

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

THAÍS DE FÁTIMA SILVA MORAES

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

Belo Horizonte

2022

THAÍS DE FÁTIMA SILVA MORAES

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

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Guimarães da Fonseca.

Coorientadoras: Dra. Alice Freitas Versiani

Dra. Raissa Prado Rocha

Belo Horizonte

2022

043

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 [manuscrito] / Thaís de Fátima Silva Moraes. – 2022. 170 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Guimarães da Fonseca. Coorientadoras: Dra. Alice Freitas Versiani; Dra. Raissa Prado Rocha.

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

1. Microbiologia. 2. Zika virus. 3. Vacinas de Subunidades. 4. Nanotecnologia. I. Fonseca, Flavio Guimarães da. II. Versiani, Alice Freitas. III. Rocha, Raissa Prado. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



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

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **THAÍS DE FÁTIMA SILVA MORAES**

Nº REGISTRO: **2018752680**

Às 08:30 horas do dia **16 de setembro de 2022**, reuniu-se presencialmente no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Daniele da Glória de Souza (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Lídia Maria de Andrade (Departamento de Genética, Ecologia e Evolução/ICB/UFMG), Estefânia Mara do Nascimento Martins (CDTN), Jaqueline Germano de Oliveira (FIOCRUZ), Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador), Dra. Alice Freitas Versiani (Coorientadora) e Dra. Raíssa Prado Rocha (Coorientadora), para julgar o trabalho final **“Desenvolvimento de candidatos vacinais contra o vírus Zika utilizando a Proteína do Envelope viral, recombinante, funcionalizada ou não em Nanobastões de Ouro”** da aluna **Thaís de Fátima Silva Moraes**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da Banca:

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

Profa. Dra. Lídia Maria de Andrade

Profa. Dra. Estefânia Mara do Nascimento Martins

Profa. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

De acordo:

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

(Orientador)

Dra. Alice Freitas Versiani
(Coorientadora)

Dra. Raíssa Prado Rocha
(Coorientadora)

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



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 19/09/2022, às 13:36, 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 **Jaqueline Germano de Oliveira, Usuário Externo**, em 19/09/2022, às 14:03, 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 **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 19/09/2022, às 14:30, 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 **Lidia Maria de Andrade, Usuário Externo**, em 20/09/2022, às 10:59, 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 **Alice Freitas Versiani, Usuária Externa**, em 21/09/2022, às 10:58, 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 **Raissa Prado Rocha, Usuário Externo**, em 21/09/2022, às 14:10, 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 03/10/2022, às 19:08, 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 03/11/2022, às 11:56, 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, informando o código verificador **1681223** e o código CRC **07FