WHO, como observados por Gatherer e Kohl (2016). Durante o surto no Brasil, relatos de bebês nascidos com microcefalia aumentaram acentuadamente, em 20 vezes (CHANG *et al.*, 2016).

5 Os dois modos de transmissão estudados do ZIKV incluem os modos de transmissão  
vetorial e não vetorial (Figura 3). Os mosquitos do gênero *Aedes* são os vetores majoritários  
pois transmitem o vírus após contato com o sangue de um indivíduo infectado a outro devido  
ao comportamento hematofago observado nas fêmeas das espécies. O modo de disseminação  
não vetorial por sua vez é minoritário, envolvendo o contato entre humanos, como a transmissão  
10 vertical entre mãe e feto, amamentação e relações sexuais. Outros modos não vetoriais de  
contágio do ZIKV são passíveis de observação como a transfusão de sangue (GREGORY *et al.*, 2017),  
no contato com fluidos corporais, como até mesmo transmissão ocular, uma vez que  
foi observando RNA viral em lágrimas de pacientes após trinta dias da infecção ser  
documentada (LABIB; CHIGBU, 2022).

15



**Figura 3. Representação esquemática das possíveis rotas de transmissão estabelecidas entre indivíduos infectados e o ambiente.** Fonte: Adaptado de SHARMA *et al.* (2020).

20

Cerca de 80% das infecções pelo ZIKV são assintomáticas, enquanto os outros 20% das  
infecções geralmente se apresentam de forma leve, como febre leve, erupção cutânea, dores  
musculares e articulares, conjuntivite, vômito, dor de cabeça, mal-estar, prostração e edema das  
mãos e dos pés, sintomas clássicos de arboviroses. Os sintomas geralmente duram de 2 a 7 dias,  
25 e o período de incubação do ZIKV normalmente varia de 3 a 12 dias. Nesse período, o genoma

5 do vírus pode ser encontrado em fluidos corporais (por exemplo, sêmen, urina, leite materno, saliva e líquido amniótico) durante semanas após a infecção. Em particular, o RNA genômico pode ser detectado no sêmen durante pelo menos 62 dias depois de um indivíduo estar infectado, além disso, o RNA do ZIKV pode ser encontrado no sêmen quando é indetectável no sangue. No caso da gravidez, a infecção se estende por um período maior devido à sua replicação no  
10 cérebro fetal por meses, enquanto a mãe pode permanecer assintomática (ASIF *et al.*, 2017; POLAND *et al.*, 2018; YEASMIN *et al.*, 2022)

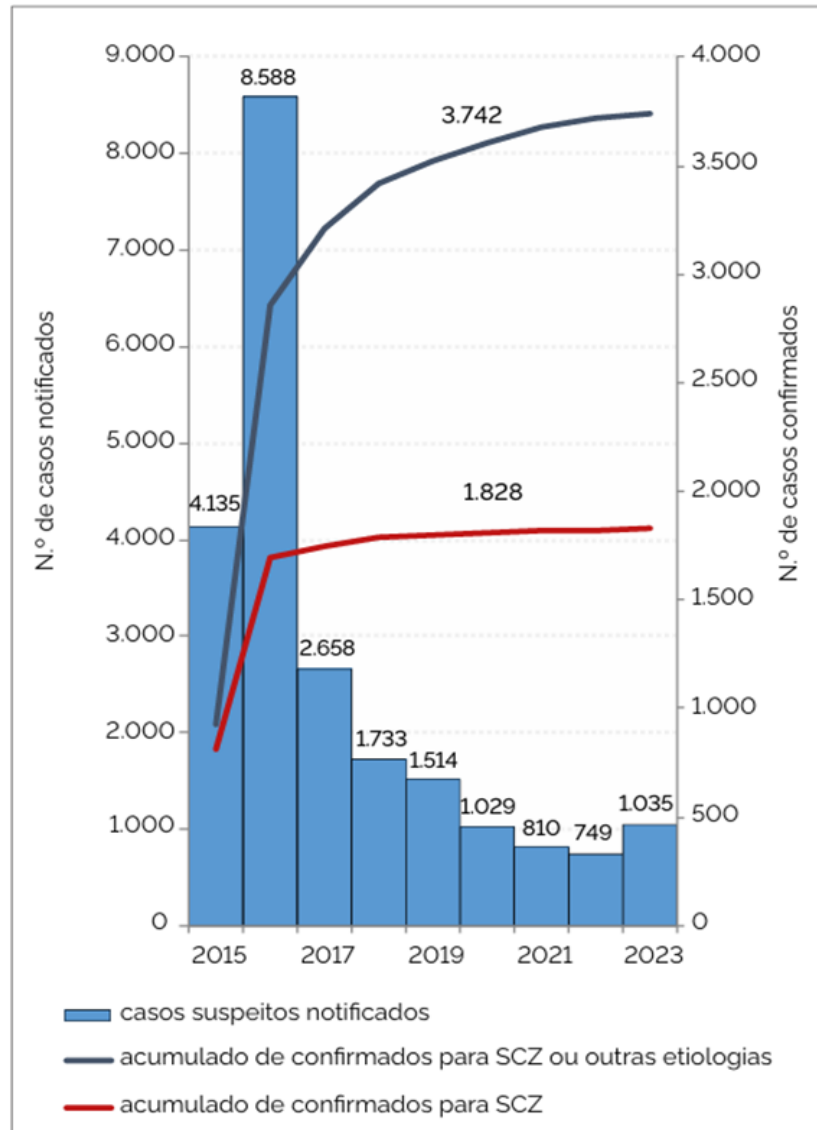
Embora o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) tenha fornecido orientação específica para avaliação de todos os bebês nascidos de gestações com possível exposição ao vírus Zika durante a gravidez, essas avaliações poderiam não ser viáveis por alguns fatores  
15 como: ao não ocorrer no período mais crítico da gestação; ou os centros de pesquisa e diagnóstico do país não possuem os exames apropriados para a comprovação; perdas gestacionais provavelmente subnotificadas (pois os casos são quantificados somente para nascidos vivos); e por fim, a ocorrência de gestações em pessoas com possível exposição ao vírus Zika sem comprovação, podendo gerar resultados adulterados (ROTH *et al.*, 2022).  
20 Estudos avaliados por Ferreira *et al.* (2022) e Abbink, Stepheson e Barouch (2018) evidenciaram que o ZIKV possui tropismo por células neuroprogenitoras, que causa a morte das células cerebrais do feto em desenvolvimento, resultando em alterações como microcefalia, atraso neuropsicomotor, desproporção craniofacial e alterações oculares e auditivas. A exposição ao vírus no 1º e no 2º segundo trimestre de gestação aumenta a chance de alterações  
25 congênicas, e dessa forma, as complicações causadas pelo ZIKV são graves e diversas. A capacidade do ZIKV de atravessar a barreira placentária fetal e causar danos ao feto e enfatiza a necessidade de uma vacina e destaca o objetivo principal da vacinação, que é medir a eficácia do tratamento na prevenção de malformações fetais (ABBINK; STEPHENSON; BAROUCH, 2018).

30 O surto de ZIKV nas Américas atingiu o pico durante o primeiro semestre de 2016, estima-se que houve cerca de 400 mil a 1,5 milhões de suspeitas de infecção por ZIKV, refletindo a capacidade do vírus de causar surtos em larga escala, onde o principal vetor biológico, o *Aedes aegypti*, é endêmico (Ferraris *et al.*, 2019, WHO, 2019). A incidência diminuiu na maioria dos países e territórios de 2017 a 2020. Em 2020, 22.885 casos de doença  
35 por ZIKV foram notificados na Região das Américas. Destes, 2.742 (12%) foram confirmados

- 5 laboratorialmente (PAHO, 2022). Esses dados indicam que a transmissão do ZIKV persiste em níveis baixos em vários países das Américas, com heterogeneidade observada em toda a região e dentro dos países. Juntamente com a febre Dengue e a febre Chikungunya, a febre Zika é uma das arboviroses de importância médica mais significativa no mundo, prevalentes nos países tropicais e subtropicais e que requerem vigilância epidemiológica ativa (Gómez *et al.*, 2022).
- 10 Estudos recentes de vigilância apontaram a circulação da linhagem africana do ZIKV em duas regiões brasileiras em 2019, alertando sobre um possível novo surto epidêmico no Brasil (KASPRZYKOWSKI *et al.*, 2020). A linhagem africana foi associada a um maior potencial epidêmico, uma vez que são mais propensas a causar perda fetal, passando despercebidas pelos sistemas de vigilância sanitária em comparação com a linhagem asiática, que causa defeitos
- 15 congênitos (AUBRY *et al.*, 2021).

No Brasil, entre os anos de 2015 e 2021, como apontado pelo Boletim Epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde em fevereiro de 2022, foram notificados 20.444 casos suspeitos da Síndrome Congênita do Zika (SCZ), dos quais 17,9% foram confirmados para alguma infecção congênita; desse total de casos confirmados, 50,1% foram classificados como

20 SCZ (figura 4). Em 2021, 801 casos suspeitos foram notificados (FERREIRA *et al.*, 2022). Assim como publicado pela Organização Mundial da Saúde (WHO), em fevereiro de 2022, dados levantados totalizaram um total de 61 países e territórios monitorados com evidências de populações de mosquitos-vetores estabelecidas, mas ainda não documentaram a ocorrência da transmissão do vírus.

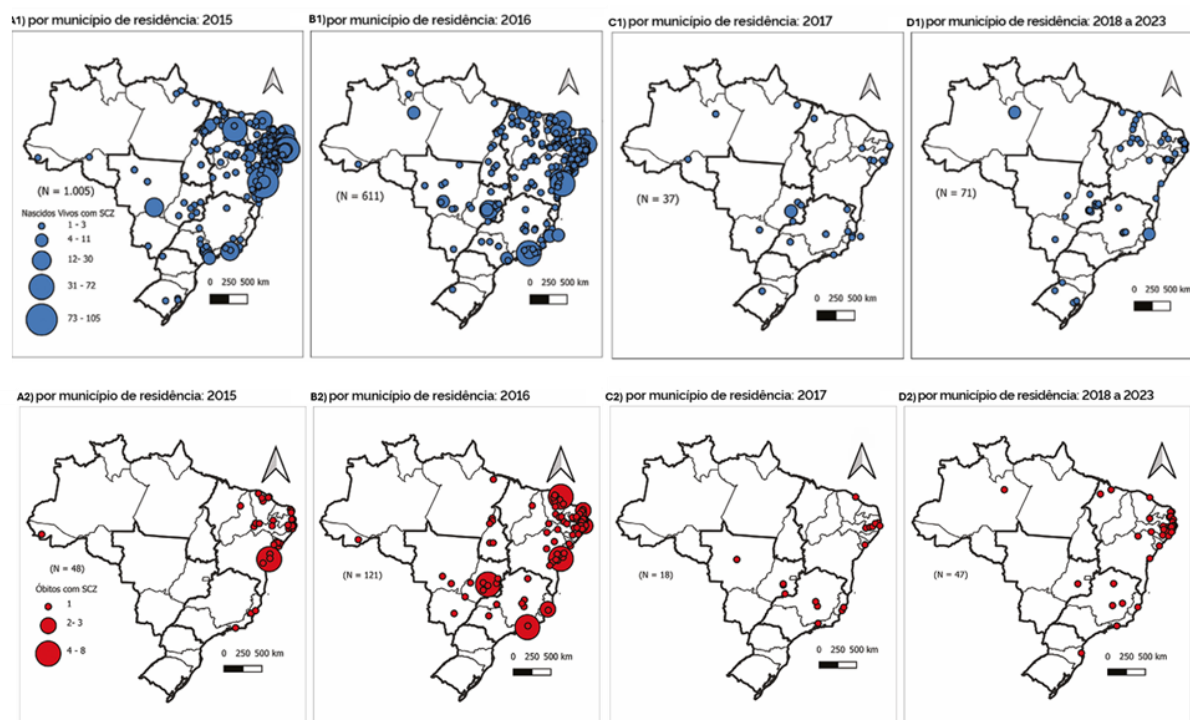


5

**Figura 4. Distribuição anual dos casos suspeitos de síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika notificados no Brasil entre 2015 e 2023.** Dados atualizados em 08/01/2024, sujeitos a alterações. Fonte: dados do Ministério da Saúde (2024)

10 No Brasil, sendo um país onde existe a ocorrência da transmissão de arboviroses simultâneas, o Ministério da Saúde providencia um Boletim Epidemiológico semanal, onde descreve dados coletados até a data em questão. Existem a modalidade nacional (observado na figura 5, denominado Boletim Epidemiológico) e estadual (representado na figura 6), o Informe Epidemiológico, feito pela Semana Epidemiológica da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais.

15



5

10

**Figura 5. Distribuição dos nascidos vivos (1) e óbitos (2) confirmados para síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika por região de residência da parturiente no Brasil e por ano de nascimento entre 2015 e 2023 (A) por município de residência e nascidos em 2015; (B) por município de residência e nascidos em 2016; (C) por município de residência e nascidos em 2017; (D) por município de residência e nascidos entre 2018 e 2023. Fonte: adaptado de dados do Ministério da Saúde (2024).**

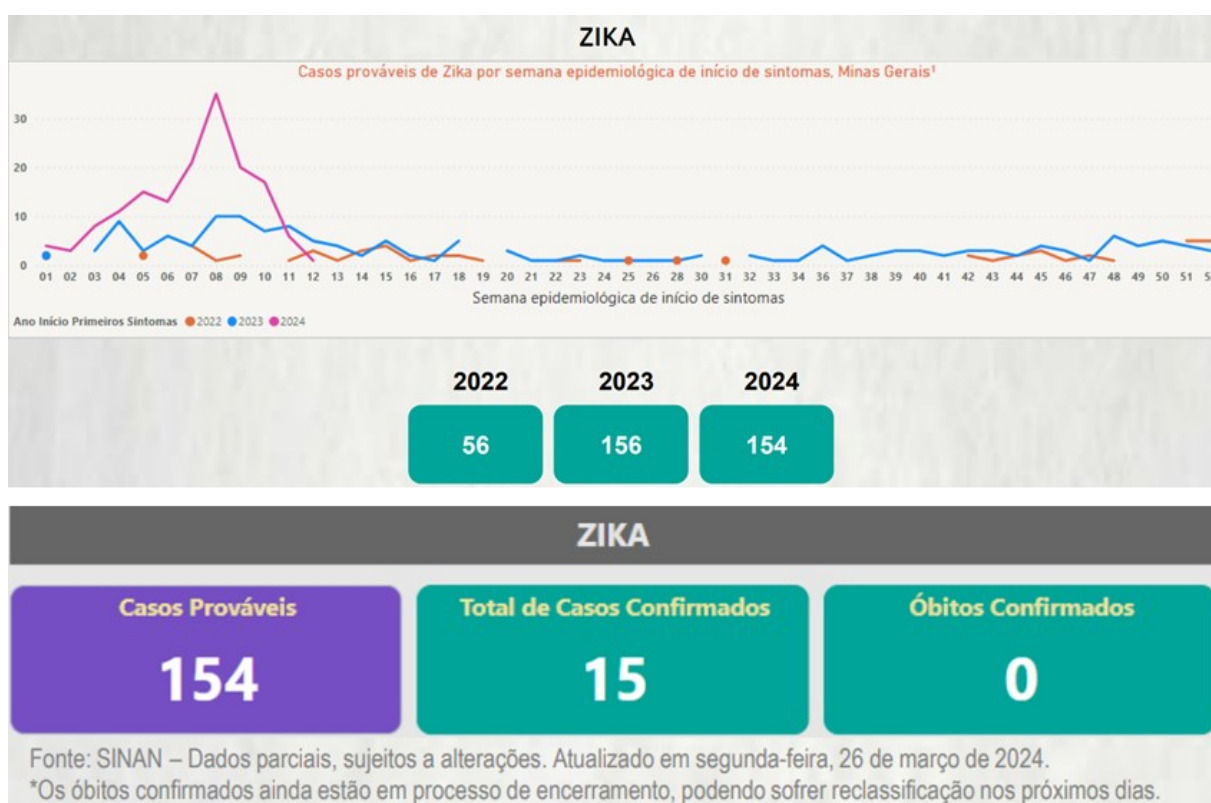
15

20

Entre os anos de 2015 e 2023, foram notificados ao Ministério da Saúde 22.251 casos suspeitos de SCZ, dos quais 3.742 (16,8%) foram confirmados para alguma infecção congênita. Do total de casos confirmados, 1.828 (48,9%) foram classificados como casos de SCZ, com cada região descrita na Figura 5, na distribuição dos nascidos vivos. De maneira geral: os dados de óbitos descritos demonstram confirmados 56 óbitos fetais, 42 abortos espontâneos e 162 óbitos pós-natais de casos com SCZ (em 2023 foram registrados sete óbitos de casos confirmados para SCZ, sendo três evoluções ao óbito de crianças nascidas em 2015, dois recém-nascidos e dois natimortos nascidos em 2023). A maioria é do sexo feminino (94; 36,2%), com baixo peso ao nascer (77; 29,6%), a termo (101; 38,8%), com parturiente na faixa etária de 20 a 29 anos (97; 37,3%) e ocorreram na Região Nordeste (173; 66,3%) no ano de 2016. O boletim ainda destaca que para muitas das variáveis citadas um alto percentual de casos tem suas informações descritas como ignoradas e por isso, os dados não entraram no estudo.

5 Observando os dados apresentados pela Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, com a quantidade escassa de dados completos, o Informe Epidemiológico tem poucos dados de ZIKV. Isso se dá pela redução em cerca de 63% nos casos no país nos anos de 2015-2024 e pela mais recente epidemia de DENV e outros arbovírus com maior taxa de incidência (figura 6). Todavia, se observa que existem pessoas afetadas, o que, apesar da baixa quantidade, afeta toda a vida de um recém-nascido com alguma SCZ ou algum indivíduo de risco que possa desenvolver a Síndrome de Guillain-Barré (SGB).

10



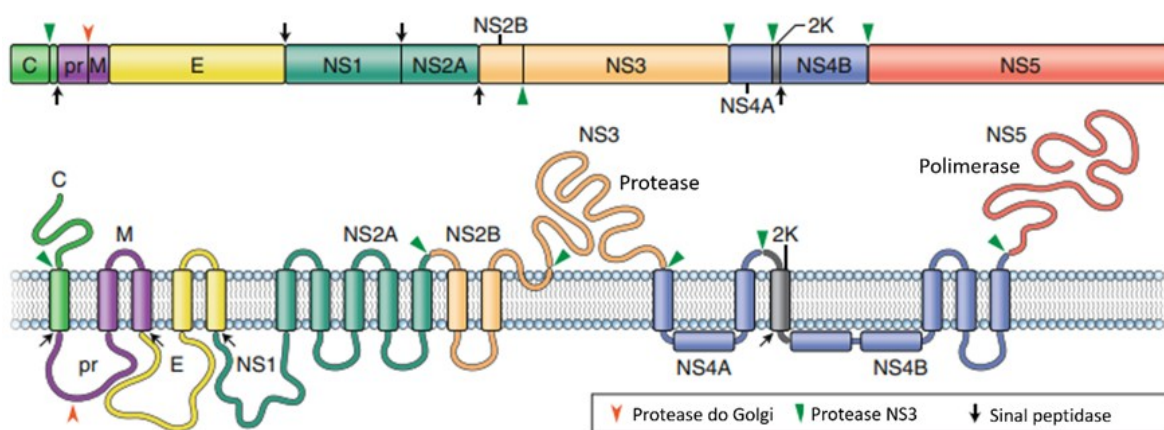
15 **Figura 6. Distribuição de casos prováveis de SCZ por semana epidemiológica de inícios de sintomas em Minas Gerais.** Logo abaixo, há uma tabela de casos confirmados para SCZ. Dados atualizados em 26/03/2024, sujeitos a alterações. Fonte: adaptado de dados da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (2024).

20

### 5 1.1.3 Organização do genoma viral

O RNA genômico de todos os membros da família tem uma organização semelhante e se comporta como o RNA mensageiro viral (mRNA) encontrado nas células infectadas. Possuindo uma única região de *Open Reading Frame* (ORF) flanqueada por regiões não codificantes (UTRs) 5' e 3' terminais, estas formam estruturas secundárias específicas necessárias para a replicação e tradução do genoma, com uma porção de nucleotídeo metilado (*capping*) para a tradução na extremidade 5' que interage com o ribossomo para a tradução e uma estrutura de *loop* na porção 3', que impede a degradação por enzimas do hospedeiro. Como observado por Clarke *et al.* (2015), membros do gênero *Orthoflavivirus* produzem um RNA não codificante único, subgenômico e pequeno (300-500 nucleotídeos) que é derivado da porção 3'-UTR do RNA genômico que demonstra função de reprimir vias de degradação de RNA intracelulares.

A iniciação da tradução do RNA genômico é dependente da existência da proteína *cap* observada na porção 5' e a poliproteína resultante (de aproximadamente 3400 aminoácidos) será clivada durante e após a etapa de tradução por proteases virais e da célula hospedeira. As proteínas estruturais (proteína do capsídeo (C), envelope (E) e a proteína precursora de membrana (prM, que é posteriormente clivada na proteína de membrana (M)) estão contidas na porção N-proximal da poliproteína e a porção de proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) no restante da mesma, que incluem uma serino-protease, uma helicase de RNA e a RNA polimerase RNA dependente (RdRp). As proteínas E, pr-M e a não estrutural 1 (NS1) apresentam as maiores diferenças na sequência em comparação a outros vírus da mesma família, como apontado por Poland *et al.* (2018) (figura 7). O conjunto de proteínas estruturais estão relacionadas à montagem da partícula viral enquanto as não estruturais estão envolvidas na replicação e na evasão imunológica (ABBINK; STEPHENSON; BAROUCH, 2018).



5

**Figura 7. Organização do genoma dos orthoflavivírus com a indicação do processamento da poliproteína precursora.** Aqui, indica-se as proteínas estruturais e não estruturais bem como sua conformação na membrana do retículo endoplasmático durante o processo de transcrição. Fonte: Pierson e Diamond, (2020).

10

As proteínas não estruturais são nomeadas como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. A porção N-terminal da NS3 junto com NS2B formam um complexo de protease NS2B-NS3 que cliva a poliproteína. Já a porção C-terminal da proteína NS3 tem atividades como helicase e nucleosídeo-trifosfato, participando da síntese de RNA viral enquanto o NS5 é uma proteína conservada que contém a enzima RdRp, essencial para a replicação viral. A NS5 ainda possui função ao ligar-se em STAT2 para induzir a degradação da mesma, o que resulta na homodimerização de STAT1-STAT1, um complexo proteico que atua em genes que promovem a produção de IFN tipo II, além de bloquear a resposta antiviral mediada por IFN tipo I e III. (LABIB; CHIGBU, 2022).

20

A proteína do capsídeo viral (C) é uma pequena proteína helicoidal com superfícies que se ligam aos ácidos nucleicos virais ou aos lipídios do hospedeiro e direciona a incorporação do genoma viral na partícula. Estabelecer a conexão física entre proteínas estruturais ancoradas na membrana e a proteína C ou RNA, todavia é pouco elucidada, com hipóteses que o capsídeo interage transitoriamente com outras proteínas estruturais durante a biogênese das partículas. A incorporação da proteína C à partícula viral é ainda regulada pela clivagem coordenada da poliproteína pela proteína não estrutural viral 2B (NS2B)-NS3 serina protease (PIERSON; DIAMOND, 2020).

25

A proteína E é uma proteína relativamente conservada em todos os orthoflavivírus, possuindo três domínios (EDI, EDII e EDIII). EDIII é responsável por mediar a ligação do vírus

5 aos receptores nas células hospedeiras permissivas. O dobramento da proteína E no retículo endoplasmático (RE) é facilitado por interações com a proteína estrutural pré-membrana (prM) logo após a síntese, incorporado ao envelope viral durante a morfogênese da partícula formando picos heterotriméricos prM-E com simetria icosaédrica e evita mudanças conformacionais na proteína E que permitiriam a fusão acidental com as membranas do hospedeiro durante a saída.

10 A proteína C serve como nucleocapsídeo enquanto a pr-M está complexada com a proteína E. A clivagem de prM em M ocorre durante a passagem do vírus pela rede trans-Golgi, por uma serina protease. Essa clivagem altera mais uma vez a conformação do trímero de proteínas, e no momento em que ocorre essa alteração conformacional, a partícula se torna infecciosa e é liberada das células infectadas (ÁVILA-PÉREZ *et al.*, 2018; LABIB; CHIGBU, 2022;

15 PIERSON; DIAMOND, 2020).

#### 1.1.4 Ciclo viral

A replicação do genoma do ZIKV ocorre no citoplasma em associação com porções da membrana plasmática sequestrada de vesículas e organelas (SIMMONDS *et al.*, 2017). Como observado em outros orthoflavivírus, as proteínas do envelope interagem com receptores de superfície e a fatores de adesão na célula hospedeira alvo para iniciar o processo de adesão, penetração e desnudamento do vírus, que será endocitado pela via mediada por clatrina. Isso dá acesso do vírus ao endossoma da célula hospedeira, onde as mudanças no pH ácido acarretarão

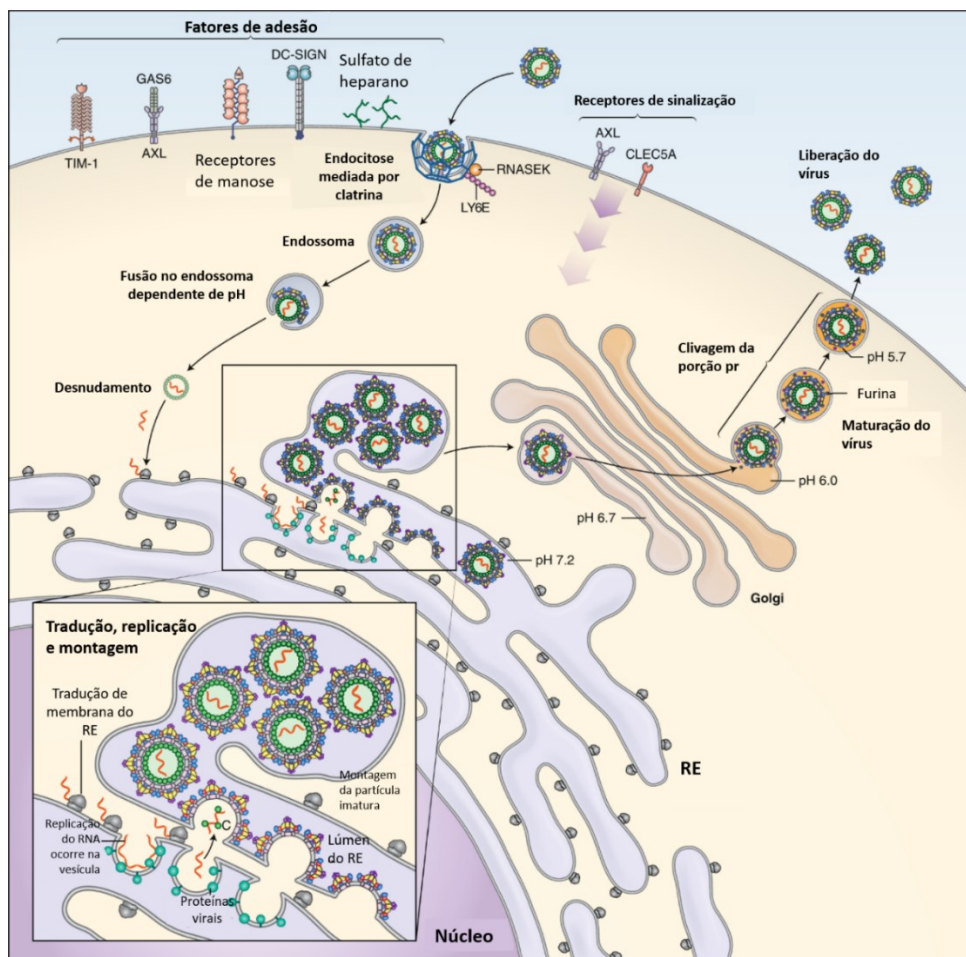
20 na fusão entre o envelope viral e a membrana celular, que, conseqüentemente, leva ao processo de desnudamento do capsídeo para liberar o genoma do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira para iniciar a transcrição e replicação (SONG *et al.*, 2017).

O genoma de senso positivo serve como RNA mensageiro (mRNA) que irá passar pelo processo de tradução para produzir uma única poliproteína que, por sua vez, sofre clivagem

30 durante e após a tradução por proteases celulares e virais para gerar três proteínas estruturais e sete não estruturais (LEE *et al.*, 2018). Se observa, também, para que ocorra a replicação do genoma, a síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa é realizada formando um intermediário de cadeia dupla (dsRNA) que será utilizado na síntese de novas moléculas de RNA de polaridade positiva (SIMMONDS *et al.*, 2017).

5 A formação de partículas virais imaturas ocorre no lúmen do retículo endoplasmático (RE), que ancora os complexos de replicação viral. Enquanto as proteínas estruturais são traduzidas na membrana do RE, o RNA recém sintetizado interage com a proteína C, formando o nucleocapsídeo dentro da partícula que será posteriormente transportada pela via de secreção trans-Golgi onde a presença do baixo pH e a ação de furinas, clivam a porção *pr* da molécula precursora *prM*, induzindo a complexação da proteína M com a glicoproteína E. Por fim, a montagem do capsídeo viral, incluindo a aquisição de um envelope lipídico contendo glicoproteína, ocorre a partir do brotamento através de membranas intracelulares. Partículas virais são transportadas em vesículas citoplasmáticas através da via secretora antes de serem liberadas por exocitose e adquirem o envelope recém modificado (DIAMOND; 10 LEDGERWOOD; PIERSON, 2019). A figura 8 descreve um esquema do ciclo viral de forma resumida.

15



**Figura 8. Ciclo de replicação dos orthoflavivírus.** Os orthoflavivírus infectam células de mamíferos por meio de interações com vários tipos de fatores de ligação do hospedeiro,

5 incluindo moléculas que se ligam à membrana viral ou carboidratos N-ligados associados à  
partícula viral. As partículas virais são endocitadas pela via mediada por clatrina, que alteram  
fatores do hospedeiro na absorção de macromoléculas. A fusão do envelope viral com as  
membranas do hospedeiro ocorre no endossoma dependente de alteração do pH. A replicação  
10 do RNA viral ocorre na membrana do retículo endoplasmático do hospedeiro que passam por  
rearranjos pelas proteínas não estruturais. Essas estruturas de membrana coordenam  
especialmente a replicação do RNA genômico viral e a morfogênese do capsídeo, protegendo-  
o de sensores do sistema imunes inato do hospedeiro. As partículas são transportadas pela via  
de secreção normal da célula, passando pelo Golgi, onde a ação de furinas e o baixo pH  
15 induzirão a maturação da partícula com a clivagem da porção prM, sendo liberada logo após,  
com virulência e capacidade de infectar outras células. Fonte: Pierson e Diamond (2020).

### 1.1.5 Resposta imune

20 Em geral, a resposta imune é dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa.  
Enquanto a imunidade inata reconhece padrões moleculares associados a patógenos através de  
receptores do tipo Toll, a imunidade adaptativa é dividida ainda em imunidade humoral e  
mediada por células (CHAN *et al.*, 2023). A resposta imune humoral, é impulsionada  
principalmente por uma resposta imune mediada por anticorpos guiada por células do tipo Th2.  
25 A resposta imunológica do organismo responsável em combater infecções virais é àquela  
dependente de produção de interferon (IFN). Os IFNs do tipo I e do tipo III são produzidos em  
resposta à infecção pelo ZIKV e podem limitar a replicação viral. Muitos dos modelos  
utilizados para estudar a patogênese desse vírus utilizam animais nocaute nestas vias  
imunológicas (DONALD *et al.*, 2016) (POLAND *et al.*, 2019).

30 Para orthoflavivírus neuroinvasores, a imunidade mediada por células T é importante  
para proteção contra doenças e para eliminação viral do sistema nervoso central (SNC). As  
células T CD4+, embora de menor frequência e menos descritas em literatura do que as células  
T CD8+ durante a infecção por orthoflavivírus, são importantes no fornecimento de ajuda às  
células T citotóxicas e às células B, sendo necessárias para a maturação dos anticorpos. Para a  
35 infecção por ZIKV, a resposta de células T CD4+ também foi detectada em primatas não  
humanos (NHP) infectados, e caracterizadas em camundongos C57BL/6 *wild type*, onde células  
T CD4+ diferenciadas mostraram um perfil típico de citocinas Th1, com um alto grau de  
polifuncionalidade. Já em estudos com T CD8+, em modelo murino, os anticorpos

5 neutralizantes foram capazes de eliminar a viremia de outros orthoflavivírus neuroinvasores, como o vírus do Nilo Ocidental em animais com depleção de células T CD8+, mas o vírus persistiu no SNC por um maior período de tempo. Embora os anticorpos neutralizantes e as células T CD8+ sejam os principais responsáveis pela resposta imune adaptativa protetora ao ZIKV, o papel das células T CD4+ com fenótipo Th1 e sinalização de IFN são necessárias para  
10 neutralizar a infecção viral, como observado por Pattnaik, Sahoo e Pattnaik (2020) e, portanto, aparentam desempenhar um papel indireto na proteção contra o ZIKV. Uma vacina ideal, portanto, deve ter a capacidade de induzir respostas de células T CD4+ e CD8+, além de fortes respostas humorais (DUTTA; LANGENBURG, 2023).

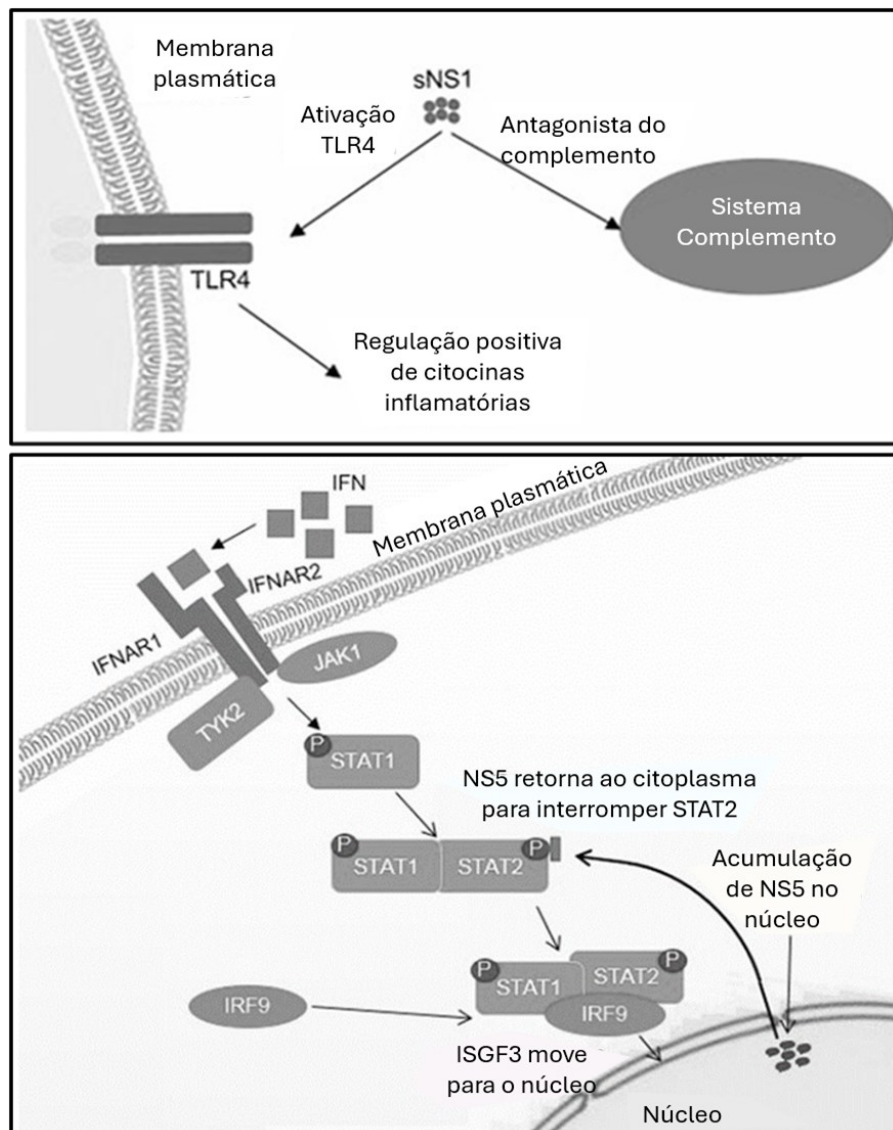
As observações de que o ZIKV se replica bem e causa doenças com manifestações  
15 clínicas evidentes em animais nocaute para vias de sinalização imunológica inata, como IFN e receptores STAT2, sugerem que a resposta imune inata à infecção pelo ZIKV é a primeira linha de defesa contra o patógeno. A resposta imune adaptativa (humorais e celulares) ao ZIKV são protetoras e geram anticorpos neutralizantes específicos dirigidos predominantemente contra a proteína E do vírus (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020), responsável por mediar a  
20 ligação e fusão do vírus aos receptores e à membrana da célula hospedeira.

#### 1.1.5.1 Estratégias de evasão imunológica

A via IFN-I é parte da resposta imune inata, que estabelece um estado antiviral em uma  
25 célula hospedeira por indução da via JAK-STAT para regular positivamente os genes estimulados por interferon (ISGs). Conforme descrito anteriormente, as proteínas não estruturais dos orthoflavivírus (NS1 e NS5) contribuem para a evasão imunológica do hospedeiro. A proteína NS1 clivada dimeriza rapidamente no ambiente intracelular e forma um dímero associado à membrana do retículo endoplasmático (ER) (mNS1), enquanto no ambiente  
30 extracelular, existe como uma molécula secretada (sNS1) com função de antagonista do sistema complemento. Para a sobrevivência da progênie viral secretada, o sNS1 interage com o sistema complemento, que é uma resposta imune mediada por anticorpos para neutralizar a infecção. O sNS1 também ativa o receptor Toll-like 4 (TLR4), para iniciar o processo de inflamação, que induz ainda as células leucocitárias a expressarem citocinas inflamatórias. Devido ao acúmulo

5 contínuo de citocinas inflamatórias, a membrana plasmática das células endoteliais pode levar ao vazamento vascular, estimulando a liberação de partículas virais maduras (ASIF *et al.*, 2017).

Já proteína NS5 do ZIKV desempenha um papel fundamental na inibição da via de ISG. Foi indicada a presença de NS5 no núcleo da célula hospedeira, apesar do seu papel principal na replicação do RNA viral no citoplasma. Como consequência da superexpressão do STAT2 humano,  
 10 humano, o NS5 reverte para o citoplasma onde interage com o STAT2 e o impede de entrar no núcleo. A evasão imunológica do IFN-I na infecção pelo ZIKV é provavelmente causada pela degradação do STAT2 livre no citoplasma, representado na figura 9 (ASIF *et al.*, 2017).



15 **Figura 9. Papel do hexâmero sNS1 no ambiente extracelular e de NS5 no escape imunológico.** A sNS1 desempenha um papel duplo ativa o TLR4 e induz a ativação do complemento para induzir resposta imune inflamatória; A via JAK-STAT, uma via estimulada por interferon, regula a expressão

5 de genes estimulante de interferon (ISGs) que são responsáveis por estabelecer um estado antiviral na  
célula; começa com a estimulação dos receptores de interferon- $\alpha$  1 e 2 (IFNAR1 e IFNAR2), que ativam  
Janus Quinase 1 (JAK1) e ativa ainda o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1 e STAT2)  
para a regulação positiva de ISGs. Após a infecção bem sucedida do ZIKV, a proteína NS5 do ZIKV  
10 acumula-se no núcleo da célula hospedeira e à medida que a concentração de STAT2 aumenta, ela se  
desloca para o citoplasma, onde interage com STAT2 e assim inibe a via JAK-STAT, levando à evasão  
imunológica do ZIKV. Fonte: Adaptado de Asif *et al.* (2017).

Dado o neurotropismo, a similaridade do ZIKV e sua presença nos tecidos cerebrais  
fetais e no líquido cefalorraquidiano em humanos e modelos animais, as células T CD8+  
15 possuem um papel fundamental na eliminação do ZIKV do SNC. Evidências epidemiológicas  
implicam que a ativação do sistema imunológico materno durante a gravidez pode ser  
desencadeada por vários tipos de estímulos e patógenos, e assim como descrito por Camargos  
*et al.* (2019), a infecção congênita pelo ZIKV resulta em níveis elevados de mediadores pró-  
inflamatórios, como CCL2, CXCL-10, IL-6 e IL-17. A infecção e replicação do ZIKV nas  
20 células da placenta dá acesso ao feto, onde exhibe neurotropismo, infectando células  
neuroepiteliais, neocorticais, células-tronco neurais e microglia. A infecção pelo ZIKV do  
cérebro fetal leva à apoptose, redução da proliferação celular e alterações transcricionais, o que  
se observa em alterações corticais e anomalias do neurodesenvolvimento (NARASIMHAN *et al.*, 2020). Lima *et al.* (2017) ainda observam que a ativação de células T CD8+ é reduzida em  
25 modelo murino de gravidez, o que pode facilitar a disseminação viral para o feto.

### 1.1.5.2 Resposta imunológica frente a outros orthoflavivírus

Diversos estudos relatam e concluem de maneiras distintas sobre a existência da  
30 imunidade cruzada entre ZIKV e outros orthoflavivírus. Um estudo feito por Lima *et al.* (2017)  
em primatas não humanos infectados com ZIKV mostrou que a imunidade pré-existente a  
outros orthoflavivírus como dengue ou febre amarela levou a uma maior ativação de células T  
CD4+ e títulos mais elevados de imunoglobulina G (IgG) anti-ZIKV, o que pode levantar a  
hipótese de que as respostas específicas para o ZIKV possuem uma vantagem quando existe a  
35 memória imunológica contra outros orthoflavivírus. Todavia, Poland *et al.* (2019) denota que  
respostas de anticorpos a outros orthoflavivírus podem aumentar a gravidade da doença, um

5 fenômeno conhecido como aumento dependente de anticorpos (ADE), levantando se tal fenômeno poderia ocorrer com vacinas para o ZIKV como foram no desenvolvimento de vacinas DENV ou em outros vírus semelhantes. A diversidade limitada entre as linhagens de ZIKV (aproximadamente 99% de identidade de aminoácidos) sugerem que a imunidade a uma linhagem de ZIKV deve proteger contra a infecção de outra linhagem, e por isso, o risco de ADE pode ser menos preocupante do que para DENV, que mostra maior variabilidade intra e intersorotipos (LIMA *et al.*, 2017). Em revisão feita por Diamond, Ledgerwood e Pierson (2019) observa que em macacos rhesus imunes ao DENV desafiados com ZIKV não se observou carga viral ou sintomas da doença aumentados, além de nenhum sinal de ADE ter sido observado em pacientes brasileiros com infecção aguda por ZIKV que tiveram exposição prévia ao DENV.

### 1.1.5.3 Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e Síndrome Congênita do Zika (SCZ)

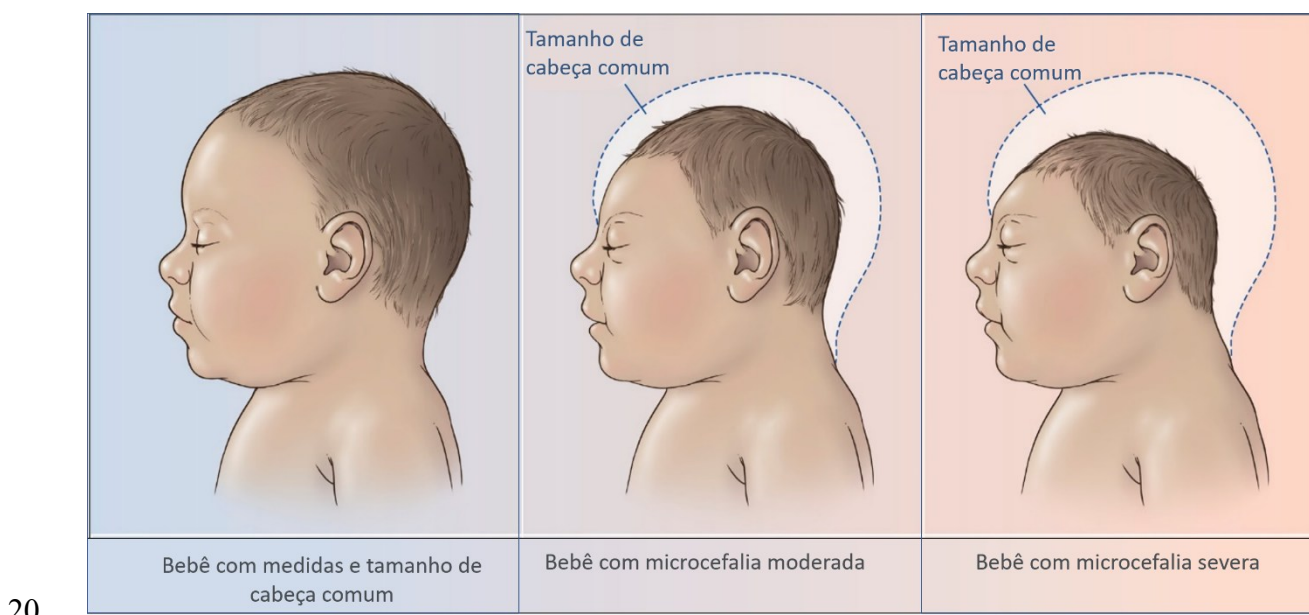
Em certos casos, os pacientes desenvolvem a síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma condição que causa danos ao sistema nervoso periférico. O mecanismo imunopatológico da SGB associada ao ZIKV é atribuído a um processo autoimune envolvendo mimetismo molecular, no qual a reação cruzada ocorre devido às semelhanças entre os epítomos imunogênicos da poliproteína do ZIKV e os gangliosídeos da membrana neuronal do hospedeiro (LABIB; CHIGBU, 2022). Os sintomas da SGB começam a surgir entre uma e quatro semanas após infecções virais e bacterianas, e incluem fraqueza muscular, formigamento, dormência, diminuição dos reflexos e paralisia, a qual pode evoluir para desordens respiratórias e de deglutição, com consequências potencialmente fatais (ZANLUCA *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2016). As evidências atuais estimam que a incidência da SGB seja de 24 casos por 100.000 indivíduos infectados pelo ZIKV (UNCINI *et al.*, 2017).

A infecção pelo ZIKV durante os estágios iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) está associada a um maior risco de má-formação devido a um fator de mimetismo molecular. O risco é maior no primeiro trimestre da gravidez, como observado por Labib e Chigbu (2022). Descrita como um distúrbio do neurodesenvolvimento, a Síndrome

5 Congênita do Zika (SCZ) é caracterizada pela má-formação observada no feto incluindo anormalidades oculares, musculoesqueléticas, craniofaciais e, em alguns casos, associadas ao aborto espontâneo. Entre os casos relatados, a microcefalia foi um dos distúrbios mais estudado, caracterizada por uma redução significativa no tamanho do cérebro, assim como representado na figura 10. É causada pela proliferação prejudicada das células progenitoras neuronais.

10 Células infectadas com ZIKV sofrem apoptose mediada pela proteína p53, o que resulta em uma redução no número existente. O restante das células sofrerá diferenciação prematura em neurônios maduros. Assim, a neurogênese prejudicada causa uma redução no tamanho do cérebro (LABIB; CHIGBU, 2022).

15 A SCZ envolve um distúrbio autoimune em que o corpo ataca erroneamente os nervos periféricos e danifica suas bainhas de mielina, podendo evoluir para complicações de movimentos fundamentais do corpo, como deglutição e respiração, com um amplo espectro de manifestações clínicas fetais resultantes da infecção materna pelo ZIKV (LABIB; CHIGBU, 2022; SEKARAN *et al.*, 2022).



**Figura 10. Representação ilustrada da ocorrência de microcefalia em recém-nascidos.** Observa-se a redução significativa do diâmetro e o peso crânio do recém-nascido. Fonte: adaptado de Petersen *et al.* (2016).

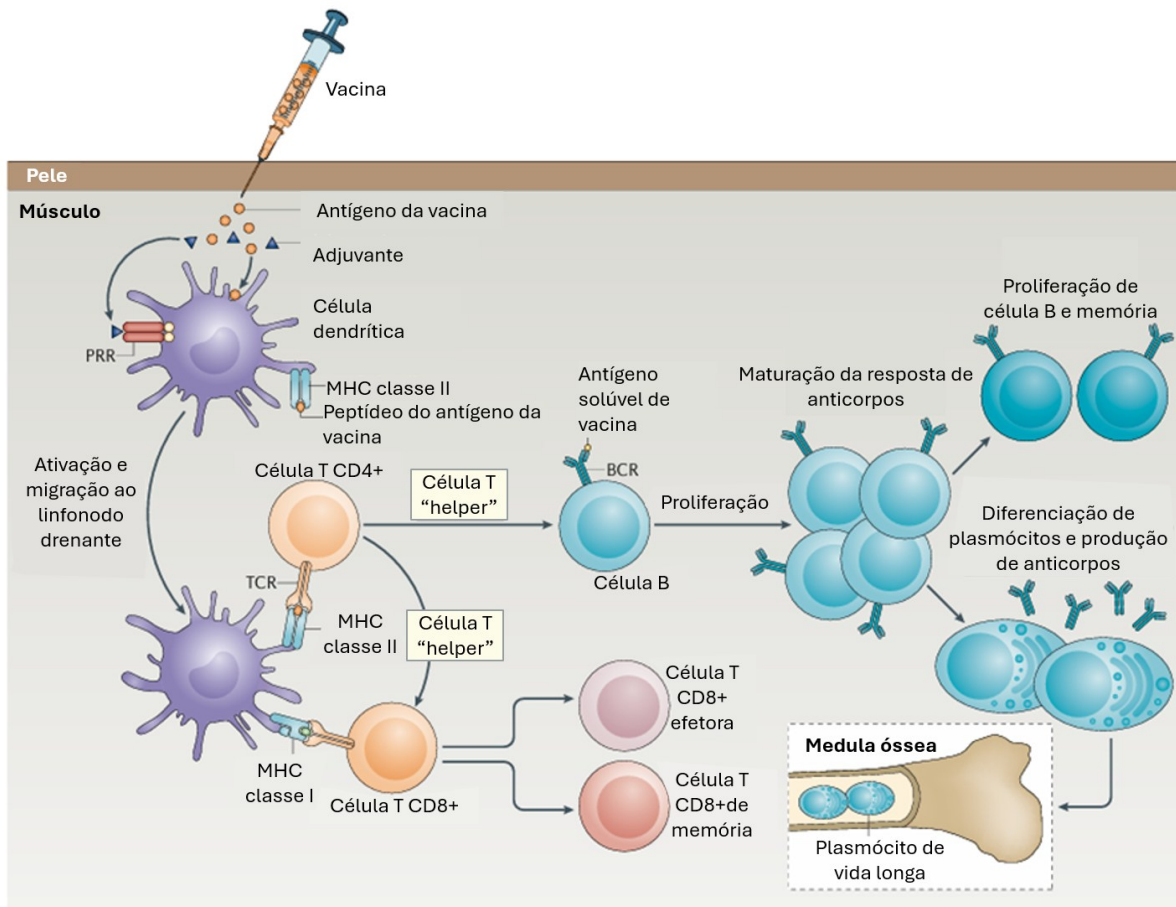
#### 25 1.1.5.4 Resposta imunológica estimulada por vacinação

5

Uma vacina é um produto biológico que pode ser usado para induzir com segurança uma resposta imune que confira proteção contra infecções e/ou doenças na exposição subsequente a um patógeno. Para conseguir isso, a vacina deve conter antígenos derivados do patógeno ou produzidos sinteticamente para representar componentes do patógeno. A proteção conferida por uma vacina é medida em ensaios clínicos que relacionam as respostas imunológicas ao antígeno da vacina com certos objetivos clínicos (prevenção da infecção, redução da gravidade da doença ou diminuição da taxa de hospitalização) (POLLARD; BIJKER, 2020).

As vacinas são geralmente classificadas como vivas ou não vivas (“inertes”) para distinguir àquelas que contêm linhagens replicantes atenuadas do organismo patogênico relevante (onde ocorre a replicação no hospedeiro imunocompetente mas sem causar manifestações da doença) daquelas que contêm apenas componentes de um patógeno ou organismos inteiros mortos (frequentemente utilizadas com adjuvantes para aprimorar a capacidade de induzir uma resposta imune forte). Além das vacinas vivas e não vivas descritas como “clássicas” em revisão de literatura feita por Pollard e Bijker (2020), várias outras plataformas foram desenvolvidas ao longo das últimas décadas (possuindo um maior destaque após a pandemia de SARS-CoV-2) incluindo vetores virais, vacinas de RNA e DNA baseadas em ácidos nucleicos e partículas semelhantes a vírus (VLP).

A resposta imune adaptativa é mediada por células B que produzem anticorpos (imunidade humoral) e por células T (imunidade celular). Após a formulação vacinal ser injetada no músculo, o antígeno é fagocitado pelas células dendríticas, que são ativadas através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e depois migram para o linfonodo, onde a apresentação de peptídeos da proteína presente na vacina pelas moléculas do MHC na célula dendrítica ativa as células T através do seu receptor de células T (TCR). Através da sinalização e ativação de células B, ocorre a captura do antígeno solúvel através do receptor de células B (BCR), as células T impulsionam o desenvolvimento de células B no linfonodo (figura 11) (Pollard e Bijker et al., 2020).



5

**Figura 11. A geração de uma resposta imune após imunização com um antígeno proteico convencional.** A vacina é injetada no músculo e o antígeno é fagocitado pelas células dendríticas, que são ativadas através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e depois traficadas para o linfonodo, onde a apresentação de peptídeos da proteína da vacina pelas moléculas do MHC na célula dendrítica ativa as células T através do seu receptor de células T (TCR). Através da sinalização e ativação de células B, ocorre a captura do antígeno solúvel através do receptor de células B (BCR), as células T impulsionam o desenvolvimento de células B no linfonodo. Fonte: adaptado de Pollard e Bijker (2020).

10

## 15 1.2 Desenvolvimento de vacinas para o ZIKV

Até a presente data, nenhum antiviral para tratamento ou vacina para prevenção estão disponíveis para o ZIKV; de fato, apontando por Peng *et al.* (2024), estão em andamento vários ensaios clínicos de fase I e dois candidatos em fase II. Contudo, vários desafios estão a ser enfrentados no desenvolvimento de vacinas relativamente à segurança e eficácia que precisam

20

5 de ser considerados antes de estas vacinas serem licenciadas e utilizadas na clínica. A primeira  
preocupação é a necessidade de estabelecer modelos de estudo da SCZ em gravidez que sejam  
relevantes, visto que o modelo murino é frequentemente usado para modelar doenças humanas  
devido à sua acessibilidade e facilidade de criação e manipulação; no entanto, o seu período de  
gestação é breve e possuem uma estrutura placentária que é fundamentalmente diferente  
10 daquela de primatas não-humanos (NHPs) e dos humanos.

Entre as vacinas em ensaios clínicos, existem cinco diferentes tipos de tecnologias  
vacinais: vacinas vivas atenuadas, vacinas inativadas, vacinas de ácido nucleico, vacinas de  
vetor viral e vacinas de subunidades recombinantes. Como demonstrado por dados levantados  
de Peng *et al.* (2024), as vacinas inativadas oferecem vantagens convenientes de produção,  
15 segurança e preservação; no entanto, a sua imunogenicidade é geralmente inferior à das vacinas  
vivas atenuadas e são necessários adjuvantes para estimular respostas imunitárias de alto nível.  
As vacinas de ácido nucleico oferecem estabilidade e vantagens de produção em massa, mas a  
baixa imunogenicidade deve ser compensada com as estratégias de vacinação que envolvem a  
iniciação e o reforço com diferentes combinações de vacinas. Em comparação com as vacinas  
20 inativadas, as vacinas de vetor viral não requerem adjuvantes ou imunizações de reforço. Por  
fim, como destaque neste presente trabalho, as vacinas de subunidades recombinantes  
estimulam respostas imunes protetoras e terapêuticas de longa duração e são atualmente uma  
forma prática e viável de desenvolver imunidade.

### 25 **1.2.1 Vacina de subunidades recombinantes**

As vacinas de subunidades recombinantes apresentam um excelente perfil de segurança,  
uma vez que o imunógeno não é replicativo e não há preocupações quanto à imunidade prévia  
do vetor da vacina. Estas vantagens são especialmente benéficas considerando as precauções  
30 rigorosas necessárias para o grupo demográfico mais gravemente afetado pelo ZIKV (por  
exemplo, mulheres grávidas e idosos) (TO *et al.*, 2018).

Uma vacina de subunidade recombinante contra ZIKV é criada usando DNA plasmidial  
que codifica um gene específico em bactérias, leveduras ou células de insetos, e esta abordagem  
é considerada eficaz e viável para gerar respostas imunes protetoras e terapêuticas de longa  
35 duração. Além disso, a segurança desta vacina à base de proteínas supera a das vacinas à base

5 de vírus inativados ou vetores virais, pois elimina os riscos de inativação incompleta e reações  
adversas aos vetores no hospedeiro, sendo uma alternativa viável por demonstrar  
imunogenicidade em trabalhos como os de Costa *et al.*(2023) e To *et al.* (2018). Apesar disso,  
sua baixa capacidade de desencadear uma resposta imunológica exige a utilização de doses e  
adjuvantes mais potentes para atingir um nível de proteção eficaz (PENG *et al.*, 2024) e depende  
10 de múltiplas doses de reforço em vários momentos da vida do paciente, a fim de proporcionar  
imunidade duradoura (DUTTA; LANGENBURG, 2023).

### 1.2.2 Desafios no desenvolvimento de vacinas para o ZIKV

15 Dado que o ZIKV ocorre em surtos intermitentes, a vacina ideal deve dispor da  
capacidade de ser armazenada durante longos períodos de tempo. O desenvolvimento de  
vacinas também enfrenta vários desafios, incluindo a falta de um correlato de proteção  
estabelecido (em crianças, adultos e fetos), a imprevisibilidade atual em conjunto com a falta  
de surtos, o grande número de infecções subclínicas, a acentuada variabilidade nas  
20 manifestações durante a doença sintomática, a ocorrência assintomática, a necessidade de testar  
múltiplas populações vulneráveis, os efeitos incertos da imunidade prévia ao ZIKV ou a outros  
orthoflavivírus (como YFV e DENV) e a falta de modelos animais que recapitem  
características importantes das doenças humanas. Camundongos *knockout* (KO) com  
deficiências de receptores imunológicos são frequentemente usados para criar modelos animais;  
25 no entanto, tais modificações no hospedeiro podem desencadear mecanismos que deturpam as  
características patológicas virais (POLAND *et al.*, 2019).

Embora altos títulos de neutralização de vírus estejam associados à proteção, a geração  
de anticorpos com níveis neutralizantes abaixo do ideal pode promover o ADE observado em  
outros orthoflavivírus, o que pode complicar a segurança da vacina em áreas onde a  
30 cocirculação é endêmica (TO *et al.*, 2018). Além disso, não está claro como a imunidade a  
outros orthoflavivírus pode afetar a suscetibilidade de uma pessoa à infecção pelo ZIKV, e  
existem poucos relatos quanto a duração da imunidade após a infecção pelo ZIKV. A  
investigação e o desenvolvimento de vacinas dependem fortemente de modelos animais e  
coortes observacionais em áreas epidêmicas, tornando impossível estimar a eficácia sem  
35 transmissão contínua (PENG *et al.*, 2024).

5           No viés econômico, entre os países onde foram identificados casos relacionados com o  
ZIKV bem como outras doenças causadas por orthoflavivírus, se observa pouco investimento  
em pesquisa e em tratamentos alternativos. Normalmente, o que se destaca são campanhas de  
conscientização para reduzir pontos de água parada, onde a fêmea dos mosquitos do gênero  
10           *Aedes* normalmente deposita os ovos para dar sequência ao ciclo de vida da espécie e dessa  
forma, reduzir a população de mosquitos e conseqüentemente a probabilidade de transmissão  
vetorial. Órgãos governamentais e sistemas de ensino focam por muitas vezes nesse argumento  
que permanece válido até os dias de hoje, mas é pouco prático para reduzir a gravidade dos  
surtos que ainda persistem, como observado pelo Ministério da Saúde (2024). Com base na  
literatura disponível e nos dados epidemiológicos, um programa de vacinação em massa deve  
15           ser considerado para algumas infecções por orthoflavivírus, por exemplo, dengue e  
possivelmente Zika. No entanto, o principal ponto de preocupação é a distribuição e  
disponibilidade uniforme de vacinas para países de baixo rendimento, uma vez que as áreas  
endêmicas de orthoflavivírus estão localizadas principalmente em regiões tropicais e  
subtropicais, que carecem de hospitais bem equipados e de pessoal treinado. Em geral, a  
20           indústria biofarmacêutica deveria concentrar-se mais naqueles que mais necessitam de uma  
vacina, e não em quem pode pagá-la (DUTTA; LANGENBURG, 2023).

### 1.2.3 Estratégias não clássicas de vacinação e Nanotecnologia

25           O conceito básico do sistema imunológico é ser uma rede biológica que reage a ameaças  
exógenas (ou seja, antígenos) para proteger o hospedeiro e manter a homeostase, protegendo o  
hospedeiro de agentes exógenos e assim preservar a integridade do corpo. A imunomodulação  
é um termo genérico que abrange tanto o aprimoramento quanto a redução da atividade do  
sistema imune. Dentre as estratégias neoclássicas de vacinação, vários estudos vêm  
30           demonstrando o potencial uso de nanopartículas (NPs) como imunomoduladores, uma vez que  
a superfície das NPs afeta seu comportamento em suspensões e interações com as membranas  
celulares (KUBACKOVA, ZBYTOVSKA e HOLAS, 2020). As propriedades físico-químicas  
das NPs como tamanho, carga, forma, hidrofobicidade e rigidez determinam suas interações  
com proteínas solúveis, células apresentadoras de antígenos e neutrófilos (LIU *et al.*, 2017).

5 As principais vantagens dos nanomateriais estão relacionadas à sua eficácia e segurança, liberação constante de medicamentos, circulação prolongada no organismo e maior probabilidade de se atingir um determinado local do organismo. Como apontado por Shah e Dobrovolskaia (2018), existem diversos nanomateriais que exploram diferentes conformações em relação à estrutura. As formulações vão desde nanoemulsões, micelas, lipídios sólidos, 10 nanopartículas, nanobastões, nanotubos, fulerenos, metais coloides e óxidos metálicos. Além de suas propriedades específicas, cada NP é única devido a um conjunto específico de propriedades físico-químicas. O estudo feito por Liu *et al.* (2013), mostrou que os efeitos de várias NPs foram distintos em diferentes tamanhos, e a composição química havia um papel fundamental nos efeitos toxicológicos de diferentes nanomateriais. A manutenção da 15 estabilidade dos parâmetros utilizados para a síntese da NPs se torna imprescindível no desenvolvimento de medicamentos nanoterapêuticos.

Além do material utilizado para carrear o antígeno, uma vacina precisa de compostos que auxiliem na modulação da resposta imunológica, chamados de adjuvantes. Anterior ao estudo discutido nesta dissertação, Moraes (2022) verificou e validou a utilização de 20 glicolipídios sintéticos como os melhores adjuvantes vacinais, sendo eles o alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) e um análogo do mesmo, definido como 7DW8-5.

O glicolipídio  $\alpha$ -GalCer liga-se ao CD1d, uma molécula semelhante ao MHC-I, que é expressa principalmente por células apresentadoras de antígenos (APC) como células dendríticas (DCs), macrófagos e células B e apresentada às células *natural killers* invariantes 25 (iNKT) (LI *et al.*, 2016; TSUJI *et al.*, 2023; DIUPOTEX *et al.*, 2023). Possuindo esta característica, a utilização como adjuvante foi investigada por Feng *et al.* (2019) em candidatos vacinais para o vírus Influenza A, onde se observou o aumento da produção de anticorpos específicos, além do estímulo da resposta imune global levando à produção de citocinas Th1 e Th2, ativando células APCs, NKTs, células B e por consequência, a ativação de células T CD4+ 30 e T CD8+. A apresentação precoce de células APCs leva a uma resposta inata rápida e, consequentemente, a uma produção mais prolongada de IFN- $\gamma$  pelas células NKT (FUJII *et al.*, 2003; DIUPOTEX *et al.*, 2023).

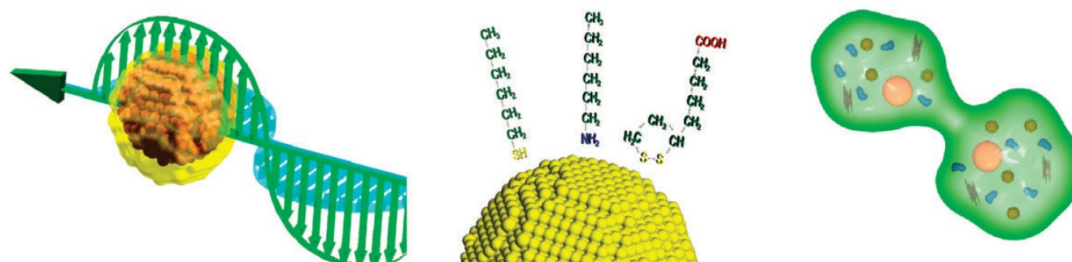
A partir de uma extensa pesquisa com glicolipídios sintéticos, Tsuji *et al.* (2023) identificou o análogo 7DW8-5 que estimula células *natural killers* invariantes (iNKT) em 35 atividade imunoestimulatória ainda mais potente em células em camundongos e humanos *in vitro*. As células iNKT não apenas secretam citocinas Th1 com potentes efeitos antivirais, mas

- 5 também ativam populações de células NK e células T CD8+. Cada uma dessas populações celulares ativadas pode liberar múltiplas citocinas, incluindo o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

#### 1.2.4 Nanopartículas de ouro: propriedades e interações

10 A utilização de nanoestruturas de metais nobres vem sendo difundida entre as mais diversas áreas das ciências biológicas, com funções de diagnóstico e terapia de doenças como o câncer, na separação de proteínas de interesse de amostras biológicas ou até mesmo como 15 carreadoras de fármacos para uma resposta mais ampla e precisa. Além disso, é de se observar o uso de nanomateriais em outras áreas tecnológicas, como sensoriamento e catálise eletrônica (DANIEL *et al.*, 2004). Entre as diversas áreas de aplicação da nanotecnologia, os 20 nanomateriais constituídos por metais nobres vêm sendo associados na área da saúde e no desenvolvimento de sistemas carreadores devido a suas propriedades físicas e químicas peculiares, como a estabilidade de partículas (quando utilizados metais para a síntese), grande reprodutibilidade, funcionalização, controle do tamanho e forma e também o fenômeno conhecido como ressonância plasmônica (AMENDOLA; MENEGHETTI, 2009).

A funcionalização da superfície metálica pode ocorrer com uma variedade de moléculas orgânicas, onde as ligações químicas metal-enxofre são geralmente exploradas para a conjugação, como observado por Amendola e Meneghetti (2009), representado na figura 12. Pela constituição de átomos de metais estáveis, as propriedades químicas e físicas muitas vezes 25 são homogêneas e em alguns casos a biocompatibilidade, dependendo do metal, pode resistir a altas temperaturas, além de foto-irradiação, ácidos ou oxidação.



5

**Figura 12. Esboços representando as três características principais de nanomateriais metálicos:** ressonância de plásmon de superfície, possibilidade de funcionalização, estabilidade química e biocompatibilidade in vivo Fonte: Amendola e Meneghetti (2009).

10 Neste contexto, uma classe de nanomateriais de grande potencial tecnológico são as nanopartículas de ouro (GNP), que possuem propriedades físicas de interesse para aplicações químicas e biológicas. São consideradas NPs estáveis e podem ser sintetizadas em diversos tamanhos e formatos, tais como nanoesferas, nanobastões, nanocaixas, nanoestrelas e nanoconchas. A síntese das GNP geralmente é econômica, pois embora demande reagentes  
15 específicos com preços elevados, estes são empregados em concentrações muito baixas (FERREIRA *et al.*, 2017).

Os materiais nanoestruturados plasmônicos são definidos por meio de sua forte interação com luz incidente e elétrons livres, onde nanoestruturas metálicas atuam como fonte para converter luz em um campo elétrico que ocorre na superfície (excitações eletromagnéticas  
20 acopladas a oscilações coletivas de elétrons livres), fenômeno chamado de ressonância plasmônica de superfície a qual pode ser detectada por espectroscopia, o que faz com que a interação de moléculas orgânicas na superfície das GNPs seja facilmente observada pelo deslocamento no espectro UV-Vis. Em relação às GNPs, as nanoesferas de ouro apresentam uma banda de absorção plasmônica na região do espectro visível, em torno de 520 nm. Para os  
25 nanobastões de ouro (GNR) existe uma banda de absorção no comprimento de onda semelhante ao das nanoesferas (denominada banda transversal) e uma banda longitudinal (> 600 nm) como resultado da absorção induzida pelo eixo longo dos GNRs, a qual varia de acordo com sua relação de aspecto (comprimento/largura) (QAZI; JAVAID, 2016).

Com o aumento dessa razão, que pode ser determinado tanto pela modificação do  
30 tamanho dos GNRs quanto pela ligação de moléculas em sua superfície, a cor do ouro em solução é alterada do azul para o vermelho e o comprimento de onda de ressonância plasmônica

5 é deslocado. A existência da banda de absorção plasmônica longitudinal apresenta-se como o principal diferencial e grande vantagem da síntese de GNRs em relação à nanoesferas, o que permite uma homogeneidade e caracterização aprimoradas devido à alta sensibilidade de absorção óptica após qualquer ligação em sua superfície (QAZI; JAVAID, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017).

10 A precisão na entrega e penetração do nanocarreador no local de interesse ou nas células imunológicas é um componente crítico. Isso facilita a indução dos genes da resposta imune, o processamento de antígenos, a secreção de citocinas, a produção de anticorpos e a estimulação de células T para uma terapia eficaz ou eficácia da vacina. (SENGUPTA *et al.*, 2022).

Os GNP são eficientes na entrega de antígenos nas principais células apresentadoras de 15 antígenos (APCs), como as células dendríticas, facilitando a resposta imune a jusante, a apresentação cruzada e a resposta das células T citotóxicas CD8 + (SENGUPTA *et al.*, 2022). Em estudos de Niikura *et al.* (2013) que verificaram a influência entre tamanho e forma de GNPs na resposta imune em modelos *in vivo* e *in vitro* concluíram que os GNRs ativavam especificamente a via mediada pelo inflamassoma com secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18, citocinas que 20 ativam e recrutam células do sistema imune, induzindo a uma resposta inflamatória.

As nanopartículas de ouro são carreadoras ideais para atingir o sistema imunológico, pois podem ser facilmente funcionalizadas com proteínas de interesse para direcionar seu tráfego para células. Em estudos por Safina *et al.* (2021), ao validar o impacto destes 25 nanomateriais de ouro com tratamento ou não, foi observado que diferentes subconjuntos de células do sistema imunológico eram impactados com um aumento de respostas em células T reguladoras, além de aumentar as quantidades de células dendríticas CD11c+ MHC classe II+, além de diferenciar o estado de ativação e função de linfócitos T CD4+ (sobretudo com células Foxp3+) e CD8+.

Além disso, o tamanho nanométrico desempenha um papel crucial em seus efeitos 30 biológicos, mesmo para substâncias aparentemente inertes como o ouro. Não obstante, a forma dos nanomateriais influenciam a sua internalização por macrófagos, conforme observado pro Xie *et al.* (2017). Entre diferentes estruturas, como nanotriângulos, nanoestrelas e nanobastões, embora o primeiro possua maior taxa de internalização, os nanobastões possuíam endocitose mediada por caveolina além de clatrina, além de possuir outras propriedades físico-químicas 35 que permitem uma normalidade no processo de funcionalização.

## 5 1.3 O modelo animal

### 1.3.1 Modelo animal para estudos vacinais

Animais experimentais normalmente estão envolvidos em experimentos biomédicos e comportamentais ao descrever e esclarecer os mecanismos biológicos e vias metabólicas relacionados com a hipótese levantada. Como observado por Song e Hwang (2017), especificamente, animais endogâmicos (singênicos) são utilizados por pesquisadores para melhorar a confiabilidade e reprodutibilidade estatística ao serem considerados idênticos após passagem por mais de 20 gerações de reproduções controladas. Entre eles, os camundongos de laboratório são preferidos devido ao seu curto tempo de vida e facilidade de reprodução, além de possuir diversas linhagens já estabelecidas e descritas geneticamente.

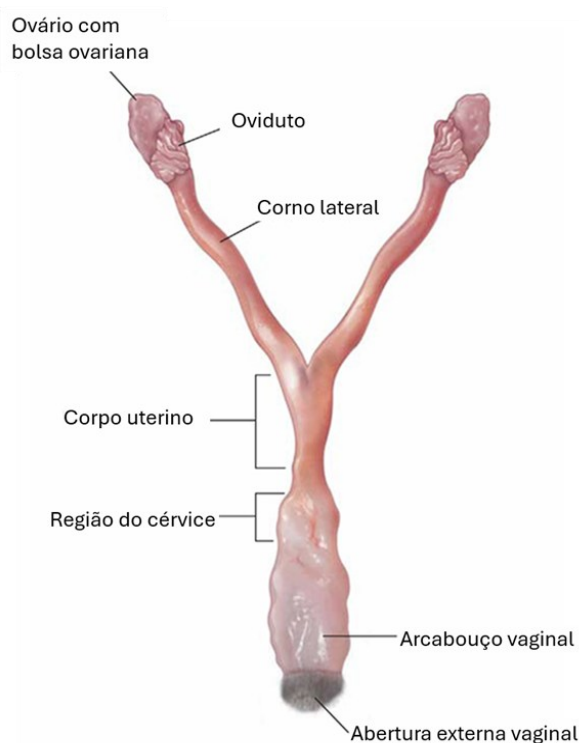
O camundongo C57BL/6 foi estabelecido na década de 1920 e tem sido amplamente utilizado como fonte genética e genérica de camundongos mutantes espontâneos ou induzidos. Estes camundongos, em particular, são notáveis por sua imunogenicidade que a princípio foram estabelecidos em estudos de imunologia e atividade antitumoral. Particularmente, em animais C57BL/6, as características imunológicas, como as relacionadas à imunidade mediada por células são relativamente mais altas do que em outros camundongos (SONG; HWANG, 2017).

### 1.3.2 Estudos de má-formação fetal em modelo murino

25

Entre alternativas viáveis para estudar os efeitos da SCZ em uma gravidez, os modelos que utilizam animais possuem ampla vantagem pela facilidade de manipulação e no acompanhamento do processo gestacional, sejam por observações nas mudanças de ciclo estral ou ganho de peso. O trato reprodutivo murino apresenta útero bicornuado (Figura 13) com mudanças de ciclos periódicos que variam entre 24-36 horas, o que possibilita sucessivas tentativas durante o período experimental. Vários aspectos dos modelos de infecção pelo ZIKV durante a gravidez assemelham-se à infecção intrauterina em humanos. As características comuns incluem tropismo do ZIKV para a placenta, evidência de infecção intrauterina e morte fetal (MINER *et al.*, 2016). Portanto, os modelos animais desenvolvidos para estudar os

- 5 resultados adversos induzidos pelo ZIKV na prole poderiam fornecer ideias sobre como este vírus impacta a viabilidade placentária e o crescimento fetal, além de efeitos adversos a longo prazo para identificar a melhor abordagem terapêutica. (NARASIMHAN *et al.*, 2020).

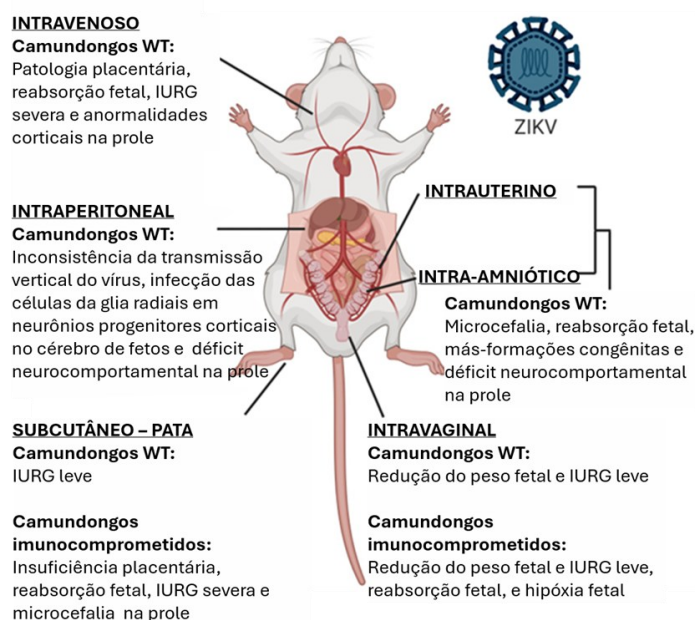


- 10 **Figura 13. Trato reprodutivo de camundongo *ex vivo*.** Imagem mostrando ovários e ovidutos pareados, útero bicornuado, cérvix vaginal e abertura vaginal externa. A melanose do fundo uterino pode ser observada em linhagens de camundongos pigmentados. Fonte: (Elsevier, Inc.; adaptado de Boyd *et al.* (2018)).

- 15 No contexto da gravidez, os tempos curtos de reprodução e as ninhadas grandes são vantajosos, enquanto a heterogeneidade nos períodos de gestação e na organização da placenta representam desafios para modelar com precisão a gravidez humana. A falta de suscetibilidade de camundongos selvagens a várias cepas asiáticas e africanas de ZIKV complica ainda mais a modelagem da doença, a depender da via de inoculação (demonstrado na Figura 14) e do estado imunológico materno. Dados de Andrade *et al.* (2021) indicam que a infecção gestacional pelo
- 20 ZIKV desencadeia respostas pró-inflamatórias específicas e afeta a renovação placentária e a função de transporte de nutrientes de maneira dependente da concentração do vírus e do estado imunológico materno. Danos à placenta podem levar a morbidade e mortalidade materna e fetal

5 grave durante a gravidez, incluindo aborto espontâneo, natimorto, parto prematuro, restrição do crescimento interno uterino (MINER *et al.*, 2016).

O uso dos animais em experimentos relacionados com ZIKV segue diversas vertentes. A infecção durante a gravidez pode causar defeitos congênitos graves, incluindo microcefalia e apresentando fenótipo patognomônico, com anomalias oculares, auditivas e musculares, coletivamente definidas como SCZ. Em estudos realizados por Camargos *et al.* (2019) foram observados anomalias durante a gestação e em nascidos infectados, onde se observou que na ocorrência da infecção congênita pelo ZIKV em adultos imunocompetentes grávidas houve um cenário de inflamação sistêmica materna (MIA), caracterizado pelos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (CCL2, CXCL-10, IL-6, and IL-17)[1], que também impactam no desenvolvimento neuronal da prole. Com o MIA também ocorre infecção placentária e morte fetal, induzindo a reabsorção fetal, fenômeno típico em gestações de modelos murinos. Em outros estudos usando uma linhagem contemporânea de ZIKV, Miner *et al.* (2016) constataram que camundongos sem capacidade de produzir ou responder ao interferon tipo I (IFN) (por exemplo, camundongos *Ifnar1<sup>-/-</sup>*) desenvolveram doença neurológica grave que foi associada a altas cargas virais no cérebro e medula espinhal com letalidade significativa.



**Figura 14. Rotas de inoculação utilizadas em modelos de camundongos com SCZ.** SCZ, síndrome congênita do Zika; RCIU, restrição de crescimento intrauterino; WT, tipo selvagem; ZIKV, vírus Zika. Figura feita em Biorender. Fonte: Adaptado de NARASIMHAN *et al.* (2020).

## 5 2. JUSTIFICATIVA

A Febre Zika foi negligenciada por décadas em função de seus sintomas normalmente brandos e do limitado número de casos em regiões acometidas. Nos últimos anos, entretanto, a rápida disseminação do ZIKV e sua ligação inesperada a malformações congênitas como as síndromes congênita do Zika e a neurológica autoimune de Guillain-Barré foram relatadas, tornando o vírus um emergente problema de saúde pública e alvo de preocupação mundial. O ZIKV é um orthoflavivírus como os vírus da dengue, da febre amarela e o vírus do Nilo Ocidental e sua estrutura é semelhante a outras estruturas de orthoflavivírus conhecidas. A proteína E de ZIKV apresenta-se como o maior componente proteico da superfície viral, e o principal alvo para a indução de uma resposta imune protetora. Até o momento não há drogas antivirais ou vacinas contra esse vírus, e a busca por vacinas eficazes e medicamentos antivirais torna-se relevante.

Nesse contexto, a nanotecnologia surge de forma atrativa e com grande potencial de utilização na biomedicina, em métodos de detecção, diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças. Os Nanobastões de Ouro (GNR) aparecem de modo especial devido a suas propriedades ópticas úteis e química de superfície simples, se ligando à superfície com mais afinidade. A ressonância plasmônica de superfície denota um princípio fundamental em que possibilita a observação de variações na superfície da partícula: em um tratamento feito corretamente, isso garante maior estabilidade à molécula aderida. Adicionalmente, os GNRs possuem baixa toxicidade quando introduzidas em sistemas biológicos.

No cenário científico dos últimos anos, a nanotecnologia tem sido associada em diversas áreas das ciências biológicas, entre elas no uso como carreadores de vacinas. Sendo recentemente proposto por nosso grupo, o desenvolvimento e caracterização de um protótipo vacinal contra o ZIKV, baseado em GNRs funcionalizados com a proteína E do ZIKV para testes de imunização e proteção em camundongos. Anteriormente, o grupo demonstrou ser possível a expressão heteróloga e purificação da proteína do envelope do ZIKV (ZIKV-E), a funcionalização de GNRs comerciais (Nanopartz) com a proteína produzida, a caracterização da vacina experimental produzida, além da avaliação da resposta imune celular e humoral, obtendo resultados satisfatórios.

Utilizando-se da experiência do grupo no desenvolvimento de plataformas diagnósticas e vacinais empregando nanomateriais funcionalizados com proteínas recombinantes, e da boa

5 performance alcançada com os dados das vacinas experimentais para o DENV e ZIKV em estudos anteriores (Versiani, 2014; Moraes, 2022). O presente trabalho, ao dar continuidade ao projeto de pesquisa de Moraes (2022), visou avançar no estudo pré-clínico de duas vacinas experimentais para ZIKV. Para tal, as vacinas experimentais foram testadas em camundongos de linhagem C57BL/6 para analisar a resposta imune celular e humoral, seguido do desafio com camundongos fêmeas da linhagem supracitada enquanto grávidas, previamente imunizadas, para verificar a transmissão placentária aos fetos quando ocorrer o desafio com o ZIKV junto dos grupos vacinais. E assim avaliar as possíveis alterações no desenvolvimento de fetos advindos de mães infectadas com ZIKV.

## 5 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivos gerais

10 Avaliar a resposta imune e a capacidade protetora de duas vacinas experimentais de subunidade recombinante contra o vírus Zika, utilizando a proteína E recombinante funcionalizada ou não a Nanobastões de Ouro.

### 3.2 Objetivos específicos

- 15
- Funcionalizar Nanobastões de Ouro comercialmente obtidos através da sua ligação com a proteína E recombinante do ZIKV (ZIKV-E) e caracterizar a funcionalidade desejada,
  - Avaliar a resposta imune celular e humoral de duas vacinas experimentais contra o ZIKV em modelo murino C57BL/6,
  - Avaliar o potencial protetor de duas vacinas experimentais contra o vírus Zika,
- 20 utilizando um modelo murino embrionário de infecção, que permita avaliar o potencial protetor destas vacinas associados à resposta do hospedeiro durante o neurodesenvolvimento pré-natal da prole.

## 5 4. METODOLOGIA

### 4.1 Células C6/36 (*Aedes albopictus*) e Vero CCL-81 (*Cercopithecus aethiops*)

As células derivadas de *Aedes albopictus* (C6/36) e as células de mamífero Vero CCL-  
10 81 derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), utilizadas neste  
trabalho, foram obtidas originalmente da organização *American Type Culture Collection*  
(ATCC, EUA).

Para a obtenção de estoques virais do vírus ZIKV (PE-243) foram utilizadas as células  
C6/36, cultivadas e mantidas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> utilizando meio Leibowitz (L-15), contendo  
15 5% de soro fetal bovino (SFB) e um coquetel dos antibióticos estreptomicina, penicilina  
potássica e anfotericina B. Essas células foram mantidas a 28°C, sendo repicadas  
semanalmente, com a monocamada celular desprendida do frasco por pipetagem vigorosa. Em  
seguida, a suspensão celular foi transferida para outro frasco estéril e adicionada a quantidade  
necessária de meio de cultura. Para a obtenção de estoque de células, garrafas confluentes foram  
20 submetidas à pipetagem como no repique, adicionados de 10% de dimetilsulfóxido (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS,  
DMSO), 90% de SFB. Em seguida, as células foram distribuídas em criotubos contendo 10<sup>7</sup>  
células e os estoques congelados em nitrogênio líquido.

Para a obtenção de estoques virais do vírus ZIKV (BR\_SJRP1840), ensaios de titulação  
do estoque viral e teste de redução de placas por neutralização (PRNT), foram utilizadas as  
25 células Vero (ATCC CCL-81), cultivadas e mantidas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> utilizando meio  
Mínimo Essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 5% de SFB e os  
antibióticos citados acima. As culturas foram incubadas em estufa de atmosfera umidificada, a  
5% de CO<sub>2</sub> e 37°C, sendo normalmente repicadas a cada 3 dias. Para os repiques, a monocamada  
celular foi previamente lavada com tampão salina fosfato (PBS 1×: 10 mM de fosfato de sódio  
30 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 2 mM de fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 140 mM de cloreto de sódio (NaCl), 3 mM  
de cloreto de potássio (KCl), pH 7,2) e, posteriormente, desprendida do frasco com o reagente  
tripsina acrescido com ácido etilenodiamino tetra-acético (tripsina-EDTA) 0,05% e  
homogeneizada. Em seguida, a suspensão celular foi transferida para outro frasco estéril e  
adicionada quantidade necessária de meio de cultura. Para a obtenção de estoque de células,  
35 garrafas confluentes foram submetidas às mesmas etapas para o repique celular, adicionados de

- 5 10% de DMSO e 90% de SFB. Em seguida os estoques foram congelados em nitrogênio líquido, com pelo menos  $10^7$  células/criotubo.

#### 4.2 Origem dos vírus e produção de estoque trabalho

10 A amostra de ZIKV isolada no Brasil (PE243/2015, número de acesso no Genbank KX197192.1, abreviado no trabalho PE-243) foi cedida pelo professor doutor Claudio Antonio Bonjardim (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG), sendo originalmente coletado de um paciente no estado de Pernambuco (Brasil) que teve sintomas clássicos da febre Zika, sem complicações neurológicas, durante o surto de 2015 (DONALD *et al.*, 2016). Este isolado é  
15 padronizado para estudos envolvendo soroneutralização e análises *in vitro*.

Para produção do estoque de trabalho, o vírus foi multiplicado em garrafas ( $75 \text{ cm}^2$ ) de células C6/36 semiconfluentes a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 com as culturas infectadas incubadas em estufa a  $28^\circ\text{C}$  por 1 hora para adsorção do vírus, com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, o inóculo de vírus foi removido, adicionados 7 mL de meio L-15  
20 contendo 2% SFB e as culturas novamente incubadas. Após 7 dias de incubação, o sobrenadante das culturas foi centrifugado em centrífuga Nuve NF 800R ( $4^\circ\text{C}$ ) a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante, clarificado, foi aliquoteado e mantido em freezer  $-80^\circ\text{C}$  para posterior titulação. Como controle, o mesmo procedimento será realizado, porém, com a adição apenas de meio de cultura, sem infecção viral (adaptado de Moraes *et al.*, 2021).

25 A amostra de ZIKV isolada no Brasil (isolado BR\_SJRP1840, número de acesso no Genbank KY441403.1), foi cedida pela professora doutora Daniele da Glória de Souza (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG). O isolado foi originalmente coletado de um paciente, submetido diretamente ao GenBank e é utilizado como controle positivo em estudos de vigilância epidemiológica em primatas não-humanos ao apresentar infecções cerebrais  
30 (TERZIAN *et al.*, 2018). Para a produção do estoque de trabalho o vírus foi multiplicado em células Vero CCL-81 conforme descrito acima.

### 5 4.3 Titulação do estoque viral

O procedimento de titulação das amostras de vírus amplificados foram feitos através do método de contagem de placas de Dulbecco (1952) com algumas modificações. Para tal, células Vero foram implantadas em placa de seis poços ( $3 \times 10^5$  células/poço) e incubadas em estufa a 37°C *overnight*. Após atingirem 90% de confluência, foram adicionados 400 µL de diluições seriadas dos vírus em 5 poços, mantendo-se um como controle negativo da infecção. Após 1 hora de adsorção, com agitação a cada 10 minutos, o inóculo viral foi removido e foi adicionado a cada poço 2,0 mL de meio DMEM (Sigma-Aldrich) semissólido, acrescido de 1% de carboximetilcelulose (CMC) (Synth, Brasil) e 1,25% de SFB, seguido de nova incubação nas condições acima. Após 6 dias, o meio foi desprezado e as células fixadas em solução formol 10% por 1 hora. Por fim, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta 1% por 30 minutos. O título do vírus é expresso pelo número de unidades formadoras de placas (PFU), obtido nos poços cuja diluição apresentou entre 30 e 300 placas de lise viral, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para PFU/mL, como demonstrado na equação (1).

20

$$\text{Título viral (PFU/mL)} = N \times FC \times 10^* \quad (1)$$

Onde N é o número de placas de lise contadas, FC é o fator de correção para mL e \* é o inverso da diluição no qual foram contadas as placas de lise.

25

### 4.4 Obtenção da proteína recombinante do Envelope do Vírus Zika (ZIKV-E)

O antígeno ZIKV-E foi anteriormente produzido conforme descrito em tese de doutorado de Moraes (2022). Em suma, o ZIKV foi isolado de uma paciente do estado da Bahia, depositado por Naccache *et al.* (2016) no GenBank, com o código de acesso KU940228.1. O gene que codifica a proteína do Envelope (E) foi códon-otimizado e truncado para a remoção da porção transmembrana e subclonado no vetor de expressão pET-24a (+) e usado para

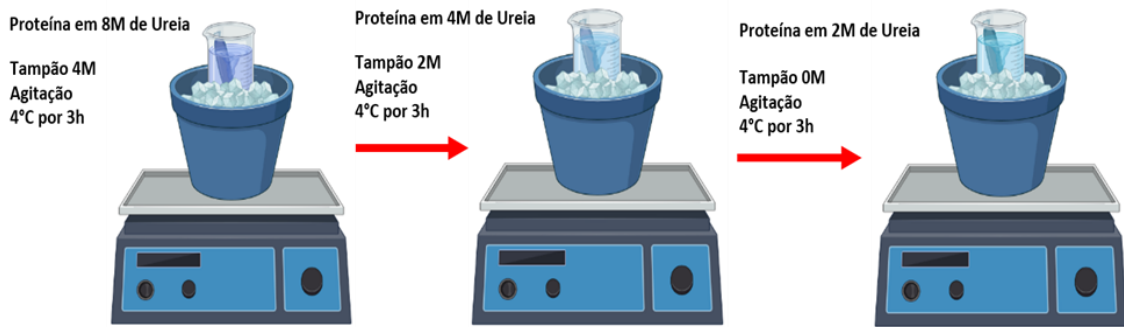
5 transformar a cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. Os clones positivos foram induzidos com 0,5 mM de  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo isopropílico (C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>S, IPTG) durante 3 h e a expressão foi examinada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). O antígeno ZIKV-E foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando colunas de níquel em sistema AKTA Prime Plus (GE Healthcare, EUA). Os experimentos foram  
10 realizados em parceria com o Centro de Tecnologia em Vacinas (CT-Vacinas) da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 4.4.1 Diálise e quantificação da proteína ZIKV-E

15 Ao final do processo de purificação, a proteína produzida foi mantida em tampão com ureia e armazenadas separadamente de acordo com o lote, a -20°C. Estando em estoque desde a data em que foi produzida por Moraes (2022), foi necessário realizar ensaios de caracterização para verificar a viabilidade da proteína produzida. Para isso, foram realizados ensaios de diálise, eletroforese e quantificação por kit comercial.

20 A proteína estava dissolvida em um tampão contendo sais de ureia e imidazol. Neste contexto, o objetivo do processo de diálise consistiu em retirar o tampão no qual a proteína se encontrava, uma vez que a ureia pode interferir nos processos de funcionalização dos nanobastões de ouro, além do seu uso ser impróprio para experimentos utilizando modelos animais pela sua toxicidade em altas concentrações (PERSAD *et al.*, 2011). Assim, a proteína  
25 foi mantida em um tubo de centrifuga revestido por membrana de diálise, submerso em um béquer onde foi realizado um processo de troca subsequente dos diferentes tampões, onde cada um deles permaneceu sob agitação constante a 4 °C por 3 horas. Ao final do processo, a proteína se encontrava em tampão fosfato-salino (PBS 1× pH 7.4). Um esquema pode ser observado na  
figura 15.

30



**Figura 15. Esquema do processo de diálise de proteína recombinante.** A proteína se mantém conservada em tampão de ureia e imidazol. Todavia, para ser utilizada em modelo animal, deve-se realizar a diálise para remover os interferentes. Figura feita com Biorender (biorender.com)

10 Com a proteína dialisada, foi realizada o ensaio de eletroforese, a fim de verificar o peso e integridade da molécula. Previamente descrita, a proteína recombinante havia cerca de 45 kDa. Os géis de poliacrilamida de 1,5 mm de espessura, corados por Comassie Blue (BioRad, EUA) são compostos por dois polímeros diferentes (acrilamida e bis acrilamida) em duas fases, superior e inferior que variam entre si na concentração dos reagentes utilizados. Os géis foram

15 preparados a partir de uma solução estoque 40% acrilamida/bis, persulfato de amônio (APS) 10%, tetrametiletilenodiamina (TEMED) e tampão tris(hidroximetil)-aminometano (tris-HCl) 1,5 M - SDS 0,4%. A fase superior, denominada gel de empilhamento, é utilizada para o alinhamento das proteínas em um mesmo nível no gel de eletroforese. Este consistiu em uma concentração final de 4 % de acrilamida/bis, 12,5% tris-HCl 0,5 M pH 6,8+ SDS, 0,5% de APS, e 0,1% TEMED. Já na fase inferior (gel de separação), as proteínas se separaram de acordo com

20 o seu peso molecular. O gel de separação foi preparado para uma concentração final de 12,5% de acrilamida/bis, 40% tris-HCl 1,5 M pH 8,8 + SDS, 0,5% de APS e 0,05% de TEMED. Foi utilizado o marcador MWSDS 70L (14 kDa - 70 kDa) (Sigma, EUA). As amostras analisadas foram aquecidas a 95°C por 10 minutos e aplicadas no gel juntamente com o tampão de amostra

25 (240 mM tris-HCl; pH 6,8; 0,8% SDS; 200 mM beta-mercaptoetanol; 4 % glicerol; 0,02 % azul de bromofenol).

Posteriormente, os géis foram colocados na cuba do kit em tampão de corrida (25 mM 15 tris-HCl; 192 mM glicina; 0,1 % SDS), e o gel foi submetido a uma voltagem de 60 V até passagem das amostras pelo gel de empilhamento sendo então aplicada a voltagem de 120 V

30 para o restante da eletroforese. Após a eletroforese, os géis foram transferidos para uma cuba

5 contendo solução corante (1% de Comassie Blue® (BioRad, EUA), 45 % de etanol e 10% de ácido acético) por 30 min e descorados com solução descorante (10% de etanol e 7% de ácido acético). Por fim, a visualização das bandas foi realizada por comparação com o padrão de peso molecular para proteínas.

10 A proteína purificada foi quantificada pelo Kit RandoxUP (Monza, Reino Unido). O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. A absorvância foi mensurada em espectrofotômetro de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 600 nm. A quantificação foi estabelecida em função do padrão fornecido pelo kit, considerando-se os resultados obtidos em cada replicata.

## 15 **4.5 Nanobastões de Ouro**

Nanobastões de ouro (GNR) certificados e purificados foram obtidos comercialmente da empresa Nanopartz™, EUA/Canada, número do lote 12G98-11479. Os GNR adquiridos comercialmente possuem alto grau de pureza e homogeneidade, com certificado de análises 20 físico-químicas, como espectroscopia de UV-visível, potencial Zeta e microscopia eletrônica de transmissão que garante a reprodutibilidade experimental.

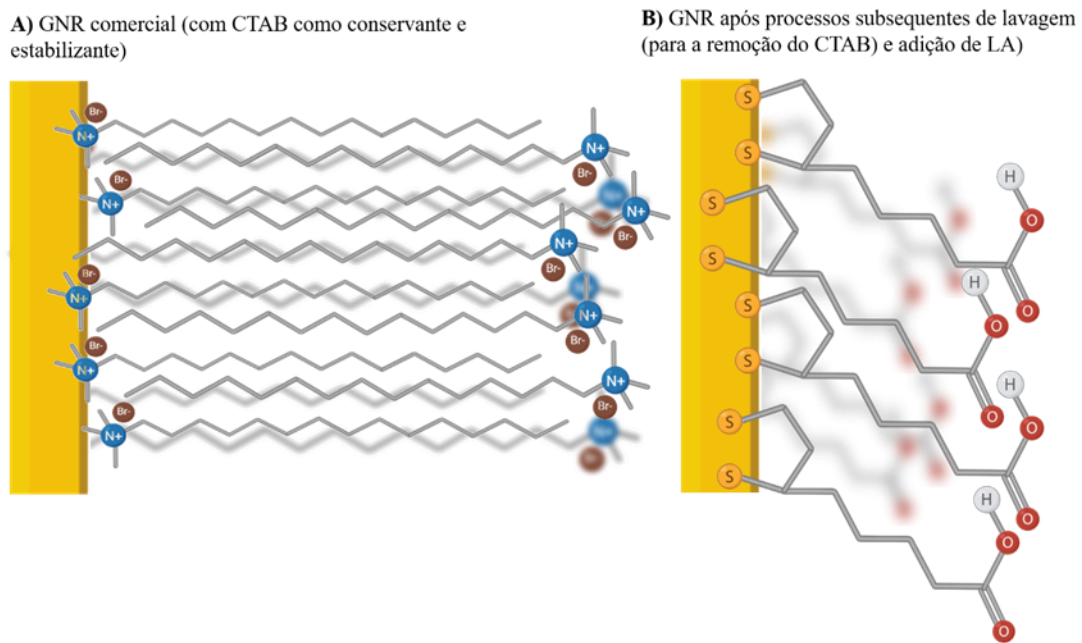
### **4.5.1 Funcionalização dos Nanobastões de Ouro (GNR)**

25 Antes dos GNR serem adicionados à solução contendo as proteínas ZIKV-E, eles devem ser previamente preparados para que a ligação ocorra de forma eficiente. Para tanto, a superfície dos GNR é primeiramente modificada com ácido  $\alpha$ -lipoico ( $C_8H_{14}O_2S_2$ , LA). Em seguida, os grupos carboxila do ácido  $\alpha$ -lipoico são ativados com cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ( $C_8H_{17}N_3$ , EDC) (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 30 estabilizados com N-hidroxissuccinimida ( $C_4H_5NO_3$ , NHS) (Thermo Fisher Scientific, EUA). Esse processo facilita a formação de ligações covalentes entre a superfície dos GNR e as proteínas, permitindo a funcionalização eficaz dos nanobastões.

5 O ácido  $\alpha$ -lipoico ou ácido lipoico é um composto naturalmente sintetizado no fígado, que atua como um importante cofator para importantes enzimas do corpo. A ligação do ácido lipoico às nanopartículas de ouro permite a interação deste composto com as moléculas biológicas e sua utilização como carreador antigênico (HAUGH *et al.*, 2011). O ácido lipoico fora utilizado, uma vez que possui uma extremidade livre com um grupamento carboxila e outra

10 extremidade composta por dois grupos tiol (-SH), como é possível observar na estrutura química representada na figura 16. Assim, o grupo tiol de uma das extremidades do reagente se liga ao ouro, enquanto o grupo carboxila (-COOH) se liga covalentemente a proteína, via EDC e NHS. Embora seja uma molécula tóxica, as posteriores lavagens e tratamentos garantem que os compostos não permaneçam em excesso até o final da funcionalização.

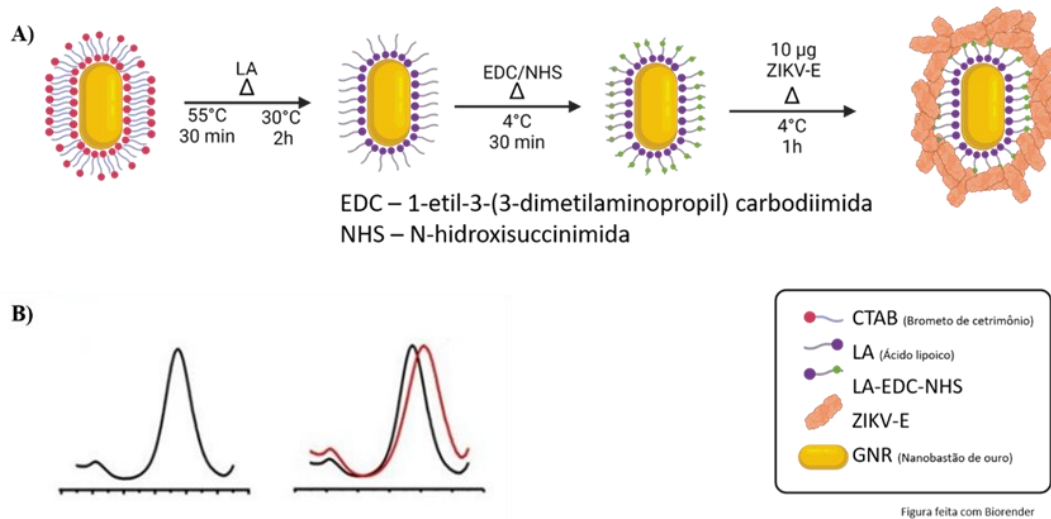
15



20 **Figura 16. (A) Estrutura química do brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e (B) ácido  $\alpha$ -lipoico (LA), ambos representados na superfície do GNR. O nanobastão utilizado vem em tampão com CTAB, um detergente forte. Para que ocorra devidamente a caracterização, um processo de lavagem deve ser realizado e, durante o procedimento, o LA é adicionado para interagir com o nanomaterial ao possuir o grupamento -tiol em uma das extremidades. Figura feita com Biorender (biorender.com).**

25 A ligação de cada um dos reagentes à superfície do GNR faz com que ocorra um deslocamento no espectro UV/Vis que permanece proporcional à observação anterior devido

5 ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície, relatado pela literatura apresentada. A metodologia proposta foi realizada segundo Versiani et al. (2020) com algumas modificações. A figura 17 demonstra de forma esquemática a metodologia de funcionalização dos GNR.



10

**Figura 17. Esquema do processo de funcionalização das Nanopartículas à proteína ZIKV-E.** (A) O CTAB presente na superfície dos nanobastões de ouro são substituídos pelo LA, cuja ligação é estabilizada com o acréscimo dos reagentes acoplante (EDC) e estabilizante (NHS), garantindo uma reação de substituição quando adicionada a proteína. (B) Alteração observada no espectro plasmônico quando os reagentes são ligados à superfície do Nanobastão, que é mensurado por seu deslocamento (espectro em vermelho). Figura feita com Biorender (biorender.com) (Adaptado de Versiani *et al.*, 2020).

A fim de verificar a quantidade ideal de LA que deverá ser adicionada à solução de GNR, foi realizada uma curva com diferentes concentrações do reagente. Para cada solução contendo 125 µL de GNR se adicionou um volume suficiente para se adequar a uma concentração final na solução entre 2 mM a 14 mM de LA. Cada tubo foi incubado por 30 min a 55°C sob ultrassonicação, para desestabilização do Brometo de cetiltrimetilamônio (C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Br, CTAB), presente na superfície das nanopartículas como tensoativo na solução provida pela empresa. Posteriormente, as nanopartículas foram transferidas para um banho térmico de 30°C por 2 horas sob ultrassonicação, para promover a ligação da funcionalidade desejada. As amostras foram posteriormente armazenadas *overnight* a 4°C para estabilização da reação.

5           Após período de incubação, os GNR funcionalizados com o LA foram submetidos à dois ciclos de centrifugação a 6000 g por 10 minutos a 20°C em uma centrífuga modelo Micro CL17R (Thermo Electron Corporation), para que fossem retirados os agentes que não se ligaram à superfície das nanopartículas. Após a centrifugação, os GNR foram redispersos no volume inicial de trabalho, em água ultrapura. Na sequência, foi adicionado uma solução  
10           contendo 0,4 M de EDC e 0,1 M de NHS, e deixados em incubação por 30 min, em banho de gelo, sob ultrassonicação.

            Por fim, após a ligação dos reagentes intermediários, 10 µg da proteína de ZIKV-E foi colocada em contato com os GNR em banho de gelo por 1 hora, sob ultrassonicação. Após o período de incubação, os GNR funcionalizados com ZIKV-E foram submetidos a dois ciclos  
15           de centrifugação a 3000 g por 10 min a 20°C, para que fossem retirados os reagentes que não se ligaram aos nanobastões além das proteínas livres. Após centrifugação, a solução foi redispersa em água ultrapura e os espectros avaliados.

#### **4.5.2 Verificação da eficiência da funcionalização**

20

            Para avaliar a eficiência da funcionalização, foram realizadas medidas de espectroscopia UV-Vis antes e depois da adição de cada um dos reagentes. Devido às propriedades ópticas dos nanobastões de ouro, a interação de moléculas com sua superfície é refletida na alteração da ressonância plasmônica observada, apresentando gráficos onde se pode avaliar o deslocamento  
25           da curva (“shift”). Para as medidas, 100 µL de cada solução foi adicionado aos poços de uma placa de 96 poços com fundo chato de quartzo (Greiner) e os espectros foram medidos em um espectrômetro de varredura UV-VIS Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, EUA) no intervalo de comprimentos de onda de 400 a 1000 nm. As absorbâncias obtidas foram convertidas em gráficos e analisadas pelo programa Origin 8.1 (Origin Lab, EUA).

30

### 5 4.5.3 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E

Após a padronização das condições ideais de funcionalização, a ferramenta construída (GNR-ZIKV-E) foi submetida à diferentes técnicas de caracterização a fim de confirmar a ligação da proteína na superfície do GNR, sendo elas:

10

• **Espectroscopia por absorbância ultravioleta-visível-infravermelho próximo (UV-VIS-NIR):** A espectroscopia foi realizada no aparelho de leitor de varredura Varioskan Flash (Thermo Scientific) em comprimentos de onda de 400-900 nm usando uma microplaca de quartzo de 96 poços. Esta técnica foi utilizada para avaliar as alterações eletrônicas na superfície do GNR e após as etapas do processo de funcionalização (GNR-LA e GNR-LA+ZIKV-E);

15

• **Análise de espalhamento dinâmico da luz e potencial zeta:** Para estas caracterizações, foram analisados 360 µL das soluções de GNR, GNR-LA e GNR-LA+ZIKV-E. O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão foram determinados utilizando a técnica de espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering - DLS). A estabilidade das dispersões foi avaliada por meio da medição do potencial zeta. Todas as análises foram realizadas utilizando o equipamento Litesizer 500 (Anton Paar, EUA).

20

• **Microscopia Eletrônica de transmissão (TEM):** A técnica foi realizada em um microscópio 120 kV FEI Technai G2-12 (Spirit BioTwin), localizado no Centro de Microscopia da UFMG. Para isso, 10 µL das amostras foram depositadas em grids de cobre, revestidos com filme ultrafino de carbono, por gotejamento, e seca overnight em estufa a vácuo, sem processamento adicional.

25

30

## 5 4.6 Avaliação da imunogenicidade da vacina experimental GNR-ZIKV-E

### 4.6.1 Estratégia de imunização

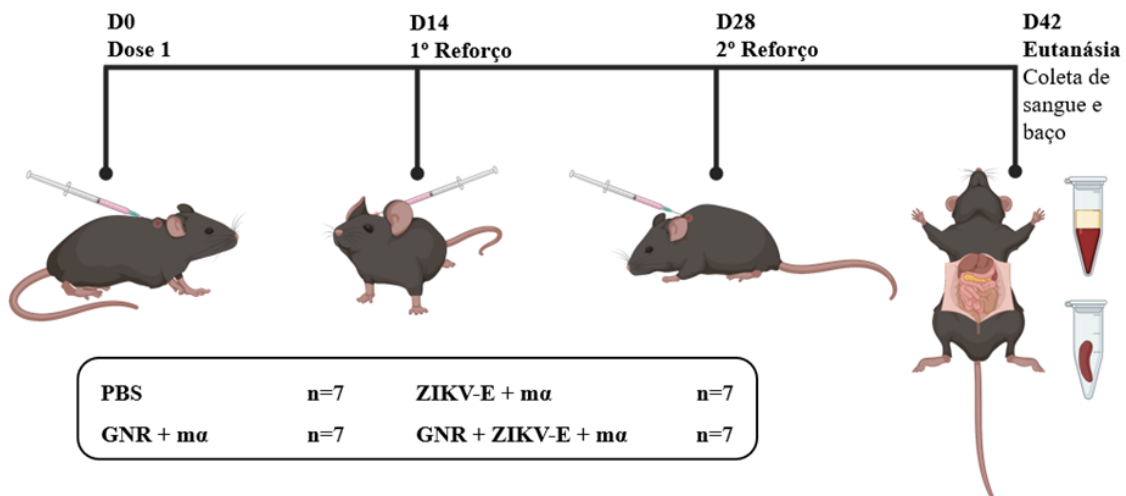
O potencial imunogênico da vacina experimental produzida (GNR-ZIKV-E) foi  
10 avaliado através da resposta imune desenvolvida por camundongos C57BL/6 fêmeas. Os  
ensaios foram realizados conforme descrito por Moraes (2022) com algumas modificações.

Neste contexto, os animais experimentais de aproximadamente 6 semanas foram obtidos  
pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), mantidos em gaiolas  
plásticas no Biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas  
15 (UFMG), devidamente manipulados e eutanasiados de acordo com as normas do Comitê de  
Ética em Uso Animal (CEUA), sob protocolo aprovado 23/2022 (ver Anexo), mantidos em sala  
com temperatura controlada, acesso *ad libitum* a água e ração e ciclo claro/escuro de 12 horas.  
A imunização seguiu um protocolo homólogo de 3 doses (dose-reforço-reforço), e os  
camundongos foram divididos em 4 grupos experimentais com 7 animais em cada (Tabela 1).

20 Cada animal recebeu por via subcutânea 50uL do composto específico de cada grupo  
acrescido dos adjuvantes lipídio monofosforil A (MPLA) (Sigma-Aldrich, EUA) combinado  
com 7DW8-5 (um análogo de  $\alpha$ -GalCer, produzido e descrito em Li *et al.* (2010), cedido pela  
professora Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis), visto que no trabalho de Moraes (2022)  
a combinação dos compostos possibilitou uma melhor indução de resposta imune. O intervalo  
25 entre as doses foi de 14 dias, onde, no 14º dia após a terceira imunização, os animais foram  
anestesiados com injeção intraperitoneal de solução cetamina/xilazina, com o sangue coletado  
pelo plexo braquial seguida da eutanásia por deslocamento cervical para remoção do baço. Para  
avaliação da resposta imune celular foi realizada a Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas  
(ICS) produzidas pelos esplenócitos estimulados com a proteína ZIKV-E. A resposta imune  
30 humoral foi avaliada através da técnica de ELISA e PRNT. Um esquema metodológico pode  
ser visto na figura 18.

5 Tabela 1. Grupos experimentais utilizados para avaliação da Imunogenicidade

Grupo experimental	Nome do grupo experimental	Soluções protocolo de imunização
1	PBS	Solução Salina (PBS 1X)
2	ZIKV-E + $\alpha$	10 $\mu$ g de ZIKV-E purificada acrescida de 4 $\mu$ g de MPLA e 2 $\mu$ g de 7DW8-5
3	GNR + $\alpha$	10 $\mu$ g de GNR purificados acrescidos de 4 $\mu$ g de MPLA e 2 $\mu$ g de 7DW8-5
4	ZIKV-E + GNR + $\alpha$	10 $\mu$ g de ZIKV-E e 10 $\mu$ g de GNR purificados acrescidos de 4 $\mu$ g de MPLA e 2 $\mu$ g de 7DW8-5



10 **Figura 18. Esquema de vacinação em camundongos C57BL/6.** A fim de verificar a imunogenicidade do candidato vacinal, grupos experimentais foram delimitados em 7 animais em cada, contendo grupos como: um grupo com PBS; outro somente com a proteína recombinante ZIKV-E; um terceiro somente com o GNR e; um último com o uso do nanocarreador com a proteína. Os grupos com soluções distintas de PBS foram acrescidos de MPLA e 7DW8-5. Figura feita com Biorender (biorender.com).

15

#### 4.6.2 Avaliação da Resposta Imune Celular

5 A avaliação da resposta imune celular desenvolvida por camundongos C57BL/6 após  
estimulação com ZIKV-E foi realizada conforme descrito por Moraes (2022). Quatorze dias  
após a última imunização, os animais foram eutanasiados e o baço de cada animal extraído e  
armazenado em tubos de 50mL contendo 5mL de meio *Roswell Park Memorial Institute*  
(RPMI) 1640 (Gibco, Thermo Fisher, EUA) completo suplementado com aminoácidos não  
10 essenciais, L-glutamina, e um coquetel dos antibióticos penicilina potássica, estreptomicina e  
anfotericina B. Na sequência, os baços foram transferidos para uma placa de 6 poços com uma  
solução PBS (pH 7,4) e macerados com o auxílio do êmbolo de uma seringa de 3mL para a  
obtenção de um macerado celular homogêneo. Posteriormente, a solução macerada foi filtrada  
em filtro de cultura de células *Cell Strainer* e as células sedimentadas em centrífuga Nüve NF  
15 800R (Nüve, Turquia) a 1350 rpm, 20°C por 5 min. Foram adicionados 5mL de tampão de lise  
de eritrócitos, ACK (NH<sub>4</sub>Cl, EDTA, NaHCO<sub>3</sub>) (Gibco, Thermo Fisher, EUA) ao sedimento  
celular resultante da centrifugação e mantido em contato com as células por 5 min; a reação de  
lise foi parada com a adição de 20 mL de PBS. Novamente, as células foram sedimentadas a  
1350 rpm, 20°C por 5 min e o sobrenadante, descartado.

20 As células sedimentadas foram ressuspensas em meio RPMI 1640 completo 20% SFB  
para a concentração final de 10<sup>7</sup> células/mL e posteriormente transferidas para placas de cultura  
de 96 poços com fundo em “U” na concentração final de 10<sup>6</sup> células/poço. As células foram  
estimuladas com 10 µg/mL de ZIKV-E e incubadas em estufa a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> por 1 h e  
30min. Em paralelo, foram incluídos no ensaio o controle positivo do experimento (células  
25 estimuladas com ConA) e controles negativos (células não estimuladas e células não  
estimuladas utilizadas para compensação do aparelho).

Após período de estimulação, foi adicionado às células 20 µL/poço de RPMI contendo  
Brefeldina na concentração final de 5 µg/poço. Ainda, na placa referente ao painel de ativação,  
as células foram marcadas com FITC Rat Anti-Mouse CD107a Clone 1D4B (RUO) (BD,  
30 EUA), na diluição 1:100. A placa foi novamente incubada por mais 5h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, e  
posteriormente armazenadas a 4 °C *overnight*.

No dia seguinte, as células foram centrifugadas em centrífuga NUVE em 1500 rpm,  
20°C por 5 min, e o sobrenadante foi descartado. Para lavagem, foi adicionado solução PBS e  
as células submetidas a uma nova centrifugação, com o sobrenadante sendo novamente  
35 descartado. Na sequência, as células foram marcadas com LIVE/DEAD Aqua Cell Strain  
(Invitrogen, Thermo Fisher, EUA), 20 µL/poço na diluição 1:20000. As células foram

5 incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, posteriormente foi adicionado 200  $\mu$ L de PBS e a placa foi novamente submetidas à centrifugação. Posteriormente foram adicionadas às placas solução de Bloqueio (PBS, 1 % BSA, 2 % soro de camundongo naive). As placas foram incubadas por 5 min e submetidas a um novo ciclo de centrifugação.

As células foram marcadas com anticorpos intra e extracelulares seguindo os painéis  
10 avaliados. Para as células marcadas na placa referente ao painel de ativação, foram utilizados os seguintes anticorpos marcados com fluorocromo: V450 Rat Anti-Mouse CD3 Clone 17A2 (RUO) (BD, EUA), diluição 1:100; Alexa Fluor 700 Rat Anti-Mouse CD4 Clone RM4-5 (RUO) (BD, EUA), diluição 1:100; PerCP Rat Anti-Mouse CD8a Clone 53-6.7 (RUO) (Biolegend, EUA), diluição 1:100 e PE Mouse Anti-Mouse I-A[b] Clone AF6-120.1 (RUO)  
15 (BD, EUA), diluição 1:200.

Para as células marcadas na placa referente ao painel de memória, foram utilizados os seguintes anticorpos marcados com fluorocromo: V450 Rat Anti-Mouse CD3 Clone 17A2 (RUO) (BD,EUA), diluição 1:100; FITC Rat Anti-Mouse CD4 Clone GK1.5 (RUO) (BD, EUA), diluição 1:50; PE-Cy 5 Rat Anti-Mouse CD44 Clone IM7 (RUO) (BD, EUA), diluição  
20 1:100; PE Rat Anti-Mouse CD62L Clone MEL-14 (RUO) (BD, EUA), diluição 1:100 e Alexa Fluor 700 Rat Anti-Mouse CD8a Clone 53-6.7 (RUO) (Biolegend, EUA), diluição 1:150.

A mistura de anticorpos foi reunida e diluída em PBS, 1 % BSA, adicionadas às células sendo incubadas por 30 min a 4°C para cada placa preparada. Após a incubação com os anticorpos de superfície, as placas foram lavadas com solução PBS, 1% de BSA e novamente  
25 centrifugadas. Posteriormente, foi adicionada uma solução de fixação (PBS, 1 % de Paraformaldeído) e as placas foram incubadas a 4°C por 20 min. Após a fixação, foi adicionado solução PBS 1 % de BSA e as placas foram novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e foi adicionada a solução de permeabilização (PBS, 1% BSA, 0,1% Saponina). As placas foram novamente incubadas a 4°C por 20 min, e posteriormente centrifugadas nas  
30 condições anteriormente citadas. Novamente, foram adicionadas às placas a solução de bloqueio (PBS, 1% BSA, 2% soro de camundongo naive), seguida por nova incubação a 4°C por 5 minutos e submetidas a um novo ciclo de centrifugação. As células foram marcadas com anticorpos intracelulares, sendo adicionado à placa referente ao painel de ativação APC Rat Anti-Mouse IFN- $\gamma$  Clone XMG1.2 (RUO) (Biolegend, EUA), na diluição 1:100. Na placa  
35 referente ao painel de memória, foram adicionados PE-Cy 7 Rat Anti-Mouse TNF Clone MP6-XT22 (RUO) (BD, EUA), diluição 1:250 e APC Rat Anti-Mouse IFN- $\gamma$  Clone XMG1.2 (RUO)

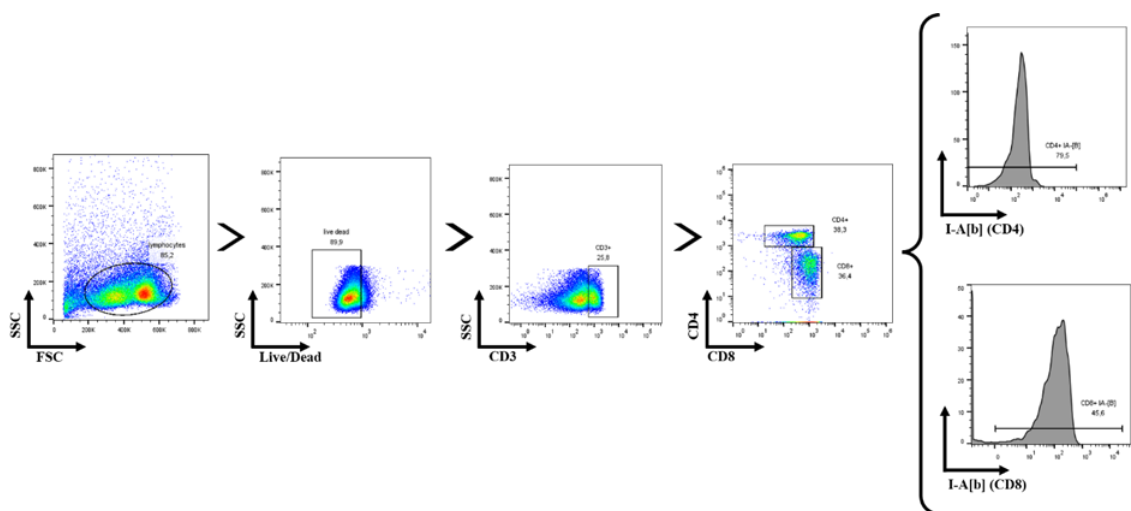
5 (Biolegend, EUA), diluição 1:100. Os anticorpos foram diluídos em PBS 1% BSA, 50  $\mu$ L da solução contendo os anticorpos foram adicionadas nos poços e as placas incubadas por 30 min a 4°C. As placas foram lavadas com 200  $\mu$ L/poço de solução (PBS 1% BSA) e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos.

10 Por fim, as células foram ressuspensas em PBS 1% BSA para a aquisição em citômetro de fluxo DXflex (Beckman Coulter, EUA). As análises foram realizadas utilizando o programa FlowJo (Tree Star Inc., EUA). Os gráficos e dados estatísticos foram posteriormente analisados pelo programa GraphPad Prism 8.

#### 4.6.3 Estratégias de Avaliação da Resposta Imune Celular por Citometria de Fluxo

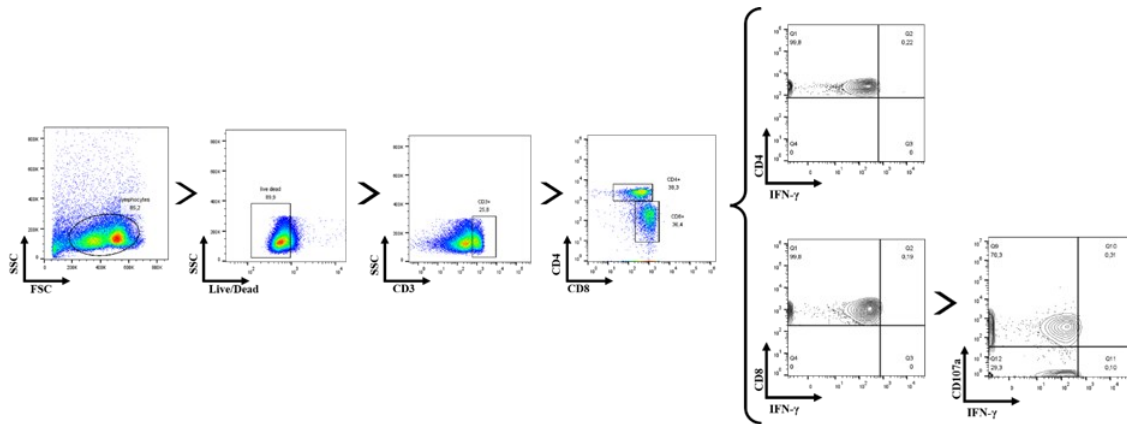
15

As análises de resposta imune celular dos camundongos imunizados foram realizadas utilizando o programa FlowJo e as estratégias utilizadas estão ilustradas nas figuras seguintes, que representam um único animal do grupo do candidato vacinal GNR+ZIKV-E (G4A3-E). A princípio, foram selecionados os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressam o marcador precoce de ativação de linfócitos I-A[b] (figura 19). As células do baço dos animais imunizados também foram avaliadas para a produção de IFN- $\gamma$ . Para tal, foram avaliados linfócitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup>, na produção de IFN- $\gamma$  após estimulação (figura 20).



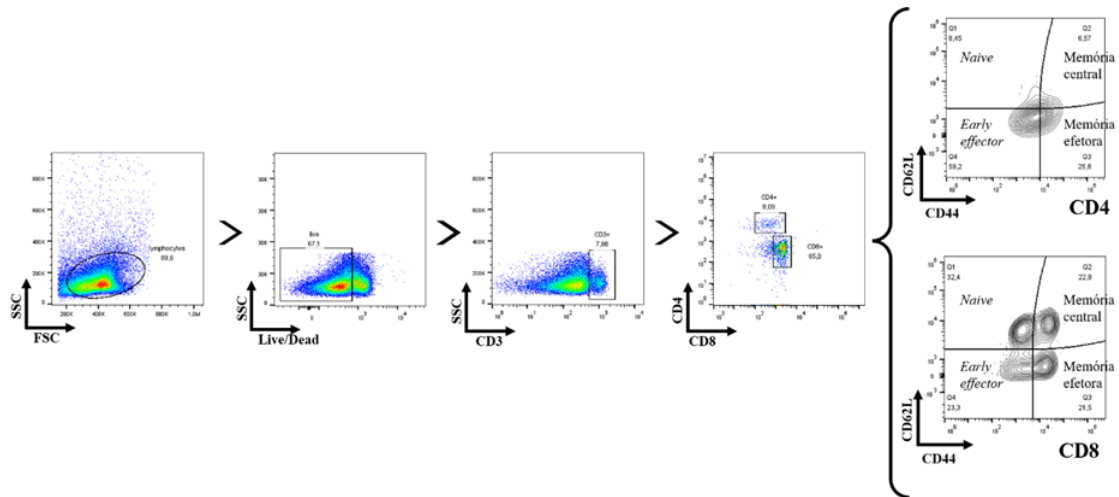
- 5 **Figura 19. Estratégia de *gate* do painel de ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ com expressão de I-A[b] de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E.** As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC × SSC; na sequência, os linfócitos foram selecionados por *Live/Dead* × SSC; em seguida, as células T foram selecionadas por CD3 × SSC, seguido por CD8 × CD4. Por fim, células T CD4+ e CD8+ foram avaliadas para a expressão de I-A[b].

10



- 15 **Figura 20. Estratégia de *gate* para avaliação da capacidade dos linfócitos T produzirem de IFN- $\gamma$  após estimulação com ZIKV-E.** As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC × SSC; na sequência, os linfócitos foram selecionados por *Live/Dead* × SSC; em seguida, as células T foram selecionadas por CD3 × SSC, seguido por CD8 × CD4. Células T CD4+, CD8+ e células TCD8+ CD107a+ foram avaliadas para expressão de IFN- $\gamma$ .

20 Em seguida, foram avaliadas as porcentagens de subconjuntos de células T que expressam marcadores de memória (CD44 e CD62L). Os subconjuntos de células T CD44- CD62L-, CD44- CD62L+, CD44+ CD62L+ e CD44+ CD62L- foram definidos como células de memória *early effector*, *naive*, células de memória central e células de memória efetora, respectivamente, demonstrados na figura 21.



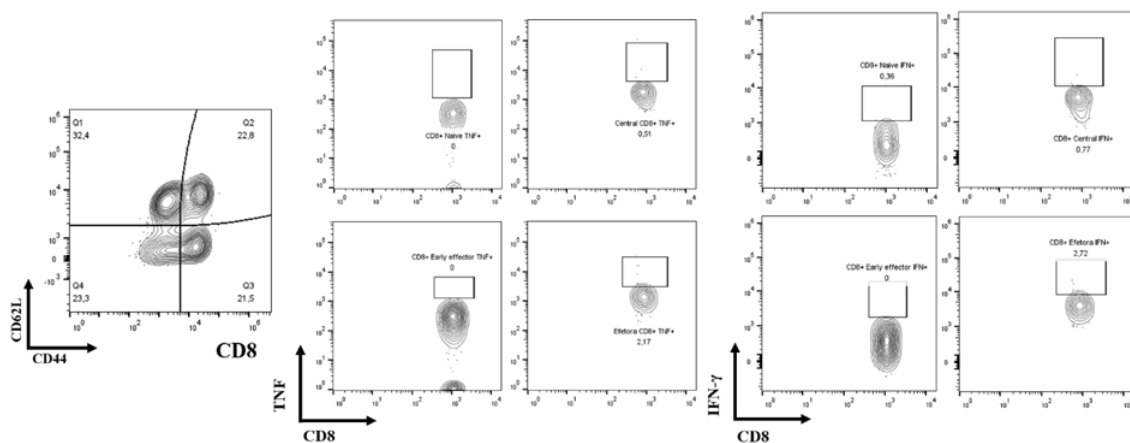
5

**Figura 21. Estratégia de *gate* para avaliação do fenótipo de memória de células T de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E.** As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC  $\times$  SSC; na sequência, os linfócitos foram selecionados por *Live/Dead*  $\times$  SSC; em seguida, as células T foram selecionadas por CD3  $\times$  SSC, seguido por CD8  $\times$  CD4. O conjunto de células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> foram avaliadas para expressão de CD62L  $\times$  CD44, assinalados como informado anteriormente entre células de memória *early effector*, *naive*, células de memória central e células de memória efetora.

10

15

Por fim, as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> previamente descritos foram avaliadas pela expressão de TNF e IFN- $\gamma$  separadamente, conforme representados na figura 22.



20

**Figura 22. Estratégia de avaliação da capacidade de secreção de TNF e IFN- $\gamma$  por células T de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E.** As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC  $\times$  SSC; na sequência, os linfócitos foram selecionados por *Live/Dead*  $\times$  SSC; em seguida, as células T foram selecionadas por CD3  $\times$  SSC, seguido por CD8  $\times$  CD4. O conjunto de células

- 5 T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> foram avaliadas para expressão de CD62L × CD44, assinalados como informado anteriormente entre células de memória *early effector*, *naive*, células de memória central e células de memória efetora. Por fim, as subpopulações definidas foram individualmente selecionadas para a avaliação da capacidade secreção de TNF e IFN- $\gamma$ .

#### 10 4.6.4 Avaliação da Resposta Imune Humoral por Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto (ELISA)

Os níveis de anticorpos específicos contra a proteína ZIKV-E produzidos pelos camundongos imunizados foram avaliados através do ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA), o qual apresenta grande especificidade e sensibilidade. O ensaio foi realizado conforme descrito por Bagno *et al.*, (2020) com algumas modificações.

Placas de poliestireno *high binding* de 96 poços foram sensibilizadas com a proteína ZIKV-E diluída em tampão carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,16%, NaHCO<sub>3</sub> 0,24% e pH 9,6), as quais permaneceram incubadas a 4°C *overnight*, para fixação das proteínas na superfície do poço. Após a sensibilização as placas foram lavadas com solução PBS-T (PBS 1× + 0,05% de Monolaurato de polietilenoglicol sorbitano (Tween 20)) por 4 vezes. Em seguida, foi realizada a adição da solução de bloqueio (leite em pó 5 %, dissolvido em PBS) para impedir ligações não-específicas dos anticorpos. As placas contendo solução de bloqueio foram mantidas por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas por 4 vezes com PBS-T. Posteriormente, foram adicionados os soros dos animais (diluídos 1:100) em solução de PBS-T + 0,5 % leite em pó, seguido por uma nova incubação por mais 1 h a 37°C. Em seguida, as placas foram novamente lavadas 4 vezes com solução PBS-T para adição do anticorpo secundário Goat anti-mouse IgG H+L HRP (Novus, diluição 1:5000) conjugado à enzima peroxidase. As placas foram novamente incubadas por 1 h a 37 °C com posterior lavagem.

Nas etapas finais de revelação, foi aplicado 100  $\mu$ L/poço do reagente de visualização tetrametilbenzidina (TMB – Scienco, Brasil), e as placas foram incubadas ao abrigo de luz por 25 min, onde a mudança de cor indicava a presença de anticorpos capazes de se ligar à proteína ZIKV-E e a intensidade se relaciona diretamente com a quantidade de antígeno conjugado. Por fim, a reação foi parada com solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,5 M (100  $\mu$ L/poço) e a absorvância medida em espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda 450 nm no

5 aparelho Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific). Os gráficos e dados estatísticos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 8.

#### 4.6.5 Avaliação da Resposta Imune Humoral por Teste de redução de placas por neutralização (PRNT)

10

O teste de redução de placas por neutralização (PRNT), ou ensaio de soroneutralização, tem o objetivo de analisar os níveis de anticorpos neutralizantes contra o ZIKV produzidos pelos animais imunizados.

15 O ensaio foi realizado conforme descrito por Moraes (2022), com algumas modificações. Para tal, foram utilizadas células Vero ( $7,5 \times 10^4$  células/poço), previamente distribuídas em placas de 24 poços e incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  *overnight*, para que as células possam alcançar confluência de 80%. Posteriormente, as amostras de soro dos camundongos foram diluídas nas concentrações de 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160 e colocadas em contato com 70 PFU (unidades formadoras de placa) de ZIKV. A mistura (vírus e soro) foi  
20 incubada por uma hora à  $37^\circ\text{C}$  para que a reação de neutralização possa acontecer e, após esse tempo, 100  $\mu\text{L}$  dessa mistura foi adicionada à cultura celular e deixada por 1 hora, para que a reação de adsorção da mistura com os receptores celulares seja realizada. Em paralelo, a mesma quantidade de vírus foi adicionada em meio sem SFB e sem adição de soro, mantida como controle negativo. Ainda, foi realizado controle de célula. Após esse período, a mistura foi  
25 retirada das placas e adicionado meio DMEM acrescido de 1,25% de SFB e 1% de carboximetilcelulose (CMC). As placas foram novamente incubadas a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  por 5 dias. Após 5 dias, o meio foi desprezado e as células fixadas em solução formol 10% por 60 minutos. Por fim, a monocamada fixada foi corada com solução de cristal violeta 1% por 30 minutos.

30 O índice  $\text{PRNT}_{70}$  foi determinado como a maior diluição do soro capaz de neutralizar 70% dos vírus, detectada pela inibição da formação das placas nas culturas celulares. Os gráficos e dados estatísticos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 8.

## 5 4.7 Desafio com ZIKV

O potencial protetor das vacinas experimentais composta pela proteína recombinante (ZIKV-E) foi avaliado através da resposta imune desenvolvida por camundongos fêmeas de linhagem C57BL/6 após o protocolo de imunização anteriormente descrito. Os procedimentos experimentais foram realizados em colaboração com a professora dra. Daniele da Glória de Souza. Para tal, os animais experimentais foram devidamente manipulados e eutanasiados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA), sob protocolo aprovado 168/2022 (ver Anexo). A imunização seguiu um protocolo de dose-reforço-reforço e os camundongos foram divididos em 5 grupos experimentais, conforme descrito na Tabela 2. Os grupos experimentais foram selecionados para validar as hipóteses levantadas, como a capacidade protetiva da vacina, a capacidade do ZIKV utilizado causar a perda da viabilidade da prole e um grupo sem desafio nem composto vacinal para verificar se a porcentagem da viabilidade dos animais experimentais seguiam o que a literatura aponta (MURRAY *et al.*, 2010).

20

25

5 Tabela 2. Grupos experimentais utilizados para avaliação do potencial de proteção das vacinas experimentais

Grupo experimental (n°)	Nome do grupo experimental	Soluções protocolo de imunização
1	PBS/ NI	Solução Salina (PBS 1X)
2	PBS/ ZIKV	Solução Salina (PBS 1X)
3	ZIKV-E + $\alpha$ / ZIKV	10 $\mu$ g de ZIKV-E purificada acrescida de 4 $\mu$ g de MPLA e 2 $\mu$ g de 7DW8-5
4	GNR + $\alpha$ / ZIKV	10 $\mu$ g de GNR purificados acrescidos de 4 $\mu$ g de MPLA e 2 $\mu$ g de 7DW8-5
5	GNR + ZIKV-E + $\alpha$ / ZIKV	10 $\mu$ g de ZIKV-E e 10 $\mu$ g de GNR purificados acrescidos de 4 $\mu$ g de MPLA e 2 $\mu$ g de 7DW8-5

Cada animal recebeu por via subcutânea 50  $\mu$ L do composto específico de cada grupo.

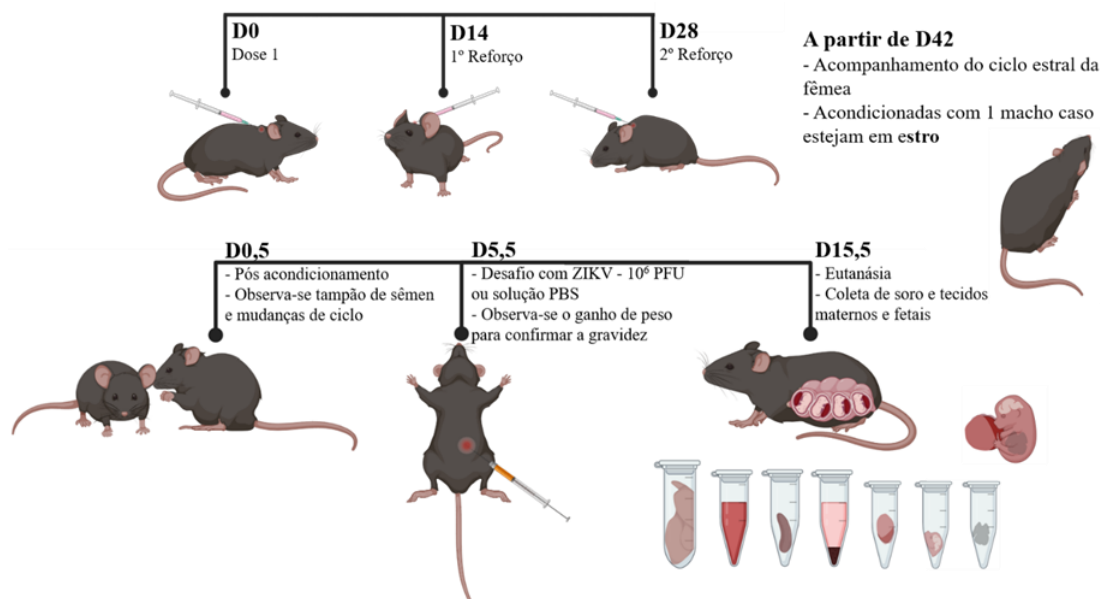
10 O intervalo entre as doses foi de 14 dias (conforme descrito no item 4.2). Na sequência, o período fértil das fêmeas foi avaliado por acompanhamento do ciclo estral através de observações diárias, para assim determinar a data exata da fecundação durante os acasalamentos, baseado em metodologia de Byers *et al.* (2012). Para a obtenção dos embriões com 15 dias (D15) de gestação, casais (proporção de um macho para cada fêmea nas fases proestrals ou estrals do ciclo) de camundongos foram acondicionados em uma mesma caixa *overnight*. Posteriormente, foi verificada a presença da formação do plug vaginal que se forma com fluidos seminais, além da observação diária da mudança do ciclo estral.

Na sequência, as fêmeas consideradas grávidas foram inoculadas no dia D05 com  $10^6$  PFU/animal através da administração intraperitoneal de um isolado clínico do ZIKV (BR\_SJRP1840). A infecção no dia D05 teve como objetivo estabelecer um modelo clinicamente relevante para estudo de reabsorção fetal e das alterações teratogênicas em prole advindas de fêmeas infectadas. Os camundongos controle negativo (grupo 1) foram inoculados com apenas solução de PBS.

5 No dia D15 de gestação, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal. A figura 23 apresenta um esquema da metodologia do desafio com os animais. Foi realizada ovariectomia nos animais e o sangue periférico coletado através da via do plexo braquial. A eutanásia foi realizada por meio de sobredose de anestésico seguido de deslocamento cervical, assim como recomendado pelas

10 normas do comitê vigente. Então, o útero foi removido e os embriões retirados e analisados pelo número de fetos viáveis e reabsorvidos, sendo extraídos os tecidos (placenta, cérebro e fígado) que, juntamente com os tecidos da fêmea (baço, fígado e plasma) foram submetidos a diferentes análises que incluíram parâmetros como análises morfológicas (tamanho, peso, porcentagem de reabsorção, diâmetro temporal e razão crânio-cauda).

15

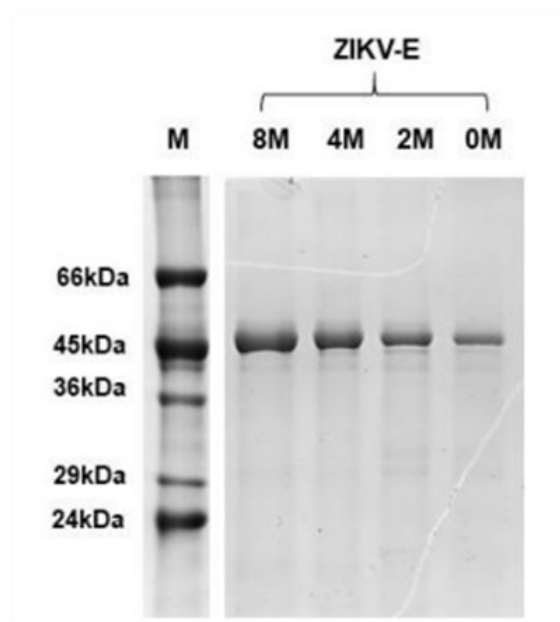


20 **Figura 23. Esquematização de desafio com ZIKV em camundongos fêmeas prenhes de linhagem C57BL/6.** Após o período de imunização dos animais (28 dias) o ciclo estral do animal foi registrado periodicamente para que fosse possível o acondicionamento. Figura feita com Biorender (biorender.com)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e caracterização da proteína recombinante ZIKV-E

A proteína ZIKV-E, como previamente informado neste trabalho, é uma proteína recombinante. Descrita detalhadamente a princípio em Bagno (2018), foi produzida em sistema heterólogo, procarioto, para o uso em ferramentas diagnósticas. Posteriormente, a proteína foi produzida em novo lote e caracterizada para o uso em candidatos vacinais, assim detalhado em Moraes (2022). Neste trabalho, como o objetivo foi de avaliar o candidato vacinal frente a um desafio, o ZIKV-E utilizado foi o de mesmo lote produzido, mantido em tampão de estoque contendo sais de ureia e imidazol. Após o processo de diálise, descrito no item 4.3.1 da sessão Metodologia, avaliou-se a integridade da molécula. A figura 24 representa a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).



20 **Figura 24. SDS-Page de ZIKV-E após o processo de diálise.** Onde, M= Marcador de peso molecular, ZIKV-E = Fração de ZIKV-E coletada após a passagem da proteína ZIKV-E pelos tampões 8M, 4M, 2M e 0M de ureia. Fonte: (MORAES, 2022).

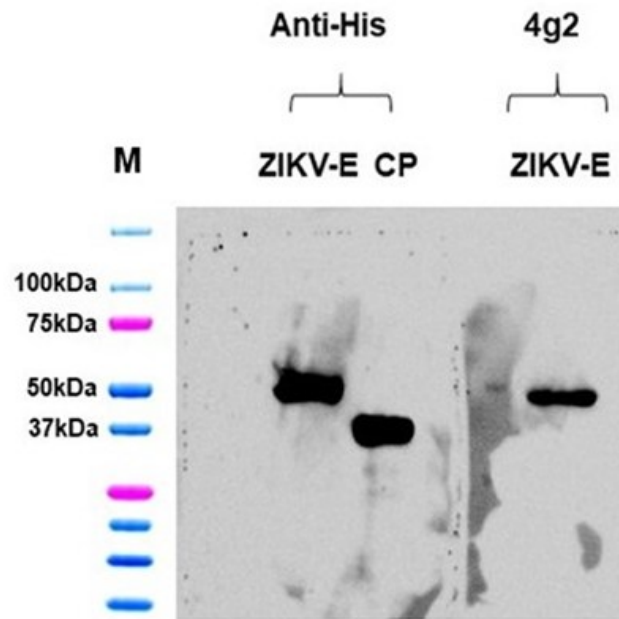
5 Como observado, a proteína mantém o mesmo peso molecular após o processo de  
 diálise, possuindo cerca de 45 kDa. Diante do dado, a fim de verificar a concentração da  
 proteína armazenada, foram realizados ensaios de quantificação por kit comercial RandoxUP.  
 O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, com absorvância  
 mensurada em espectrofotômetro Multiskan GO. Os valores calculados da concentração final  
 10 são observados na tabela 4.

**Tabela 3. Valores da concentração de proteína quantificados em kit RandoxUP**

Ponto	Absorvância	Valor ajustado	[ ] proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Branco	0,073	0	0,00
Padrão	0,169	0,096	0,98
<b>ZIKV-E</b>	<b>0,145</b>	<b>0,072</b>	<b><u>0,74</u></b>

15 Com os valores calculados, se observou uma concentração de  $0,74 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de ZIKV-E  
 no estoque. O valor, posteriormente, será necessário para o cálculo da formulação vacinal dos  
 grupos imunizados com a proteína.

A antigenicidade da proteína foi verificada por Moraes (2022) onde dois anticorpos,  
 sendo um comercial específico para a região C-terminal com uma cadeia de histidina (Anti-  
 His) e outro anticorpo monoclonal específico para orthoflavivírus (4G2). Como observado, o  
 20 ZIKV-E mostrou-se capaz de ser reconhecida por ambos os anticorpos (figura 25).



5

**Figura 25. Western-blot mostrando a reação entre a proteína ZIKV-E e os anticorpos comerciais Anti-His e 4G2.** Onde M= Marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad) corado com Luminata (Millipore), CP = Proteína de CHIKV-E utilizada como controle positivo do experimento. Fonte: (MORAES, 2022).

10

## 5.2 Funcionalização dos Nanobastões de Ouro (GNR)

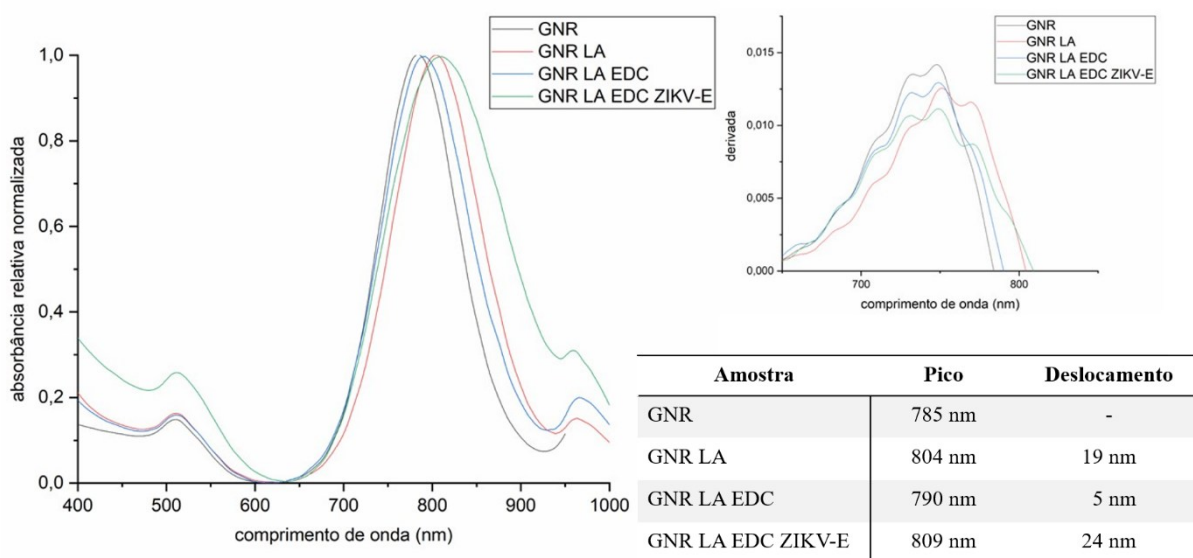
No processo de funcionalização, o primeiro passo consistiu na substituição do agente estabilizante (CTAB) pelo ácido lipoico (LA) na superfície dos nanobastões, a fim de que exista um grupo carboxila ao qual a proteína irá ligar. Para que fosse padronizado, uma curva de concentração foi feita, em um intervalo de 2 a 14 mM de LA, com o valor entre 10 e 12 mM sendo o mais adequado, onde não ocorria uma mudança no perfil de leitura do nanomaterial. Para isso, uma curva de concentração entre 10 e 12 mM foi feita para verificar qual o melhor ponto, concluindo que o valor de 10 mM de LA a cada 125  $\mu$ L de GNR. Cada tubo foi incubado por 30 minutos a 55 °C sob ultrassonicação para desestabilizar o CTAB e depois, para promover a ligação do LA, permaneceu em ultrassonicação por 2 horas em banho térmico a 30 °C. Por fim, as amostras foram armazenada *overnight* a 4 °C para estabilização da reação.

15

20

5 Após o período de incubação, os GNR funcionalizados foram submetidos a centrifugações para retirar os agentes que não ligaram à superfície do nanobastão, sendo redispersos em água ultrapura. Posteriormente, foi adicionado uma solução com 0,4 M de EDC e 0,1 M de NHS e mantidos em banho de gelo, por 30 minutos, sob ultrassonicação.

10 Após todo o processo de ligação dos agentes intermediários, foram adicionados 10  $\mu$ g da proteína ZIKV-E em cada tudo, mantidos em banho de gelo por 1 hora, sob ultrassonicação. Após o período de incubação, os GNR funcionalizados com ZIKV-E foram submetidos a centrifugações para retirar os agentes que não ligaram à superfície do nanobastão e posteriormente redispersos em água ultrapura. Diante de cada etapa, cada processo teve seu espectro avaliado no espectrofotômetro Multiskan GO. A representação gráfica pode ser  
15 observada na figura 26, sendo dados obtidos e analisados no software Origin (OriginLab, EUA).



20 **Figura 26. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR em diferentes etapas da funcionalização com ZIKV-E.** Absorbância relativa normalizada (esquerda); análise gráfica da primeira derivada para calcular o deslocamento do pico de absorvância (direita, acima) com valores apresentados em tabela (direita, abaixo). Onde: UV-Vis = região do espectro ultravioleta-visível; GNR= nanobastão de ouro; GNR LA = Amostra de GNR após etapas de ultrassonicação com LA; GNR LA EDC = Amostra de GNR após etapas de ultrassonicação com solução contendo EDC e NHS; GNR LA EDC ZIKV-E = Amostras de GNR após etapas de ultrassonicação com a proteína ZIKV-E adicionada  
25 no tubo.

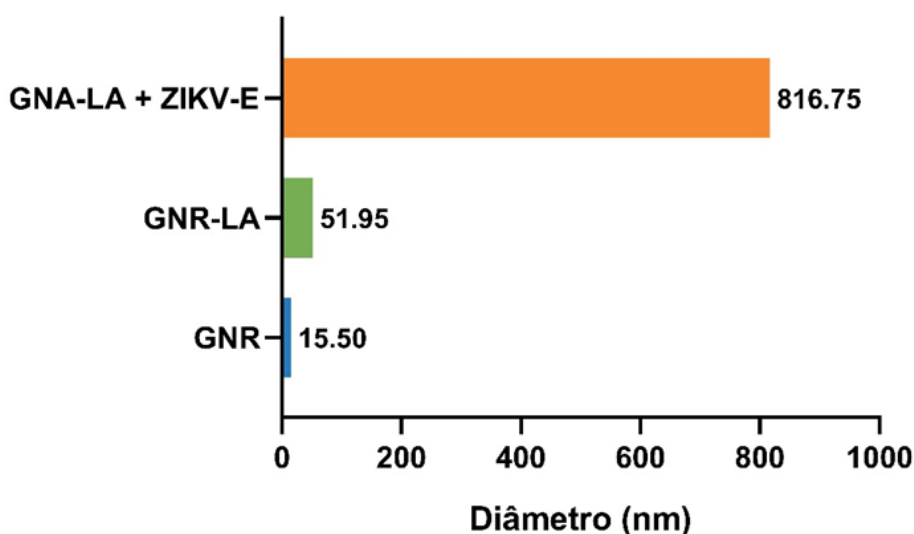
5 Com o protocolo previamente estabelecido em trabalhos anteriores (Versiani, 2020; Moraes, 2022), se observou que a mudança do aumento seguido da queda da temperatura do banho ultrassônico favorece a mudança de CTAB para LA na superfície dos nanobastões. Na sequência, a adição dos agentes acoplante (EDC) e estabilizante (NHS), seguida da adição da proteína recombinante (ZIKV-E), fez-se a leitura do espectro UV-Vis, onde seria possível  
10 inferir se houve ou não a ligação na superfície dos nanobastões através do deslocamento (*shift*) no espectro da amostra (Rodriguez-Quijada et al., 2018). Como é possível observar na figura 26, todos os acréscimos em cada etapa da funcionalização apresentaram um deslocamento no espectro UV-Vis, mantendo o perfil característico de um espectro de nanobastão, como esperado devido ao fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (ZHENG *et al.*, 2021).

15

### 5.2.1 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E: Diâmetro Hidrodinâmico

O candidato vacinal que utiliza a ferramenta GNR-ZIKV-E, bem como cada etapa da sua produção, foi analisada por análises do diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e  
20 microscopia eletrônica de transmissão, a fim de elucidar a eficácia da ligação dos componentes. Os dados foram processados no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

Em soluções fluidas, devido ao movimento de partículas em suspensão (chamado de movimento browniano), é possível estimar o tamanho de um nanocomplexo por meio de medidas hidrodinâmicas do diâmetro, estimado pela medida do espalhamento dinâmico de luz  
25 (DLS). A figura 27 mostra que o diâmetro hidrodinâmico da amostra contendo o GNR puro é de 15,5 nm, enquanto com o GNR ligado ao LA é de 51,95 nm; já o diâmetro hidrodinâmico do nanocomplexo contendo GNR, LA e ZIKV-E aumenta consideravelmente para 816,75 nm, indicando a presença de moléculas adsorvidas na superfície dos nanobastões, e portanto, confirmando a ligação previamente esperada.



5

**Figura 27. Medida do raio hidrodinâmico.** Os valores do diâmetro hidrodinâmico da ferramenta GNR-LA-ZIKV-E foram avaliadas em diferentes etapas da síntese, sugerindo que o processo de construção da ferramenta foi bem-sucedido. Os resultados foram lidos em um analisador de tamanho de partículas Litesizer 500 tipo BM10 e a representação gráfica foi feita no software GraphPad Prism 8.

10

### 5.2.2 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E: Potencial Zeta

Em uma solução iônica, GNPs com carga líquida terão uma camada de íons (de carga oposta) fortemente ligada à sua superfície. Uma segunda camada externa difusa é composta por íons fracamente associados. Essas duas camadas são chamadas coletivamente de camada dupla elétrica. Conforme a partícula se move (devido à difusão browniana ou força aplicada), uma distinção é criada entre os íons na camada difusa que se movem com a GNP e os íons que permanecem com o dispersante em massa. O potencial eletrostático neste limite do “plano” é chamado de potencial Zeta e está relacionado à carga superficial da GNP e estabilidade da suspensão (CLOGSTON; PATRI, 2010).

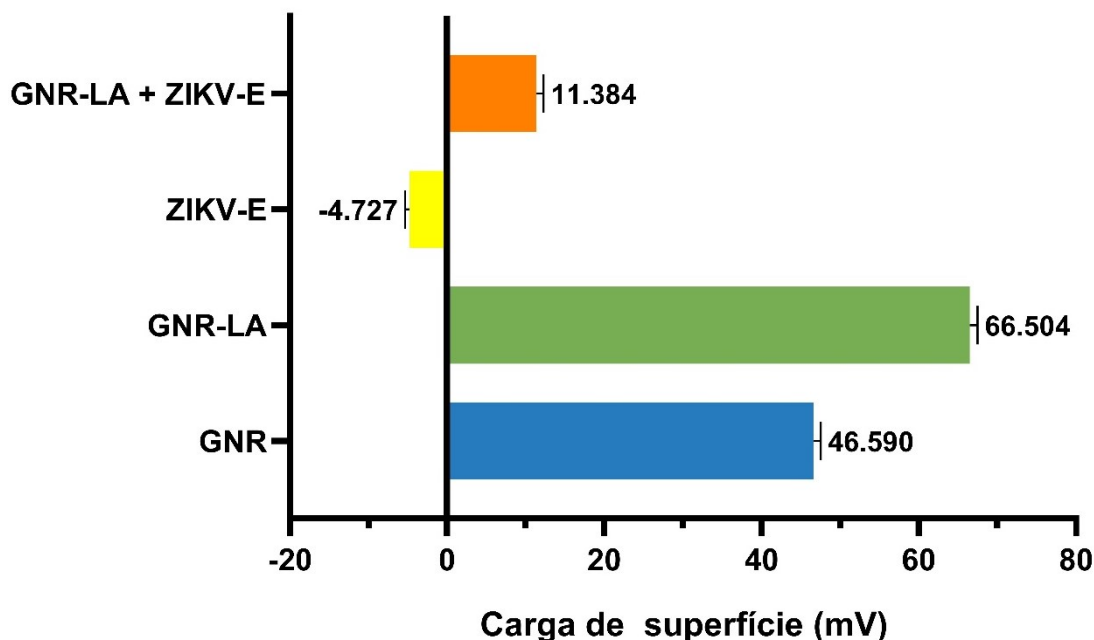
Nas medições de potencial zeta, um campo elétrico é aplicado em toda a amostra e o movimento das GNP (mobilidade eletroforética) é medido. GNPs com potencial Zeta entre 10 e +10 mV são consideradas neutras, GNP com potencial Zeta superior a +30 mV são consideradas fortemente catiônicas ou menos de -30 mV fortemente aniônicas (Clogston e Patri, 2010). Com base neste conceito, foi realizada a medida do potencial Zeta dos GNR sozinhos

25

5 em suspensão, dos GNR funcionalizados com LA, e posteriormente da ferramenta final, ou seja, GNR funcionalizados com LA e com a proteína ZIKV-E. A carga total da proteína ZIKV-E é negativa, portanto, com a adesão de ZIKV-E na superfície dos GNR, a carga total reduz significativamente, modificando a carga de ~66,50 mV (GNR-LA) para ~11,38 mV (GNR-ZIKV-), representados na figura 28. A alteração na carga da superfície é indicativo de que a  
10 ligação ocorreu de maneira satisfatória e que a construção da ferramenta foi bem-sucedida.

Todavia, uma característica previamente informada é que a grandeza medida pelo potencial Zeta se relaciona com a estabilidade da ligação. Com o valor próximo de 10 mV, a estrutura da ligação demonstra ser pouco estável; ou seja, a ferramenta deve ser preparada no mesmo dia em que ocorresse a imunização. Como o presente trabalho procura validar a  
15 ferramenta como candidato vacinal frente a um desafio, não houve um impedimento na síntese da vacina para que os experimentos não acontecessem. Para uma próxima vertente do trabalho, o desenvolvimento de um excipiente que melhore a estabilidade pode ser um objetivo a ser almejado.

20



**Figura 28. Medida do Potencial Zeta.** Medida do Potencial Zeta da suspensão de GNR lavado (GNR), GNR ligados ao ácido lipoico (GNR-LA), a medida da proteína ressuspensas em PBS e por último da ferramenta completa (GNR-LA + ZIKV-E). Os resultados foram lidos em um analisador de tamanho de partículas Litesizer 500 tipo BM10 e a representação gráfica foi feita no software GraphPad Prism 8.  
25

5

### 5.2.3 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E: Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

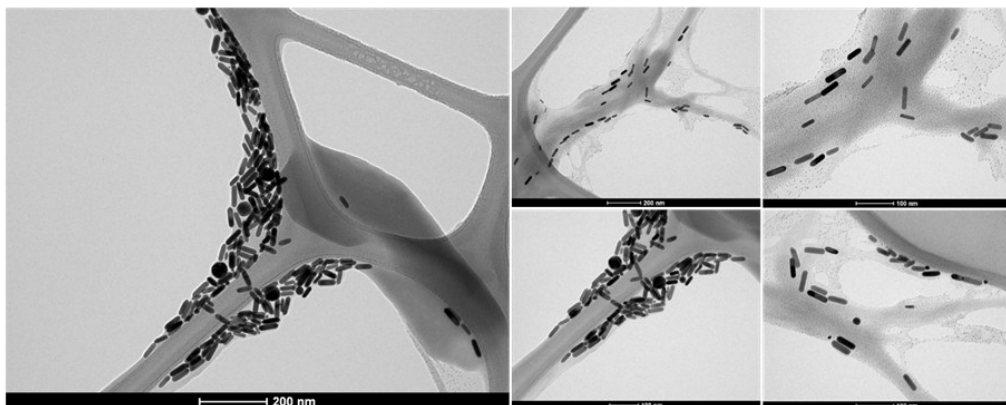
A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é uma técnica analítica usada para  
10 visualizar estruturas em escala nanométrica. Diferente dos microscópios ópticos, que dependem  
da luz no espectro visível, o TEM pode revelar detalhes impressionantes em escala atômica.  
Isto ocorre porque os elétrons podem ter um comprimento de onda significativamente mais  
curto do que o da luz visível quando acelerados através de um forte campo eletromagnético,  
aumentando assim a resolução do microscópio em várias ordens de grandeza. O uso do TEM  
15 tornou-se fundamental no campo da pesquisa de nanomateriais, já que a técnica de imagem  
baseada em microscopia eletrônica de última geração supera até mesmo a limitação de difração  
e reduz a resolução a um nível restrito por vibrações atômicas (LI; ZHANG; HAN, 2023). Tais  
características validam e confirmam a necessidade do uso da ferramenta no projeto.

A técnica foi realizada em um microscópio FEI Technai G2-12 (Spirit BioTwin) de 120  
20 kV, no CDTN. As amostras foram gotejadas diretamente sobre um filme de carbono perfurado  
apoiado em uma grade de cobre (400 mesh) (Ted Pella) e seca overnight em estufa a vácuo,  
sem nenhum processamento adicional. As amostras analisadas foram GNR lavado, GNR-LA e  
a ferramenta completa GNR-LA + ZIKV-E. As imagens geradas foram representadas abaixo,  
nas figuras 29-31.

25

#### Microscopia Eletrônica de transmissão – GNR

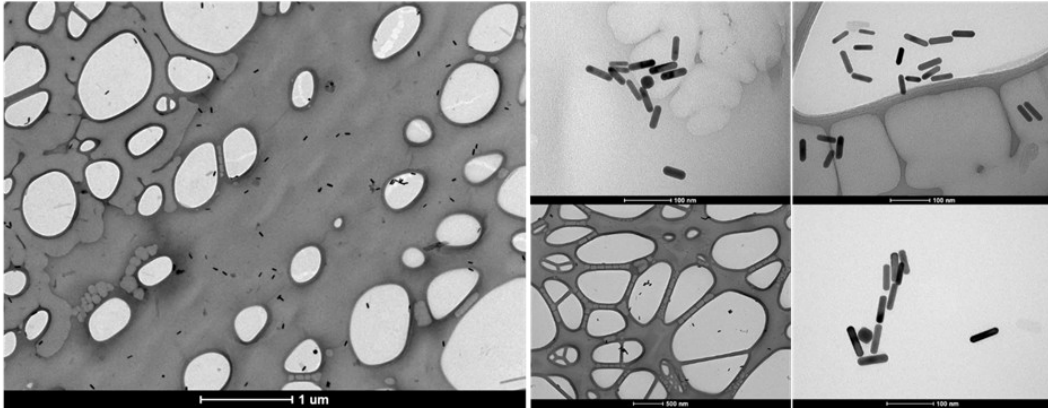
Equipamento: Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV



- 5 **Figura 29. Imagens geradas para o GNR por TEM.** A técnica é feita sob o apoio de uma grade de cobre. Na imagem, as estruturas maiores são as grades, que se observa uma maior concentração de nanobastões entre as grades. Pela presença de CTAB, sendo uma molécula detergente, as aglomerações dos GNRs era uma característica esperada.

### Microscopia Eletrônica de transmissão – GNR-LA

Equipamento: Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV

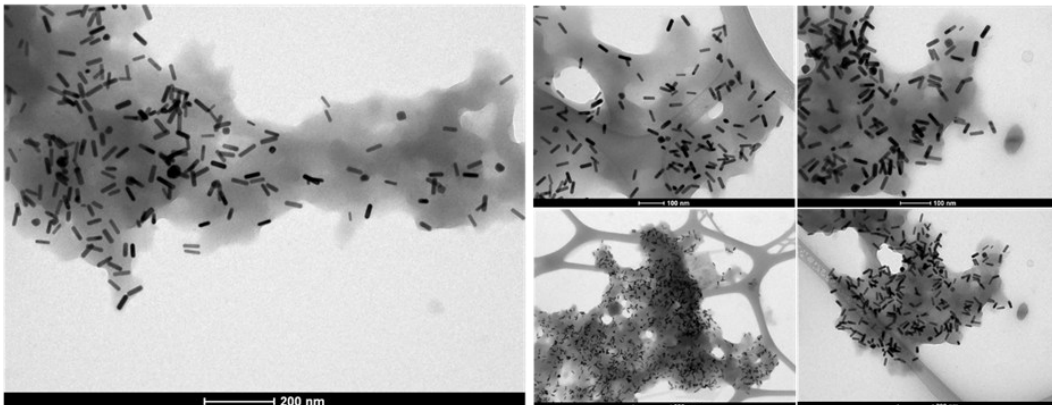


10

- Figura 30. Imagens geradas para o GNR-LA por TEM.** Aqui, se verifica que os nanobastões tratados com o ácido lipoico se dispersaram mais na grade de cobre. Isso é um indicativo que o CTAB foi removido e que foi substituído pelo LA.

### Microscopia Eletrônica de transmissão – GNR-ZIKV-E 10 μg

Equipamento: Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin 120 kV



15

- Figura 31. Imagens geradas para o GNR-LA + ZIKV-E por TEM.** Nestas sequências de imagem, é possível observar a proteína recombinante ZIKV-E, sendo as estruturas semelhantes a “nuvens”, próximas das grades de cobre. Diante destas observações, é possível comprovar que a funcionalização da ferramenta foi satisfatória.

20

5

### 5.3 Avaliação da imunogenicidade da vacina experimental GNR-ZIKV-E

Os animais foram vacinados em regime dose/reforço/reforço, divididos em quatro diferentes grupos: solução salina (PBS); com a proteína recombinante produzida (ZIKV-E);  
10 pelos nanobastões comerciais (GNR); e pelos nanobastões funcionalizados com ZIKV-E (GNR-ZIKV-E), sendo que nos três últimos grupos a formulação vacinal ainda possuía uma combinação dos adjuvantes lipídio monofosforil A (MPLA, análogo de LPS) e de 7DW8-5 (análogo a  $\alpha$ -Galactosilceramida). A caracterização da resposta imune celular frente à imunização de camundongos C57BL/6 dos grupos supracitados foi avaliada *ex vivo* pela  
15 estimulação de esplenócitos destes animais com a proteína recombinante ZIKV-E e a resposta celular e produção de citocinas pelas células imunes desses animais foi medida por Citometria de fluxo. A resposta imune humoral frente à imunização foi avaliada por ELISA e PRNT.

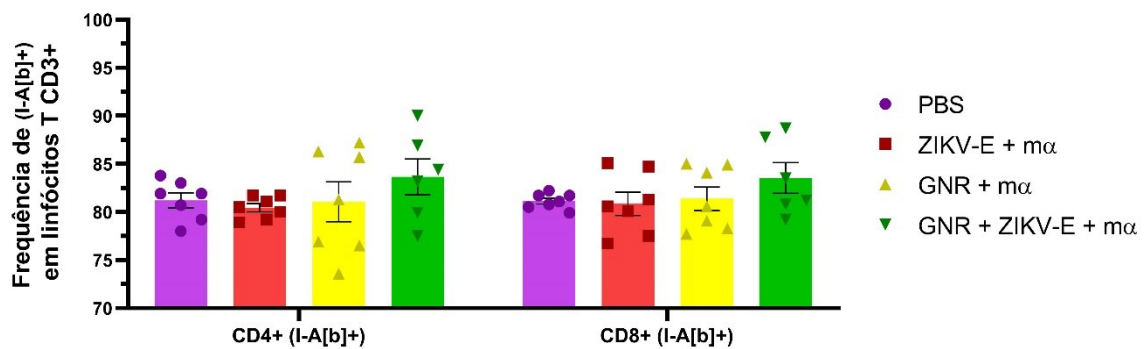
#### 20 5.3.1 Análise da resposta imune celular

As células provenientes do baço dos animais, após tratamento que consistia em maceração, filtração, centrifugação e ressuspensão, foram tratadas com tampão ACK e posteriormente ressuspensas em meio RPMI, transferidas para placas de cultura de 96 poços na concentração  
25 final de  $10^6$  células/poço. Os esplenócitos foram estimulados com  $10 \mu\text{g/mL}$  de ZIKV-E e incubadas em estufa por 1h 30 min. Após estímulo, foi adicionado às células  $20 \mu\text{L/poço}$  de RPMI contendo Brefeldina A, um inibidor da via clássica de secreção de proteínas. As células foram marcadas para receptores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas e analisadas em citômetro de fluxo para os painéis de ativação e de memória.

30 Para avaliação da resposta celular, primeiramente foram selecionados linfócitos T CD4+ e CD8+ que expressavam o marcador precoce de ativação de linfócitos I-A[b]. Na figura 32, observa-se a porcentagem da frequência da população selecionada na estratégia de gate (descrita no item 4.1.2) que apresenta o marcador, indicando que a ativação de linfócitos

5 acontece na presença de ZIKV-E. Ainda no contexto de resposta de ativação, foi observado o estado de ativação de células T CD8<sup>+</sup> dos animais estimulados frente a expressão de IFN- $\gamma$  e, quando a expressão era positiva, foi avaliado a expressão de CD107a, um marcador de degranulação de células Natural Killer (NK), representados na figura 33. As células T CD4<sup>+</sup> estimuladas apresentaram expressão de IFN- $\gamma$  baixa e não foram representadas graficamente. As células T CD8<sup>+</sup>, por sua vez, apresentaram um aumento na porcentagem de IFN- $\gamma$ . Embora exista um aumento na frequência de IFN- $\gamma$  e CD107a nos grupos ZIKV-E e GNR+ZIKV-E, a estatística não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

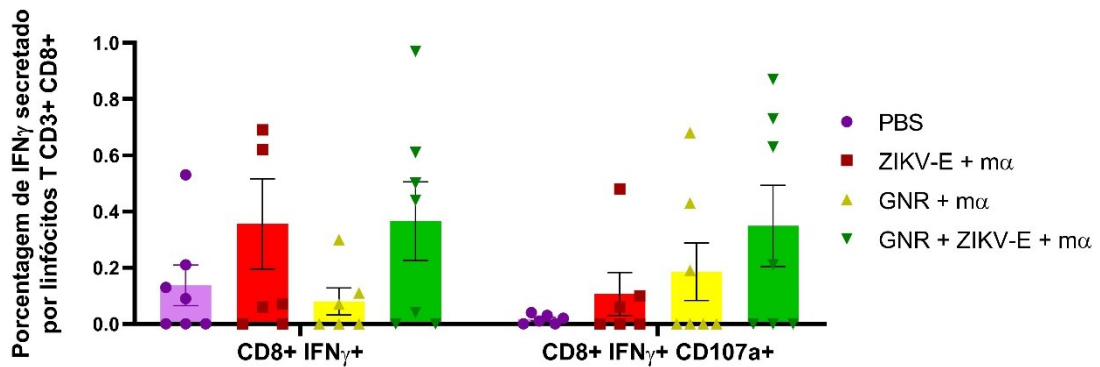
15



**Figura 32. Ativação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> I-A[b]<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> I-A[b]<sup>+</sup> de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E.** Os animais foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a expressão de I-A[b] foi avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10  $\mu$ g/mL de ZIKV-E e dosada por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Valores individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro; m $\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

20

25



5

**Figura 33. Dosagem de IFN- $\gamma$  secretados por linfócitos T CD8+ e em população de linfócitos TCD8+ IFN- $\gamma$ +, marcados com CD107a+ de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E.** Os animais foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a expressão de IFN- $\gamma$  foi avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10  $\mu$ g/mL de ZIKV-E e dosada por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Valores individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro; m $\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

A molécula I-A[b] faz parte do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) que, em modelo murino, trata-se de uma molécula heterodimérica que apresenta domínio  $\alpha/\beta$ . As moléculas MHC-II apresentam antígenos derivados de proteínas exógenas aos linfócitos T CD4+, normalmente sendo células T auxiliares, normalmente expressas nas superfícies das células epiteliais do timo e células apresentadoras de antígenos (APCs) (linfócitos B, células dendríticas, macrófagos ativadas), com a função de iniciar ou regular as respostas imunes adaptativas (MAJUMDER *et al.*, 2021). Considerando a função que a molécula possui com relação às APCs e a disponibilidade experimental, a marcação com o anticorpo foi feita para identificar a ocorrência de uma resposta imune com a presença de células que possuíam um fenótipo de ativação precoce, o que é visto entre os dados com uma proporção satisfatória.

Uma das principais citocinas pro-inflamatórias que inicia sinais e ativa a diferenciação das células T é o interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Os interferons (IFN) desempenham um papel crucial na promoção da ativação das células T CD4 e T CD8, sendo particularmente importantes para

30

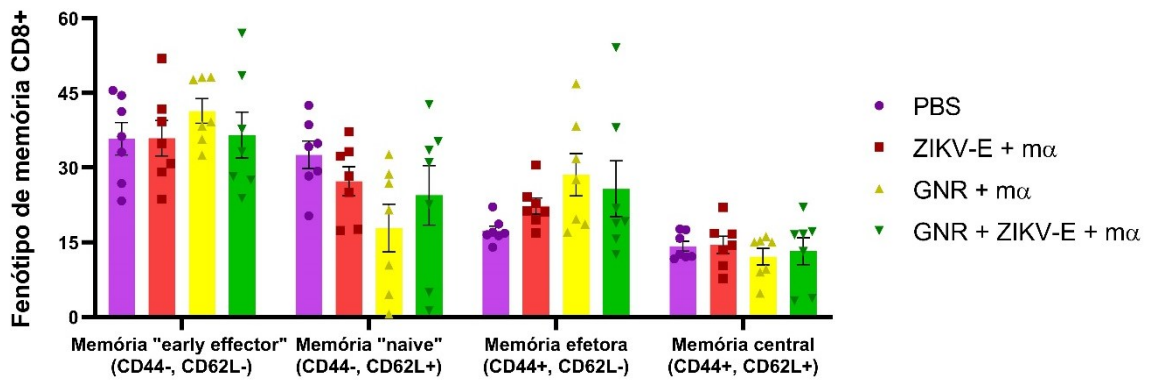
5 aumentar o acúmulo de células T CD8 e sensibilidade ao antígeno, se mostrando de grande importância para um contexto de infecção viral (PARDY; RICHER, 2019).

A expressão de CD107 na superfície celular é um importante marcador de ativação de células imunes, descrito como um marcador de degranulação de células T citotóxicas (CD8+), sendo positivamente regulada na superfície celular após a estimulação. O marcador CD107 se correlaciona fortemente com a secreção de citocinas, significativamente associada à IFN- $\gamma$ , e a lise mediada por células NK das células-alvo, demonstrando que este marcador é uma  
10 ferramenta útil para avaliar o nível de atividade celular (AKTAS *et al.*, 2009).

Neste trabalho, os grupos com a proteína ZIKV-E e com a vacina completa GNR+ZIKV-E mostraram uma maior tendência de produzir IFN- $\gamma$ , ainda que não expressasse uma média com estatística significativa (figura 33). Além disso, a vacina experimental completa demonstrou  
15 uma maior capacidade de ativar um fenótipo de células T CD8+ CD107a+, ainda que não ocorresse com uma média estatisticamente significativa. Os dados demonstram, portanto, uma ativação de resposta imune mais robusta do que com a proteína isolada.

### 20 5.3.2 Avaliação da resposta de memória de células T CD8

Posteriormente, foram avaliados as porcentagens de subconjuntos de células T que expressam marcadores de memória (CD44 e CD62L). Os subconjuntos de células T CD44-CD62L-; CD44- CD62L+; CD44+ CD62L+ e CD44+ CD62L- definidos como células de  
25 memória “naive”, “early effector”, células de memória central e células de memória efetora, respectivamente e são demonstrados na figura 34.



5

**Figura 34. Fenótipo de memória representativos de células T CD8+ de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E.** Os animais foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a expressão de CD44 e CD62L foram avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10  $\mu$ g/mL de ZIKV-E e dosada por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Valores individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro; m $\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

10

15

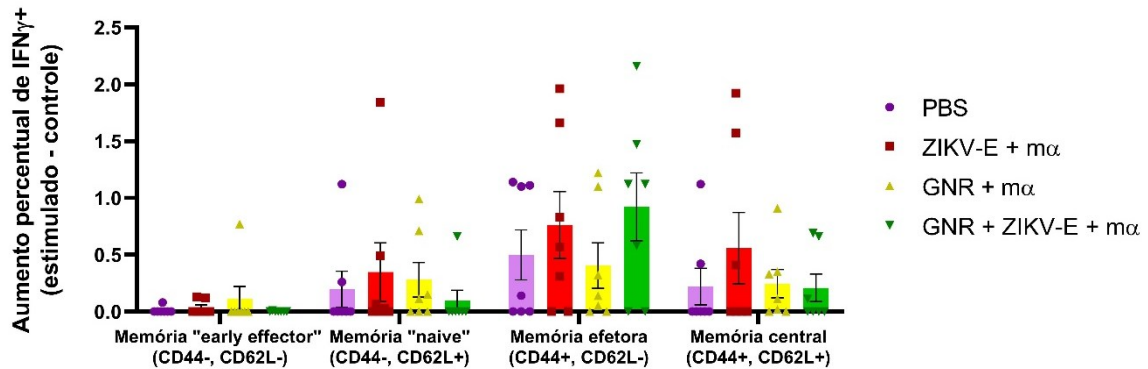
Diante dos dados apresentados, as populações de células que possuem predominância quanto ao fenótipo de memória foram as “early effector” seguidos da população “naive”. O dado encontrado sugere o que foi previamente embasado na literatura, onde estudos de Plumlee *et al.* (2015) definiam que o processo do desenvolvimento de uma imunidade de memória inicia com as células “early effector”, que, a depender do estado infeccioso do hospedeiro, poderá desempenhar um papel de memória central ou efetora. Isso significa que a maior população de células em um estímulo inicial terão este fenótipo de memória, sendo um processo contínuo no desenvolvimento de células T CD8 precursoras de memória (TODOROV *et al.*, 2022). Não houve diferença estatística entre os grupos.

20

25

Na sequência, foram avaliados as populações de linfócitos T CD8+ que expressam os marcadores de memória CD44 e CD61L que expressavam a citocina pró-inflamatória IFN- $\gamma$ , representados na figura 35. As porcentagens de cada um dos subconjuntos foram avaliadas por Citometria de fluxo.

30



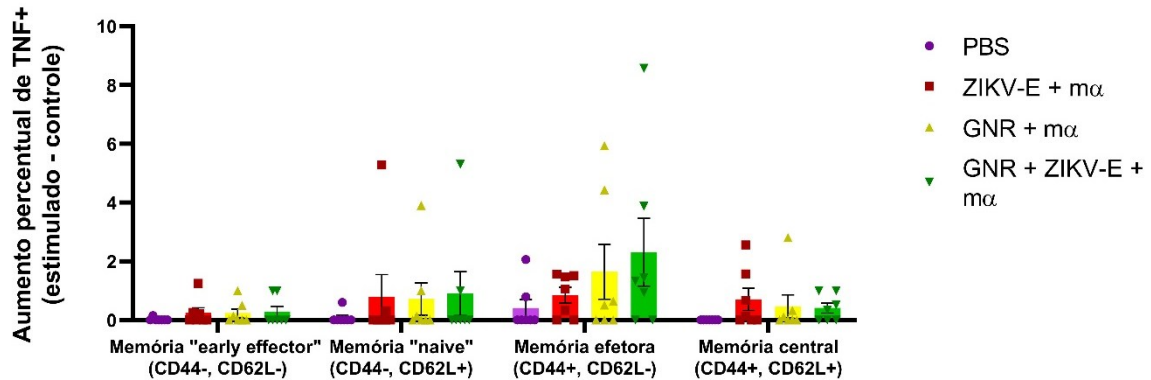
5

**Figura 35. Dosagem de IFN- $\gamma$  secretados por linfócitos T CD8+ marcados com CD44 e CD62L de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E.** Os animais foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a expressão de CD44 e CD62L foram avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10  $\mu$ g/mL de ZIKV-E e dosada por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Valores individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro; m $\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

A partir dos dados apresentados, é possível observar que existe uma maior expressão de IFN- $\gamma$  nas populações de memória efetora seguido da memória central, ainda que não tenha gerado diferenças estatísticas significativas. Entre os grupos, se observou que o grupo do candidato vacinal completo apresenta tendência de uma maior secreção de IFN- $\gamma$  em células de memória efetora, enquanto o grupo imunizado somente com o ZIKV-E demonstrou uma maior secreção da citocina em células de memória central.

Por fim, uma última análise das populações com perfil de expressão de CD44 e CD62L foram avaliadas pela capacidade de produção da citocina TNF, representados na figura 36.

25



5

**Figura 36. Dosagem de TNF secretados por linfócitos T CD8+ marcados com CD44 e CD62L de camundongos C57BL/6 imunizados após estimulação com ZIKV-E.** Os animais foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a expressão de CD44 e CD62L foram avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10  $\mu$ g/mL de ZIKV-E e dosada por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Valores individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro; m $\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

As células T CD8 eliminam vírus através de dois mecanismos primários: citotoxicidade direta de células infectadas e através da produção de múltiplas citocinas para induzir respostas antivirais locais ou sistêmicas, o que as torna cruciais para o controle de infecções virais (Hashimoto et al., 2019). Além disso, ambas populações de células T são capazes de gerar populações de células de memória de longa duração, a fim de responder rapidamente à reinfecção e proporcionar maior proteção (Pardy & Richer, 2019).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é um mediador central nos processos imunológicos de controle de infecções, autoimunidade, doenças alérgicas, bem como na atividade antineoplásica que lhe dá nome, sendo uma citocina inflamatória produzida por macrófagos durante uma inflamação aguda. A ativação da sinalização pelo TNF inicia uma variedade de resultados potenciais, incluindo proliferação celular, ativação genética ou morte celular, sendo uma proteína importante para a resistência do organismo a infecções (GOUGH; MYLES, 2020).

Com os dados apresentados, é possível observar que ocorreu uma maior secreção de TNF em células de memória efetora após estimulação, embora não apresente significância

5 estatística. O grupo do candidato vacinal completo mostrou uma média maior na secreção de TNF para a população efetora em relação entre os demais grupos avaliados.

### 5.3.3 Análise da Resposta Imune Humoral por Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto (ELISA)

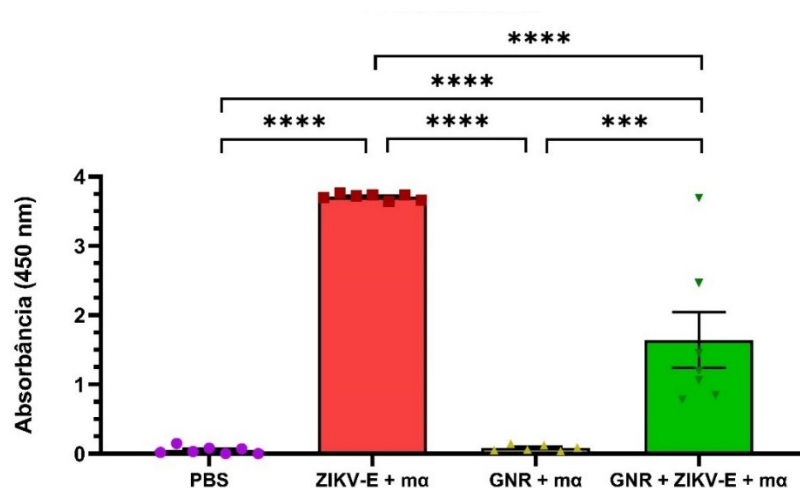
10

A fim de mensurar a produção de anticorpos específicos contra a proteína ZIKV-E produzidos pelos camundongos imunizados, os soros coletados foram avaliados através da técnica de ELISA, que apresenta grande especificidade e sensibilidade. O ensaio foi realizado conforme descrito por Bagno *et al.*, (2020) com algumas modificações.

15

Na figura 37 é possível observar que, conforme esperado, os animais inoculados apenas com solução salina (PBS) e com as nanopartículas combinadas com os adjuvantes (GNR +  $\alpha$ ), não apresentaram títulos de anticorpos detectáveis. Por sua vez, os grupos imunizados com a proteína ZIKV-E e os adjuvantes produziram as maiores doses de anticorpos IgG anti-ZIKV. Os animais pertencentes ao grupo imunizado com a vacina completa (GNR + ZIKV-E +  $\alpha$ ), também produziram anticorpos contra o ZIKV-E.

20



**Figura 37. Resultados do ELISA anti-IgG ZIKV-E com soros dos animais imunizados.** Camundongos C57BL/6 foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço o soro dos animais foi testado por ELISA. Os soros dos animais imunizados com ZIKV-E apresentaram títulos de anticorpos detectáveis e são significativos em relação aos animais dos grupos PBS e GNR +  $\alpha$ . A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram

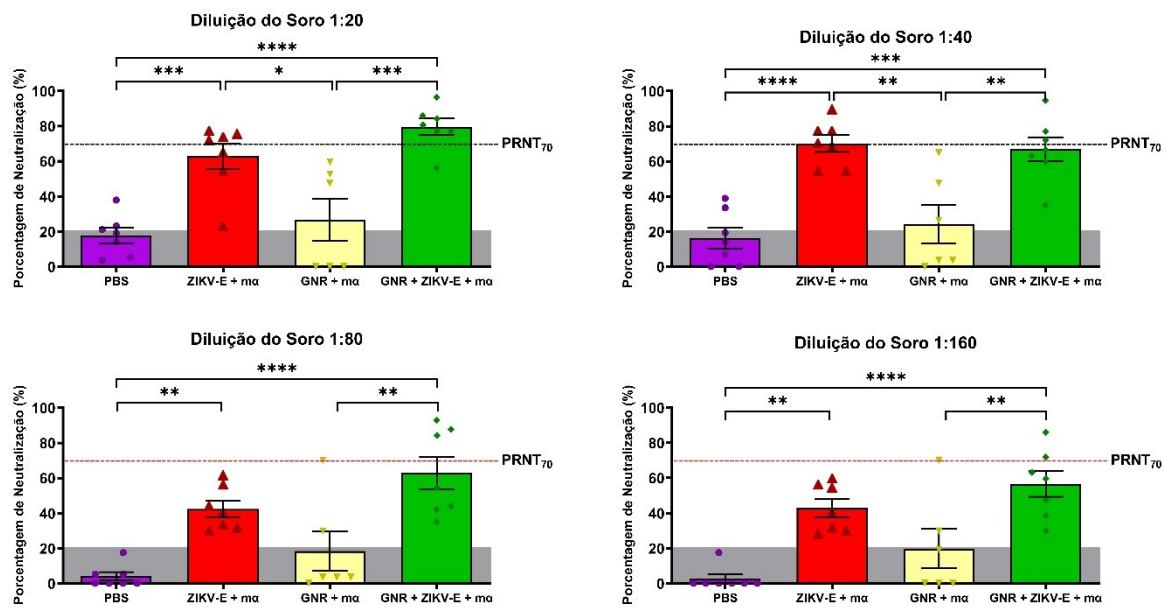
25

5 verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Um asterisco (\*) identifica valores de P ajustados entre 0,01 e 0,05, indicando que existe uma estatística significativa entre os grupos apontados, enquanto dois asteriscos (\*\*) identificam valores de P ajustados entre 0,01 e 0,001. Três (\*\*\*) e quatro (\*\*\*\*) seguem a mesma lógica: quanto maior a quantidade de asteriscos maior a significância entre os valores na análise de variância. Valores individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro; m $\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

15 O ELISA se trata um ensaio relacionado à análise de títulos de anticorpos IgG anti-ZIKV-E presentes nos soros dos animais imunizados. Em relação aos resultados obtidos nesse ensaio, os animais imunizados com ZIKV-E apresentaram altos títulos de anticorpos com diferença estatística significativa em comparação aos outros grupos.

#### 20 **5.3.4 Avaliação da Resposta Imune Humoral por Teste de redução de placas por neutralização (PRNT)**

O teste de redução de placas por neutralização (PRNT), ou ensaio de soroneutralização, tem o objetivo de analisar os níveis de anticorpos neutralizantes contra o ZIKV produzidos pelos animais imunizados. O ensaio foi realizado conforme descrito por Moraes (2022), com  
25 algumas modificações, com dados representados na figura 38.



5

**Figura 38. Resultados do Teste de Redução de Placas por Neutralização (PRNT) com soros dos animais imunizados.** Camundongos C57BL/6 foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço, o soro dos animais foi testado por PRNT. Os soros dos animais imunizados com ZIKV-E apresentaram anticorpos capazes de neutralizar o ZIKV e são significativos em relação aos animais dos grupos PBS e GNR + ma e GNR + al. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Um asterisco (\*) identifica valores de P ajustados entre 0,01 e 0,05, indicando que existe uma estatística significativa entre os grupos apontados, enquanto dois asteriscos (\*\*) identificam valores de P ajustados entre 0,01 e 0,001. Três (\*\*\*) e quatro (\*\*\*\*) seguem a mesma lógica: quanto maior a quantidade de asteriscos maior a significância entre os valores na análise de variância. Valores individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro; ma= combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

10

15

20

Por fim, foi realizado um segundo teste sorológico, através do método de redução de placas por neutralização (do inglês, *Plaque Reduction Neutralization Test*, PRNT). O princípio da reação de neutralização é que, quando uma partícula viral entra em contato com o anticorpo específico, ela tem receptores externos neutralizados pela presença destes anticorpos, deixando de ser infecciosa. Nesta técnica, soro suspeito e vírus são colocados em contato, incubados em condições apropriadas para que haja ligação/reação, e a mistura é inoculada em culturas celulares. Se os anticorpos forem específicos para o vírus, a reação de neutralização ocorre e não se observam placas de lise viral na monocamada de células; caso contrário, o vírus continuará com capacidade infecciosa e o efeito citopático é observado nas células. Portanto, o

25

30

5 ensaio avalia se os anticorpos são capazes de neutralizar o vírus *in vitro*, inibindo a sua infecção em cultura de células e assim reduzindo o número de placas de lise formadas (SHAN *et al.*, 2017).

10 O diagnóstico de ZIKV é baseado na detecção de RNA viral por RT-PCR ou testes de detecção de anticorpos, como ELISA e imunofluorescência indireta. O teste de neutralização por redução de placa (PRNT) é usado como padrão ouro para resolver resultados inconclusivos (LUNARDELLI *et al.*, 2023), sendo normalmente utilizado com uma porcentagem de neutralização de 70% do título de vírus para uma análise viável em locais onde a ocorrência de outros orthoflavivírus é observado. O vírus Zika utilizado para o ensaio PRNT foi o preparado em estoque conforme Metodologia item 4.1 denominado PE-243.

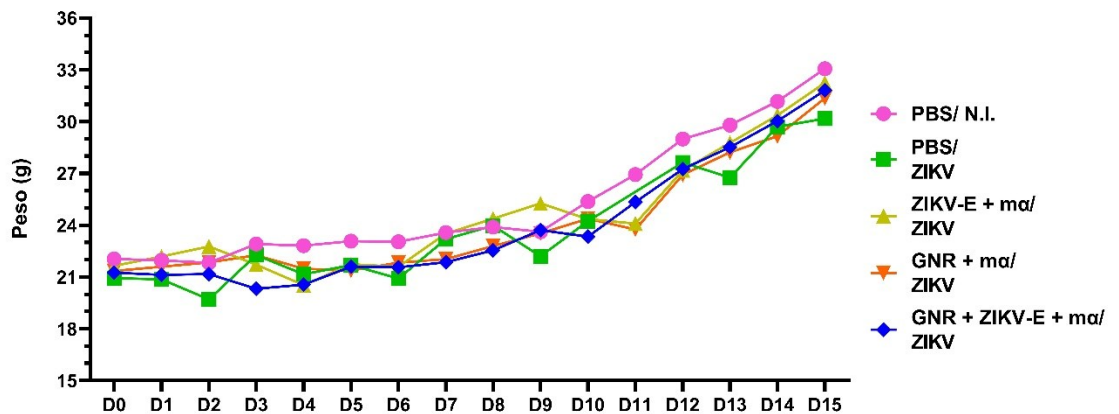
15 Na figura 38 é possível observar que, conforme esperado, os soros dos animais inoculados apenas com solução salina (PBS) e com as nanopartículas combinadas com os adjuvantes não foram capazes de neutralizar o vírus em nenhuma das diluições testadas. Foi observado que os anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados com ZIKV-E (pela vacina completa e pela proteína acrescida somente ao adjuvante) são capazes de neutralizar o  
20 ZIKV em até 70% em diluições de 1:20 e 1:40, ainda observando uma porcentagem de neutralização acima de 40% nas diluições de 1:80 e 1:160. A neutralização observada é inversamente proporcional a diluição do soro, ou seja, quanto maior a diluição do soro, menor a neutralização das partículas virais. Em conjunto, os ensaios com os soros dos animais imunizados com a vacina completa mostram que, embora os títulos de anticorpos detectados no  
25 ELISA tenham sido menores, estes anticorpos são potencialmente neutralizantes.

#### 5.4 Desafio com ZIKV

30 O potencial protetor das vacinas experimentais foi avaliado através do desafio com vírus ZIKV em camundongos fêmeas prenhes de linhagem C57BL/6, imunizadas com protocolo dose-reforço-reforço com um intervalo de 14 dias ente cada etapa (conforme descrito em Metodologia, item 4.6). Após o 14º dia da última imunização, o ciclo estral de cada fêmea foi analisado e registrado diariamente para que houvesse uma previsão de quando o ciclo de

5 interesse (estro) poderia acontecer (BYERS *et al.*, 2012). Entre algumas observações, foi  
identificado que a proporção de camundongos fêmeas que poderiam ser acondicionadas com  
um macho era de 1:1 devido a observações do experimento pois não se encontrava o tampão de  
sêmen (característico pós coito dos animais), nem ganho de peso significativo nem mudança na  
10 duração dos ciclos (em fêmeas, caso ocorresse a fecundação, permanecem em diestro, uma  
fase onde não há abertura vaginal). Apesar de tantos possíveis interferentes no processo (a  
morfologia vaginal, conclusões errôneas de qual ciclo o animal se encontra, ganho de peso pela  
dieta, ausência ou raridade de ciclo estral e comportamento de grupo entre os animais), o  
procedimento era necessário para adquirir o tecido de embriões com aproximadamente 15 dias  
15 de gestação (ANDRADE *et al.*, 2021). Durante todo o período experimental, foram utilizados  
97 animais, sendo 88 fêmeas e 11 machos, para repetir um grupo experimental caso houvesse  
a necessidade por perder+, se ocorresse quando eram infectados mas não estavam prenhes). Das  
88 fêmeas, 43 ficaram prenhes e foram devidamente infectadas, demonstrando que a viabilidade  
foi de ~48,9%. Contudo, ainda nestes números, alguns critérios de exclusão foram definidos no  
20 experimento. Fêmeas com idade superior a 25 semanas (n=3) e animais desafiados com um  
ZIKV cujo estoque viral não havia sido preparado pelo laboratório (n=6) foram  
desconsiderados nas análises apresentadas a seguir.

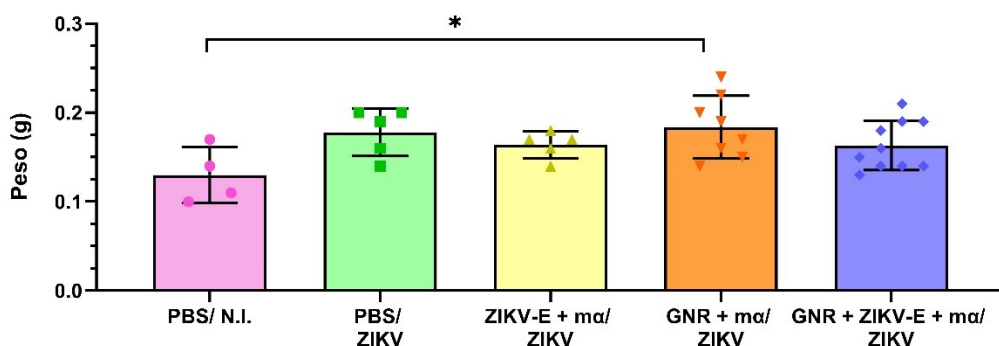
Na sequência, após o condicionamento (D0,5), as fêmeas consideradas grávidas foram  
diariamente pesadas (valores apresentados na figura 39) e no dia D5,5, inoculadas com ZIKV  
na dosagem de  $10^6$  PFU/animal através da administração intraperitoneal de um isolado clínico  
25 do ZIKV (BR\_SJRP1840). A infecção no dia D5,5 teve como objetivo estabelecer um modelo  
cl clinicamente relevante para estudo de reabsorção fetal. Visto que a gestação de camundongos  
ocorre, em média, após 18 dias da fecundação, a infecção no 5º dia vem para mimetizar a  
infecção no período de 7 meses da gestação humana para estudar as alterações teratogênicas,  
visto que os casos de SCZ ocorriam em mulheres no período mencionado. Os camundongos  
30 controle negativo (PBS/NI) foram inoculados com apenas solução de PBS.



5

**Figura 39. Análise do ganho de peso médio dos animais entre D0 a D15.** Representação gráfica feita no aplicativo GraphPadPrism8. Nota-se que o valor tem um aumento a partir do D10, algo que já era esperado pelo grande embasamento em literatura que usa o modelo animal.

10 No dia D15,5 de gestação, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal. A coleta de sangue periférico foi realizado pelo plexo e o animal foi posteriormente eutanasiado. Foram removidos o baço e fígado da fêmea e em seguida, foi realizada ovariectomia para coletar os dados do peso dos animais, viabilidade da prole e medições crânio-cauda e temporal-temporal. As figuras 40-15 42 apresentam dados de pesagem de baço, viabilidade, pesagens de feto e placenta. Somente fêmeas com ganho de peso foram consideradas para as análises posteriores.

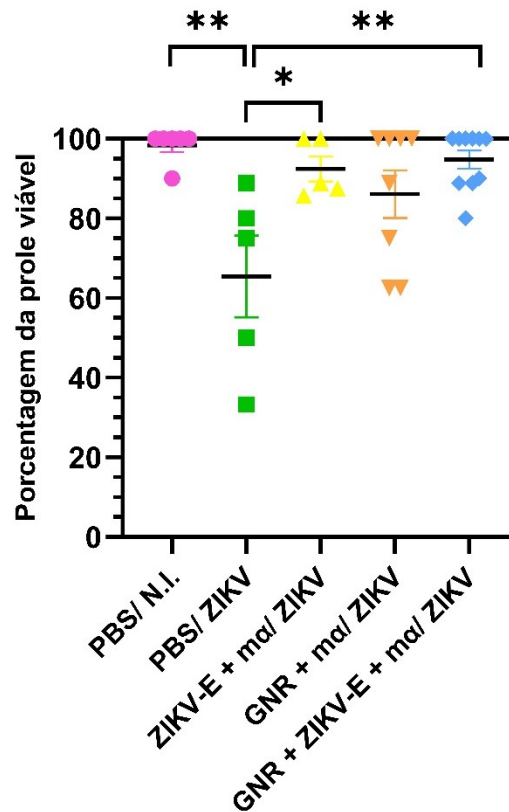


20 **Figura 40. Pesagens de baço de camundongos C57BL/6 tratados com GNR, ZIKV-E, PBS e a vacina completa GNR+ZIKV-E desafiados ou não com ZIKV.** A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk (p

5 < 0,05) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Um asterisco (\*) identifica valores de P ajustados entre 0,01 e 0,05, indicando que existe uma estatística significativa entre os grupos apontados. Valores individuais representados, com barra com o valor de  
10 média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV = Vírus Zika; N.I. = Não infectado; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro;  $m\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

Com dos dados de baço, é possível observar que em todos os animais infectados ocorreu um aumento, dado que indica que ocorreu a esplenomegalia, uma característica sugestiva de  
15 que a infecção viral ocorreu.

Um próximo dado verificado foi a viabilidade da prole. Nos modelos animais murinos, em ensaios que verificam alterações na prole, observam-se certas massas de células amorfas no espaço uterino. Isso diz respeito a um fenômeno aqui referido como “reabsorção”. Esse quadro de involução fetal é típico da ocorrência de infecção no tecido fetal em desenvolvimento. O  
20 organismo da fêmea reabsorve os nutrientes, mas o que não é reabsorvido permanece condensado numa massa celular amorfa. Essas reabsorções, portanto, seriam parte da prole viável caso não houvesse uma infecção que possui tropismo ao tecido fetal. Para tanto, os valores de viabilidade da prole são calculados como a razão do número de fetos e placentas completamente formadas dividido pelo valor de observações totais no útero do animal, o que  
25 inclui reabsorções e fetos completamente formados. A figura a seguir representa os valores médios, em porcentagem da viabilidade.



5

**Figura 41. Porcentagem da prole viável em animais desafiados com ZIKV após imunização com o candidato vacinal.** A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Um asterisco (\*) identifica valores de P ajustados entre 0,01 e 0,05, indicando que existe uma estatística significativa entre os grupos apontados, enquanto dois asteriscos (\*\*) identificam valores de P ajustados entre 0,01 e 0,001, o que demonstra maior nível de significância entre os grupos apontados. Valores individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS = solução salina; ZIKV = Vírus Zika; N.I. = Não infectado; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro;  $\alpha\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

10

15

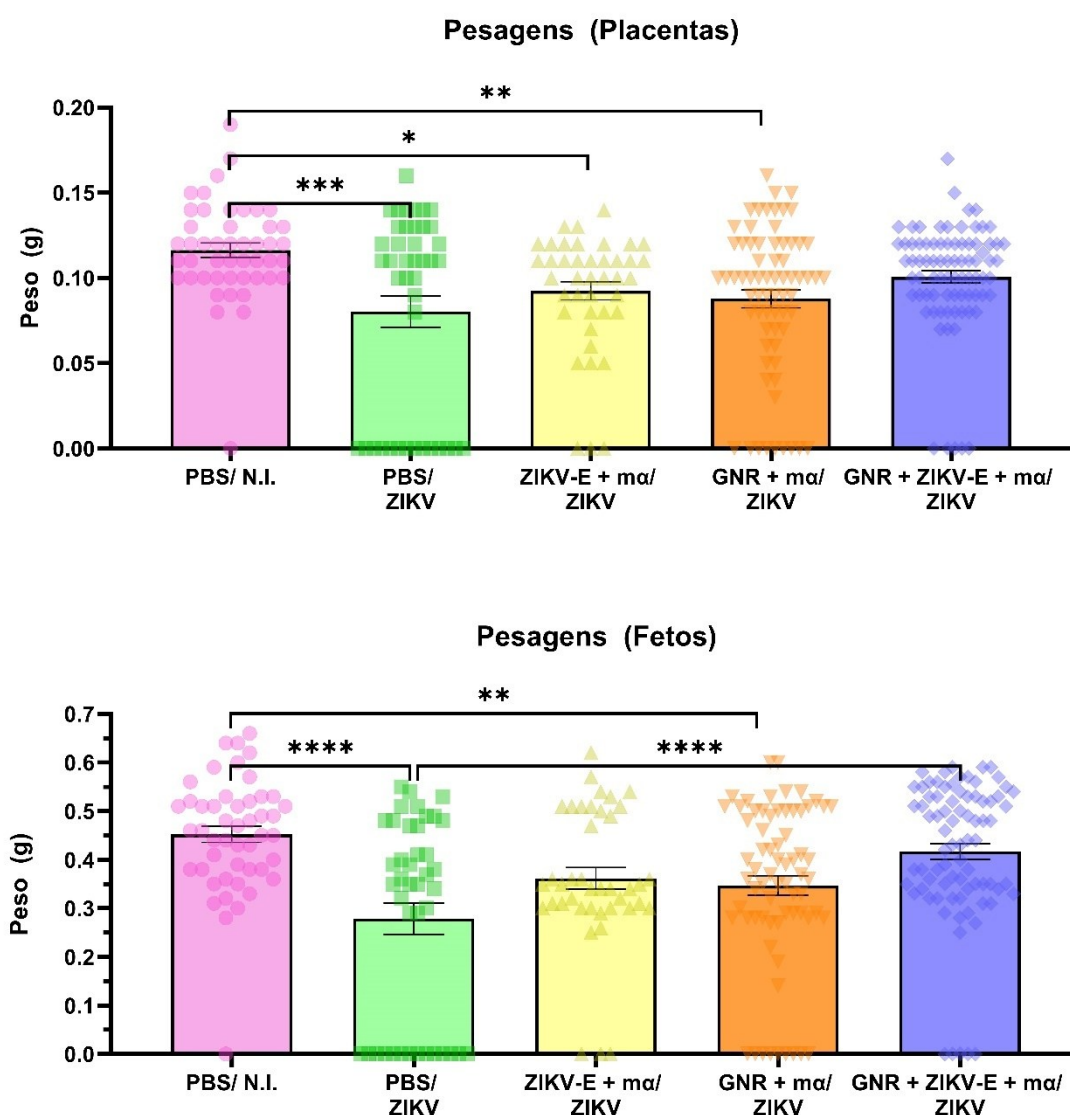
20

Com este dado, se observa que o grupo PBS não desafiado e o grupo do candidato vacinal desafiado possuem diferenças estatísticas de alta significância ao serem comparados com o grupo PBS desafiado. Além disso, o grupo com a proteína recombinante ZIKV-E, também possui relevância estatística ao ser comparado com o grupo PBS infectado. O dado sugere que o ZIKV utilizado em desafios induziu a variação no dado de viabilidade e que a proteína recombinante induziu uma resposta imune adequada ao aumentar a viabilidade da prole; mais evidente ainda é que o candidato vacinal completo induziu uma resposta que

5 garantiu que a viabilidade fosse mais significativa e que pode ser indiretamente comparada com o grupo PBS não infectado, pois ambos possuíram estatística semelhante em relação ao grupo PBS infectado. Isso sugere que, frente a uma infecção pelo vírus Zika, o candidato completo GNR + ZIKV-E consegue desenvolver uma resposta imune capaz de proteger e manter a prole viável semelhante à dos animais não infectados, sendo este um resultado satisfatório.

10 Vale ressaltar que a média do grupo PBS não infectado foi abaixo de 100% pois o fenômeno de reabsorção pode acontecer naturalmente, podendo ser genético (uma fêmea na população ter mais tendência do que outras no que tange reabsorções fetais) ou fenotípico. Através de dados apresentados em estudo conduzido por Murray *et al.* (2010), após extensa  
15 ninhada foi levantada. Para o modelo murino C57BL/6J, o mais próximo do experimento conduzido, se descreve 97% da sobrevivência da prole de tamanho médio em 8 fetos.

Por fim, para os dados de peso, foram avaliados os valores para fetos e placentas dos animais vacinados. A análise do dado contou com valores de 0 para reabsorções apresentadas nos grupos. Isso foi feito para que o efeito da reabsorção pudesse ser estudado. Em caso  
20 contrário, para que houvessem alterações maiores, seria melhor que a linhagem C57BL/6 fosse heterozigota para o gene do Interferon  $\alpha/\beta$  (IFNAR). Nestes animais, a resposta quando são homozigotos para o gene é superior às respostas encontradas no organismo humano (MINER *et al.*, 2019). Mas, para C57BL/6 *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, o resultado poderia denotar algum viés por se tratarem de animais geneticamente modificados, por não ser totalmente elucidado quais outras  
25 vias podem ser afetadas (POLAND *et al.*, 2019). Faz-se assim, portanto, o uso do valor 0 para representar os animais reabsorvidos nas figuras a seguir.



5

**Figura 42. Pesagens de placentas e fetos de camundongos C57BL/6 tratados com GNR, ZIKV-E, PBS e a vacina completa GNR+ZIKV-E desafiados ou não com ZIKV.** A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 8. Os dados foram verificados para normalidade por teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) e com *outliers* identificados pelo método ROUT (sensibilidade do método à 10 1%). Após validação, os dados foram avaliados utilizando o teste *One-way ANOVA* e pós-teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ). Um asterisco (\*) identifica valores de P ajustados entre 0,01 e 0,05, indicando que existe uma estatística significativa entre os grupos apontados, enquanto dois asteriscos (\*\*) identificam valores de P ajustados entre 0,01 e 0,001. Três (\*\*\*) e quatro (\*\*\*\*) seguem a mesma lógica: quanto maior a quantidade de asteriscos maior a significância entre os valores na análise de variância. Valores 15 individuais representados, com barra com o valor de média  $\pm$  desvio padrão médio (SEM). PBS =

5 solução salina; ZIKV = Vírus Zika; N.I. = Não infectado; ZIKV-E= proteína recombinante produzida; GNR= nanobastão de ouro; mα= combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5.

10 Diante dos gráficos e análises estatísticas, é possível observar que os fetos do grupo da vacina completa se desenvolveram normalmente, com resultados comparáveis ao grupo não vacinado. Com grande significância nos valores estatísticos entre os dados de placenta dos grupos PBS não infectados com os grupos PBS infectado e GNR infectado se observa que a variação do peso foi maior em grupos que não haviam a proteína ZIKV-E, ou seja, não possuem propriamente uma imunidade que fosse possível induzir proteção ao Zika. Contudo, a presença de diferença estatística significativa entre o grupo não infectado com o grupo imunizado com a 15 ZIKV-E, embora em menor intensidade, pode indicar que a proteína induz a proteção, mas é mais eficaz quando é carregada para a célula com o uso dos nanobastões, sendo este o único grupo que não possuiu estatística significativa ao ser comparado com o grupo não infectado, o que sugere que o nanobastão, de alguma forma, induz o melhor reconhecimento da proteína ZIKV-E, e conseqüentemente, aumenta a resposta do organismo frente à infecção com ZIKV.

20 O dado com a maior importância estatística, contudo, foi a avaliação dos valores de peso dos fetos. Conforme descrito por Camargos *et al.* (2019), o tropismo do vírus é no tecido neuroprogenitor, que existe em alta concentração no cérebro em desenvolvimento. A primeira diferença estatística significativa a ser apontada ocorre entre o grupo PBS não desafiado e o grupo imunizado apenas com nanobastões (GNR) desafiado. Como previamente discutido, o 25 nanobastão sozinho não é capaz de induzir uma resposta imune contra o ZIKV, sendo a proteína recombinante ZIKV-E a responsável pela imunidade protetora.

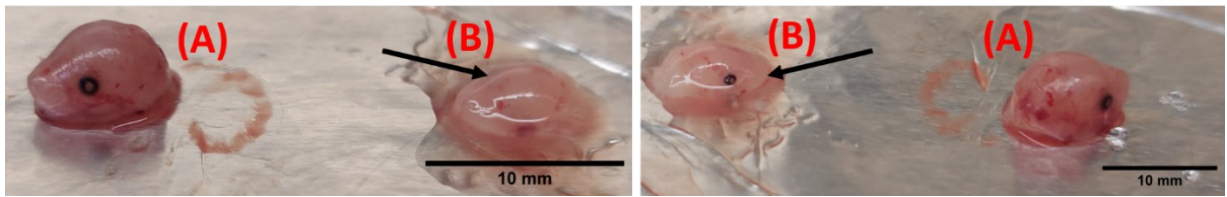
Finalmente, os grupos com maior desenvolvimento fetal medido pelo peso dos animais foram o grupo PBS não desafiado e o grupo imunizado com a vacina completa GNR+ZIKV-E, ambos em comparação com o PBS desafiado. A média de peso fetal nestes grupos é 30 estatisticamente superior aos demais grupos. O conjunto dos dados sugere que a vacina completa induz uma proteção superior em relação à proteína isolada, indicando que a ferramenta vacinal é adequada para induzir uma resposta protetiva para a prole.

## 5 5.5 Análises morfológicas *in situ*

Diante das análises estatísticas apresentadas para o potencial de imunogenicidade do candidato vacinal frente a um desafio com ZIKV, o trabalho propôs uma análise morfológica contando com análises estatísticas das medições entre a razão crânio-cauda e temporal-temporal. No entanto, como discutido no tópico anterior, a ausência de dados da literatura que estuda o modelo C57BL/6 *wild type* (WT) na questão da morfologia do feto representou um empecilho na geração do dado. Lazear *et al* (2016) traz um estudo aprofundado sobre animais geneticamente modificados, com vias do sistema imune silenciadas ou nocauteadas comparadas aos animais WT, onde é identificado que enquanto camundongos WT com 4 a 6 semanas de idade não desenvolvem a doença clinicamente aparente, camundongos sem sinalização de interferon  $\alpha/\beta$  (camundongos *Ifnar1*<sup>-/-</sup> ou *Irf3*<sup>-/-</sup>*Irf5*<sup>-/-</sup> *Irf7*<sup>-/-</sup> triplo knockout) sucumbiram à infecção por diferentes linhagens de ZIKV. A análise da carga viral revelou que *Ifnar1*<sup>-/-</sup> mantiveram altos níveis de ZIKV em todos os tecidos testados, incluindo soro, baço, cérebro, medula espinhal e testículos. Não obstante, Andrade *et al.* (2021) apresenta um estudo sobre a suscetibilidade materna e o efeito na prole, identificando que fêmeas A129 deficientes na expressão de interferon tipo I (*type I Ifnr-deficient*) com machos C57BL/6 WT geraram uma prole onde uma porcentagem de 100% dos fetos desafiados com um alto título viral não sobreviveram em comparação à 66% dos fetos gerados por animais WT, que ainda apresentaram características de restrição do crescimento intrauterino (IURG) frente a um desafio com ZIKV PE-243.

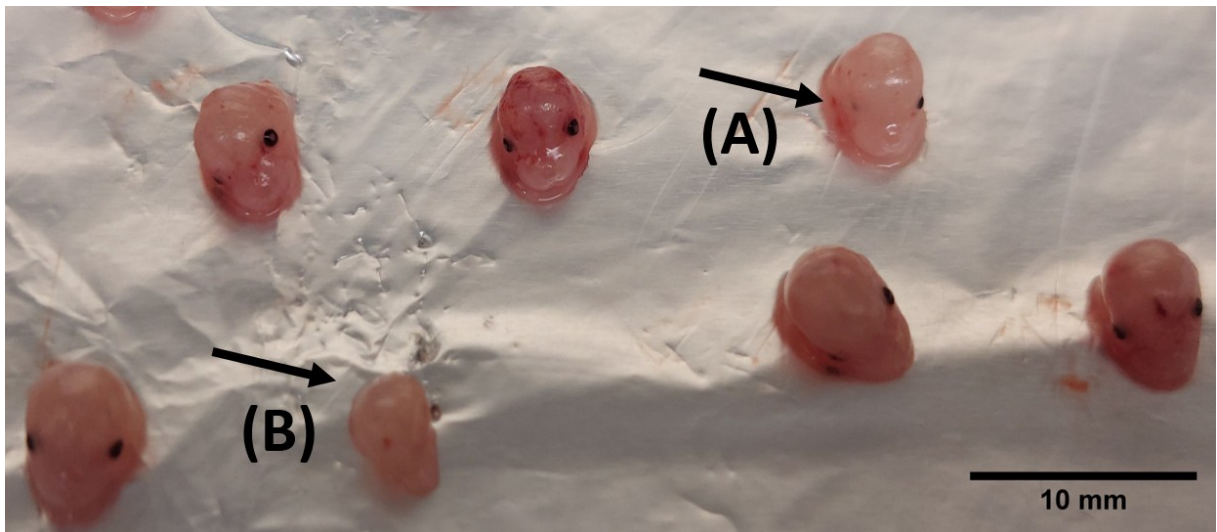
Como observado pelos dados apresentados, animais C57BL/6 WT desenvolvem malformações fetais em uma porcentagem abaixo do esperado quando estudado o comportamento e desenvolvimento da prole nascida após o desafio. Apesar de não possuir alteração relevante estatística, isso não impediu de ser observadas alterações morfológicas *in situ* da prole desafiada com o vírus Zika (ZIKV BR\_SJRP1840). As imagens a seguir (figuras 42 a 48) foram feitas no dia D15 da gestação, após eutanásia e coleta de tecidos. O código do animal segue identificado seguido do grupo experimental pertencente.

5



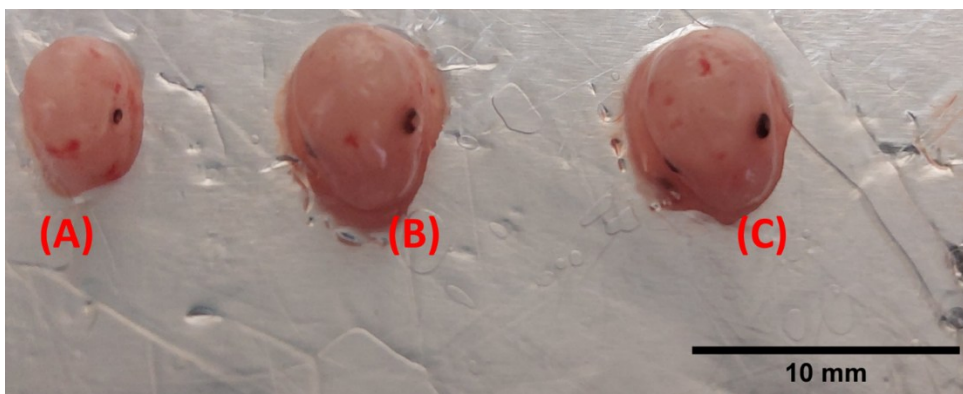
**Figura 43. 2.12 (PBS/ZIKV) – Foto lateral esquerda e direita do crânio de fetos de fêmea desafiada com ZIKV. Além do tamanho reduzido e do aspecto físico do crânio, a malformação ocular descrita na literatura foi encontrada no feto (B) em comparação ao feto (A) nas imagens.**

10

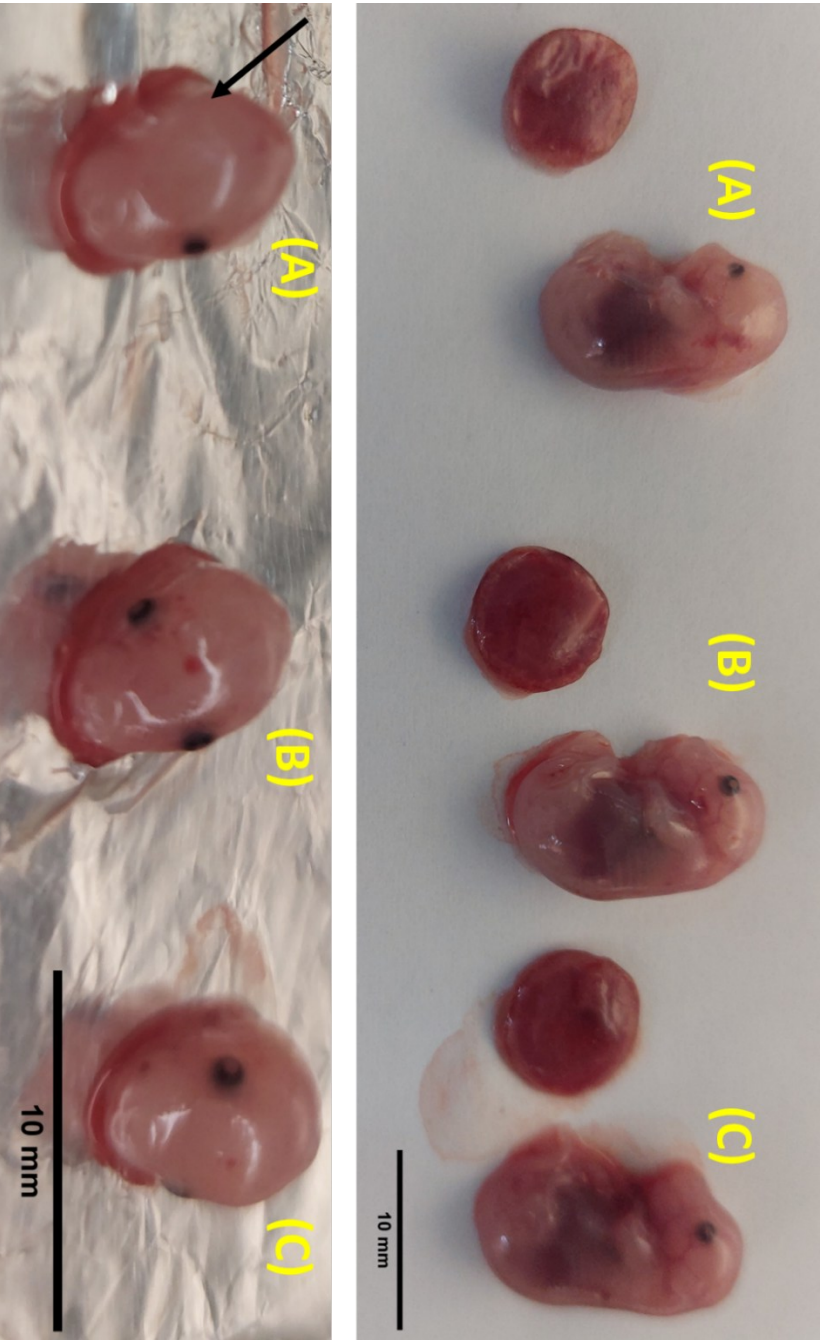


**Figura 44. 4.6 (GNR/ZIKV) – Alterações morfológicas entre os fetos de uma mesma fêmea desafiada com o vírus. Comparativamente com os outros, a cabeça de cada feto com a seta apontada apresentou uma alteração evidenciada de malformação ocular (A) e na redução de tamanho (B).**

15



**Figura 45. 4.8 (GNR/ZIKV) – Alterações morfológicas entre os fetos de uma mesma fêmea desafiada com o vírus. Aqui, observou-se a diferença de tamanho de crânio do feto (A) com os fetos (B) e (C).**



**Figura 46. 2.13 (PBS/ZIKV) – Foto lateral de feto e foto aproximada de crânio de fetos de fêmea desafiada com ZIKV. Se observou a alteração de tamanho do feto (A) em comparação ao (B) e (C). Abaixo, ao fotografar o crânio do animal, se observou a malformação ocular característica no animal (A), comparado ao (B) e (C).**



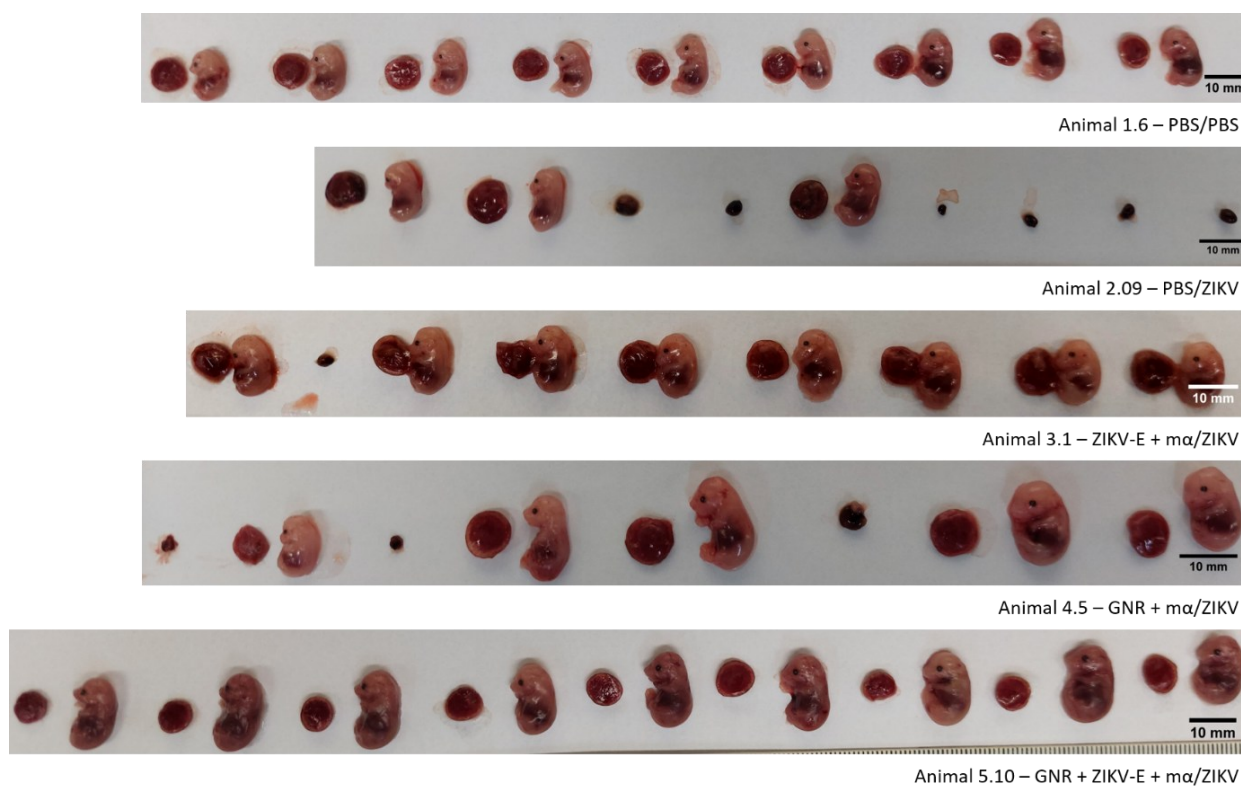
3.1 (ZIKV-E/ZIKV) –  
Morfologia normal do útero



5.1 (GNR + ZIKV-E/ZIKV) –  
Morfologia normal do útero

2.9 e 2.11 (PBZ/ZIKV) – Pela elevada ocorrência de reabsorções, se observou uma alteração na morfologia do útero de forma abrupta

**Figura 47. Panorama geral comparativo entre grupos de diferentes morfologias de útero extraídos de fêmeas infectadas com o vírus Zika.** As figuras possuem uma legenda abaixo quando são de diferentes grupos experimentais. As duas fotos à esquerda, do grupo PBS/ZIKV, pela elevada ocorrência de reabsorções, se observou uma alteração na morfologia do útero. Nas fotos apresentadas à direita, dos grupos ZIKV-E/ZIKV e GNR + ZIKV-E/ZIKV, mesmo com o desafio, o animal imunizado com ZIKV-E possuiu um útero com morfologia preservada.



5

10

**Figura 48. Compilado de fotos comparativas de placentas e fetos, cada imagem representando uma fêmea de cada grupo. De maneira clara, ainda que não ocorra a estatística nas medidas entre os fetos completamente formados, se destaca a viabilidade entre os grupos, onde se faz possível observar um maior número de reabsorções entre os grupos desafiados sem a imunização com a proteína ZIKV-E.**

## 5 6. CONCLUSÃO

Os dados sugerem que existe uma redução nos títulos virais que alcançam o tecido neuroprogenitor e que a vacina completa melhora a efetividade da resposta imune com anticorpos potencialmente neutralizantes, com a indução de ativação de células que expressam IFN- $\gamma$  e CD107a, promove a imunidade de memória e reduz a ocorrência de malformações na prole, o que sugere que a vacina promove de forma eficaz a entrega da proteína ZIKV-E às células do sistema imune, induzindo uma resposta segura e viável para um candidato vacinal.

A magnitude dos efeitos morfológicos foi claramente relacionada à imunização prévia ao desafio com ZIKV, sugerindo que o estado imunológico materno interfere diretamente na prole, e uma resposta imune protetora reduz os efeitos da SCZ.

Ainda que a geração da prole entre animais WT possuisse uma redução entre os dados estatísticos que poderiam gerar, a viabilidade foi clara e concisa correlacionando com a viabilidade de cada prole. Diante dos dados apresentados, é possível sugerir que a vacina promoveu de forma eficaz a entrega da proteína ZIKV-E às células do sistema imune, o que induziu uma resposta eficaz, segura e viável para um candidato vacinal.

## 5 7. PERSPECTIVAS

O estudo apresentado traz, de forma geral, os aspectos de uma vacina de subunidade recombinante utilizando nanobastões de ouro frente a um desafio com o vírus Zika. Alguns pontos recorrentes que podem ser continuados em estudo são:

- 10 • O uso de excipientes que auxiliem na estabilidade da ligação da proteína ao nanobastão para uma conservação prolongada do candidato vacinal;
- O trabalho com a prole ser continuada, como qual o efeito no animal nascido após o tratamento e desafio, como uma análise comportamental e fisiológica;
- Estudos envolvendo animais deficientes ou nocauteados para determinadas vias da  
15 resposta imune, a fim de elucidar qual o mecanismo de entrada do nanobastão na célula e seu potencial uso para a entrega de outros fármacos;
- A caracterização da resposta vacinal em linhagens suscetíveis ao vírus e que podem desenvolver a patologia, a fim de verificar o efeito no animal vacinado, sem correlacionar com um modelo de prenhez.

20

## 5 8. REFERÊNCIAS

- ABBINK, Peter; STEPHENSON, Kathryn E.; BAROUCH, Dan H.. Zika virus vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 594-600, 19 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0039-7>.
- 10 AKTAS, Esin *et al.* Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. **Cellular Immunology**, [S.L.], v. 254, n. 2, p. 149-154, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.08.007>.
- AMENDOLA, Vincenzo; MENEGHETTI, Moreno. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S.L.], v. 11, n. 20, p. 3805-3821, jun. 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b900654k>.
- 15 ANDRADE, Cherley Borba Vieira *et al.* ZIKV Disrupts Placental Ultrastructure and Drug Transporter Expression in Mice. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, n. 680246, p. 1-19, 21 maio 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.680246>.
- 20 ASIF, Arun *et al.* Zika Virus: immune evasion mechanisms, currently available therapeutic regimens, and vaccines. **Viral Immunology**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 682-690, dez. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/vim.2017.0046>.
- AUBRY, Fabien *et al.* Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. **Nature Communications**, [S.L.], v. 12, n. 916, p. 1-14, 10 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-21199-z>.
- 25 ÁVILA-PÉREZ, Ginés *et al.* Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. **Viruses**, [S.L.], v. 10, n. 597, p. 1-22, 31 out. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v10110597>.
- 30 BAGNO, Flávia Fonseca *et al.* Chikungunya E2 Protein Produced in E. coli and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 939, p. 1-12, 26 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12090939>.
- 35 BAGNO, Flávia Fonseca. **PRODUÇÃO HETERÓLOGA, EM SISTEMA PROCARIOTO, DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DOS VÍRUS ZIKA E CHIKUNGUNYA E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL PARA O USO EM FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS**. 145 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- 40 BOYD, Kelli L. *et al.* FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM. In: TREUTING, Piper M. *et al.* **Comparative Anatomy and Histology**. [S.I.]: Elsevier, 2018. Cap. 17. p. 303-334. [Http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00017-8](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00017-8).

- 5 BYERS, Shannon L. *et al.* Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 435538, p. 1-6, 13 abr. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>.
- CAMARGOS, Vidyleison N. *et al.* In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. 10 **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 44, n. -, p. 516-529, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.014>.
- CHAN, Yee Teng *et al.* Immune Recognition versus Immune Evasion Systems in Zika Virus Infection. **Biomedicines**, [S.L.], v. 11, n. 642, p. 1-19, 20 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines11020642>.
- 15 CHANG, Christopher *et al.* The Zika outbreak of the 21st century. **Journal Of Autoimmunity**, [S.L.], v. 68, p. 1-13, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.02.006>.
- CLARKE, B.D. *et al.* Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. **Virus Research**, [S.L.], v. 206, n. 1, p. 53-61, ago. 2015. Elsevier BV. 20 <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.026>.
- CLOGSTON, Jeffrey D.; PATRI, Anil K.. Zeta Potential Measurement. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], v. 697, n. 1, p. 63-70, 19 out. 2010. Humana Press. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6).
- COSTA, Hernan H. M. da *et al.* Production of Recombinant Zika Virus Envelope Protein by Airlift Bioreactor as a New Subunit Vaccine Platform. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 1813955, p. 1-25, 11 set. 2023. MDPI AG. 25 <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241813955>.
- DANIEL, Marie-Christine *et al.* Gold Nanoparticles: •• assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 104, n. 1, p. 293-346, jan. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr030698+>. 30
- DIAMOND, Michael S.; LEDGERWOOD, Julie E.; PIERSON, Theodore C.. Zika Virus Vaccine Development: progress in the face of new challenges. **Annual Review Of Medicine**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 121-135, 27 jan. 2019. Annual Reviews. 35 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-040717-051127>.
- DICK, G.W.A *et al.* Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).
- DIUPOTEX, Mariana *et al.* Alpha-galactosylceramide as adjuvant induces protective cell-mediated immunity against *Leishmania mexicana* infection in vaccinated BALB/c mice. 40 **Cellular Immunology**, [S.L.], v. 386, n. 104692, p. 1-11, abr. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2023.104692>.

- 5 DONALD, Claire L. *et al.* Full Genome Sequence and sRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 1-20, 5 out. 2016. Public Library of Science (PLoS).  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005048>.
- 10 DULBECCO, Renato. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, California, v. 38, n. 8, p. 747-752, ago. 1952. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.38.8.747>.
- 15 DUTTA, Sudip Kumar; LANGENBURG, Thomas. A Perspective on Current Flavivirus Vaccine Development: a brief review. **Viruses**, [S.L.], v. 15, n. 860, p. 1-23, 28 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v15040860>.
- FENG, Huapeng *et al.* A Glycolipid Adjuvant, 7DW8-5, Enhances the Protective Immune Response to the Current Split Influenza Vaccine in Mice. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 2157, p. 1-9, 18 set. 2019. Frontiers Media SA.  
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02157>.
- 20 FERRARIS, Pauline *et al.* Zika virus infection: an update. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 21, n. 9, p. 353-360, out. 2019. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2019.04.005>.
- 25 FERREIRA, Cyntia Silva *et al.* Uso de nanobastões de ouro para o desenvolvimento de aulas práticas de nanotecnologia. **Química Nova**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 594-601, 14 fev. 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170021>.
- FERREIRA, João Pedro Ribeiro Barbosa *et al.* Complicações da infecção congênita por Zika vírus / Complications of congenital Zika virus infection. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 36840-36848, 11 maio 2022. South Florida Publishing LLC.  
<http://dx.doi.org/10.34117/bjdv8n5-273>.
- 30 FUJII, Shin-Ichiro *et al.* Activation of Natural Killer T Cells by  $\alpha$ -Galactosylceramide Rapidly Induces the Full Maturation of Dendritic Cells In Vivo and Thereby Acts as an Adjuvant for Combined CD4 and CD8 T Cell Immunity to a Coadministered Protein. **The Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 198, n. 2, p. 267-279, 21 jul. 2003. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20030324>.
- 35 GATHERER, Derek; KOHL, Alain. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 97, n. 2, p. 269-273, 1 fev. 2016. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000381>.
- 40 GIRON, Sandra *et al.* Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 24, n. 45, p. 1-4, 7 nov. 2019. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.45.1900655>.

- 5 GÓMEZ, Marcela *et al.* Aedes aegypti and Ae. albopictus microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission?. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 287, n. 15, p. 1-13, 9 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-022-05401-9>.
- 10 GOUGH, Portia; MYLES, Ian A.. Tumor Necrosis Factor Receptors: pleiotropic signaling complexes and their differential effects. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, n. 585880, p. 1-14, 25 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.585880>.
- GREGORY, Christopher J *et al.* Modes of Transmission of Zika Virus. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 216, n. 10, p. 875-883, 15 dez. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix396>.
- 15 HASHIMOTO, Masao *et al.* Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 11, n. 028464, p. 1-17, 3 nov. 2019. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a028464>.
- 20 HAUGH, Matthew G. *et al.* Crosslinking and Mechanical Properties Significantly Influence Cell Attachment, Proliferation, and Migration Within Collagen Glycosaminoglycan Scaffolds. **Tissue Engineering Part A**, [S.L.], v. 17, n. 9-10, p. 1201-1208, maio 2011. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0590>.
- 25 INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) – **Virus Taxonomy: 2022 Release**. Email ratification March 2023 (MSL #38). Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy/>. Acesso em: abr. 2024.
- KASPRZYKOWSKI, José I. *et al.* A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: is there a risk of a new epidemic?. **International Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 96, p. 579-581, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.090>.
- 30 KUBACKOVA, Jana; ZBYTOVSKA, Jarmila; HOLAS, Ondrej. Nanomaterials for direct and indirect immunomodulation: A review of applications. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 142, p.1-53, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105139>.
- 35 KUNO, G.; CHANG, G.-J. J.. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 152, n. 4, p. 687-696, 3 jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC.
- LABIB, Bisant A.; CHIGBU, Degaulle I.. Pathogenesis and Manifestations of Zika Virus-Associated Ocular Diseases. **Tropical Medicine And Infectious Disease**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 106 - 127, 15 jun. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed7060106>.
- 40 LAZEAR, Helen M. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 720-730, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.010>.

- 5 LEDER, Karin *et al.* Zika beyond the Americas: travelers as sentinels of zika virus transmission. a geosentinel analysis, 2012 to 2016.. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 1-23, 3 out. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0185689>.
- LEE, Ina *et al.* Probing Molecular Insights into Zika Virus–Host Interactions. **Viruses**, [S.L.], v. 233, n. 10, p. 1-26, 2 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v10050233>.
- 10 LI, Guanxing; ZHANG, Hui; HAN, Yu. Applications of Transmission Electron Microscopy in Phase Engineering of Nanomaterials. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 123, n. 17, p. 10728-10749, 29 ago. 2023. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00364>.
- 15 LI, Xiangming *et al.* Design of a potent CD1d-binding NKT cell ligand as a vaccine adjuvant. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 107, n. 29, p. 13010-13015, 2 jul. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1006662107>.
- 20 LI, Xiangming *et al.* A potent adjuvant effect of a CD1d-binding NKT cell ligand in human immune system mice. **Expert Review Of Vaccines**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 73-80, 16 nov. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14760584.2017.1256208>.
- LIMA, Noemia S. *et al.* T Cell Immunity and Zika Virus Vaccine Development. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 38, n. 8, p. 594-605, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.05.004>.
- 25 LIU, Huanliang *et al.* Comparative study of respiratory tract immune toxicity induced by three sterilisation nanoparticles: Silver, zinc oxide and titanium dioxide. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 248-249, p.478-486, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.046>.
- 30 LIU, Yuanchang *et al.* Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system. **Seminars In Immunology**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.25-32, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2017.09.011>.
- LUNARDELLI, Victória Alves Santos *et al.* Diagnostic and vaccine potential of Zika virus envelope protein (E) derivatives produced in bacterial and insect cells. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 14, n. 1071041, p. 1-14, 16 mar. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2023.1071041>.
- 35 MAJUMDER, Parimal *et al.* The Murine MHC Class II Super Enhancer IA/IE-SE Contains a Functionally Redundant CTCF-Binding Component and a Novel Element Critical for Maximal Expression. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 206, n. 9, p. 2221-2232, 1 maio 2021. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.2001089>.
- 40 MINER, Jonathan J. *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, [S.L.], v. 165, n. 5, p. 1081-1091, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008>.

- 5 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde (ed.). **Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2023**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-05/view>. Acesso em: 06 mar. 2024.
- 10 MORAES, Thaís de Fátima Silva. **DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS VACINAIS CONTRA O VÍRUS ZIKA UTILIZANDO A PROTEÍNA DO ENVELOPE VIRAL, RECOMBINANTE, FUNCIONALIZADA OU NÃO EM NANOBASTÕES DE OURO**. 2022. 169 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.
- 15 MORAES, Thaís F. S. *et al.* A methanol extract and N, N-dimethyltryptamine from *Psychotria viridis* Ruiz & Pav. inhibit Zika virus infection in vitro. **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 166, n. 12, p. 3275-3287, 18 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-021-05230-8>.
- 20 MURRAY, Stephen A. *et al.* Mouse Gestation Length Is Genetically Determined. **Plos One**, [S.L.], v. 5, n. 812418, p. 1-7, 25 ago. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012418>.
- NACCACHE, Samia N. *et al.* Distinct Zika Virus Lineage in Salvador, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 22, n. 10, p. 1788-1792, out. 2016. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2210.160663>.
- 25 NARASIMHAN, Harish *et al.* Animal models of congenital zika syndrome provide mechanistic insight into viral pathogenesis during pregnancy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 10 (e0008707), p. 1-20, 22 out. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008707>.
- 30 NIIKURA, Kenichi *et al.* Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. **Acs Nano**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 3926-3938, 16 maio 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/nn3057005>.
- 35 NUNES, Magda Lahorgue *et al.* Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria**, [S.L.], v. 92, n. 3, p. 230-240, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.02.009>.
- 40 PAHO - Pan American Health Organization. **PLISA Health Information Platform for the Americas: Cases of Zika virus disease, by country or territory**. Regional Office for the Americas of the World Health Organization; Disponível em: [https://www3.paho.org/data/index.php/en/?option=com\\_content&view=article&id=524:zikawEEKly-en&Itemid=352](https://www3.paho.org/data/index.php/en/?option=com_content&view=article&id=524:zikawEEKly-en&Itemid=352) Acesso em fev. 2024.
- PARDY, Ryan D.; RICHER, Martin J.. Protective to a T: the role of t cells during zika virus infection. **Cells**, [S.L.], v. 8, n. 820, p. 1-11, 3 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8080820>.

- 5 PATTNAIK, Aryamav; SAHOO, Bikash R.; PATTNAIK, Asit K.. Current Status of Zika Virus Vaccines: successes and challenges. **Vaccines**, [S.L.], v. 8, n. 266, p. 1-19, 31 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines8020266>.
- PENG, Zhe-Yu *et al.* A review on Zika vaccine development. **Pathogens And Disease**, [S.L.], v. 82, n. 036, p. 1-9, 8 jan. 2024. Oxford University Press (OUP).  
10 <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftad036>.
- PERSAD, Amanda S. *et al.* **TOXICOLOGICAL REVIEW OF UREA: In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS)**. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2011. 96 p. EPA/635/R-10/005F; the reader is referred to EPA's IRIS Hotline at (202) 566-1676 (phone), (202) 566-1749 (fax), or  
15 [hotline.iris@epa.gov](mailto:hotline.iris@epa.gov) (email address).. Disponível em: <https://iris.epa.gov/static/pdfs/1022tr.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2024.
- PETERSEN, Lyle R. *et al.* Zika Virus. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 374, n. 16, p. 1552-1563, 21 abr. 2016. Massachusetts Medical Society.  
<http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1602113>
- 20 PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S.. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 796-812, 4 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>.
- PLUMLEE, Courtney R. *et al.* Early Effector CD8 T Cells Display Plasticity in Populating the Short-Lived Effector and Memory-Precursor Pools Following Bacterial or Viral  
25 Infection. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-13, 20 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep12264>.
- POLAND, Gregory A *et al.* Development of vaccines against Zika virus. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. e211-e219, jul. 2018. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30063-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30063-x).
- 30 POLAND, Gregory A. *et al.* Zika Vaccine Development: current status. **Mayo Clinic Proceedings**, [S.L.], v. 94, n. 12, p. 2572-2586, dez. 2019. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.05.016>.
- POLLARD, Andrew J.; BIJKER, Else M.. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 83-100, 22 dez.  
35 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>.
- QAZI, Umair Yaqub; JAVAID, Rahat. A Review on Metal Nanostructures: preparation methods and their potential applications. **Advances In Nanoparticles**, [S.L.], v. 05, n. 01, p. 27-43, fev. 2016. Scientific Research Publishing, Inc..  
40 <http://dx.doi.org/10.4236/anp.2016.51004>.
- RODRIGUEZ-QUIJADA, Cristina *et al.* Physical Properties of Biomolecules at the Nanomaterial Interface. **The Journal Of Physical Chemistry B**, [S.L.], v. 122, n. 11, p.

- 5 2827-2840, 26 fev. 2018. American Chemical Society (ACS).  
<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b00168>.
- ROTH, Nicole M. *et al.* **Zika-Associated Birth Defects Reported in Pregnancies with Laboratory Evidence of Confirmed or Possible Zika Virus Infection: u.s. zika pregnancy and infant registry, December 1, 2015 – march 31, 2018.** **Morbidity And Mortality Weekly**  
10 **Repor**, Atlanta, Ga, v. 71, n. 3, p. 73-79, 21 jan. 2022. Semanal. The MMWR series of publications is published by the Center for Surveillance, Epidemiology, and Laboratory Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
- SAFINA, Ingrid *et al.* Gold nanorods enhance different immune cells and allow for efficient targeting of CD4+ Foxp3+ Tregulatory cells. Plos One, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 1-19, 30 ago.  
15 2021. **Public Library of Science (PLOS)**. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0241882>.
- SEKARAN, Shamala Devi *et al.* Host immune response against DENV and ZIKV infections. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-15, 8 set. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.975222>.
- SENGUPTA, Anirban *et al.* Efficacy and Immune Response Elicited by Gold Nanoparticle-Based Nanovaccines against Infectious Diseases. **Vaccines**, [S.L.], v. 10, n. 505, p. 1-22, 24  
20 mar. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines10040505>.
- SES - Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais (ed.). **Boletim Epidemiológico de Monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika (26/3)**. Disponível em:  
25 <https://www.saude.mg.gov.br/component/gmg/story/19619-boletim-epidemiologico-de-monitoramento-dos-casos-de-dengue-chikungunya-e-zika-26-3>. Acesso em: 02 abr. 2024.
- SHAH, Ankit; DOBROVOLSKAIA, Marina A.. Immunological effects of iron oxide nanoparticles and iron-based complex drug formulations: Therapeutic benefits, toxicity, mechanistic insights, and translational considerations. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.977-990, abr. 2018. Elsevier BV.  
30 <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2018.01.014>.
- SHAN, Chao *et al.* A Rapid Zika Diagnostic Assay to Measure Neutralizing Antibodies in Patients. **Ebiomedicine**, [S.L.], v. 17, p. 157-162, mar. 2017. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.006>.
- SHARMA, Vikrant *et al.* Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Canadian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 87-98, fev. 2020. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2019-0331>.
- SIMMONDS, Peter *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 2-3, 1 jan. 2017. Microbiology Society.  
<http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000672>; Posted January 2017, updated February 2019.
- 40 SONG, Byung-Hak *et al.* Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal Of Neuroimmunology**, [S.L.], v. 308, n. 1, p. 50-64, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>.

- 5 SONG, Hyun Keun; HWANG, Dae Youn. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. **Laboratory Animal Research**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 119-123, jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.119>.
- 10 TERZIAN, Ana Carolina B. *et al.* Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 16084, p. 1-16, 30 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34423-6>.
- 15 TSUJI, Moriya *et al.* An immunostimulatory glycolipid that blocks SARS-CoV-2, RSV, and influenza infections in vivo. **Nature Communications**, [S.L.], v. 14, n. 3949, p. 1-14, 5 jul. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-39738-1>.
- TO, Albert *et al.* Recombinant Zika Virus Subunits Are Immunogenic and Efficacious in Mice. **Mosphere**, [S.L.], v. 3, n. 100576-17, p. 1-16, 28 fev. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00576-17>.
- 20 TODOROV, Helena *et al.* CD8 memory precursor cell generation is a continuous process. **Iscience**, [S.L.], v. 25, n. 104927, p. 1-21, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2022.104927>.
- 25 UNCINI, Antonino *et al.* Zika virus infection and Guillain-Barré syndrome: a review focused on clinical and electrophysiological subtypes. **Journal Of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, [S.L.], v. 88, n. 3, p. 266-271, 31 out. 2016. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2016-314310>.
- VERSIANI, Alice F. *et al.* Nanosensors based on LSPR are able to serologically differentiate dengue from Zika infections. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 10, n. 11302, p. 1-17, 9 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-68357-9>.
- 30 VERSIANI, Alice Freitas. **Utilização da tecnologia de nanobastões de ouro para geração de um protótipo vacinal contra Dengue virus 3**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- 35 WEN, Zhexing; SONG, Hongjun; MING, Guo-Li. How does Zika virus cause microcephaly? **Genes & Development**, [S.L.], v. 31, n. 9, p. 849-861, 1 maio 2017. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.298216.117>.
- 40 WHO. **ZIKA EPIDEMIOLOGY UPDATE**: February 2022. Disponível em: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/emergencies/zika/zika-epidemiology-update-february-2022-clean-version.pdf?sfvrsn=c4cec7b7\\_1&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/emergencies/zika/zika-epidemiology-update-february-2022-clean-version.pdf?sfvrsn=c4cec7b7_1&download=true). Acesso em: 15 fev. 2024.

- 5 XIE, Xueping *et al.* The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 7, n. 3728, p. 1-9, 19 jun. 2017. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-04229-z>.
- 10 YEASMIN, Mahmuda *et al.* Safety and immunogenicity of Zika virus vaccine: a systematic review of clinical trials. **Reviews In Medical Virology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 1-10, 20 ago. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.2385>.
- ZANLUCA, Camila *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 110, n. 4, p. 569-572, 9 jun. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150192>.
- 15 ZERBINI, Francisco Murilo *et al.* Changes to virus taxonomy and the ICTV Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2023). **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 168(7):175, p. 1-11, 10 jun. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-023-05797-4>.
- 20 ZHENG, Jiapeng *et al.* Gold Nanorods: the most versatile plasmonic nanoparticles. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 121, n. 21, p. 13342-13453, 27 set. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00422>.

## 5 9. ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 23/2022  
**Título do projeto:** Desenvolvimento de um protótipo vacinal contra o Zika virus utilizando a proteína do envelope viral, recombinante, funcionalizada em Nanobastões de ouro  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Flavio Guimaraes da Fonseca  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Microbiologia

**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 28/03/2022. Validade: 28/03/2022 à 27/03/2027.  
Belo Horizonte, 28/03/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)  
 Universidade Federal de Minas Gerais  
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
 Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prog.ufmg.br](mailto:cetea@prog.ufmg.br)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 168/2022  
**Título do projeto:** Desenvolvimento de um protótipo vacinal contra o Zika virus utilizando a proteína do envelope viral, recombinante, funcionalizada em Nanobastões de ouro - Desafio  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Flavio Guimaraes da Fonseca  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Microbiologia

**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 29/08/2022. Validade: 29/08/2022 à 28/08/2027.  
Belo Horizonte, 29/08/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)  
 Universidade Federal de Minas Gerais  
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
 Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prog.ufmg.br](mailto:cetea@prog.ufmg.br)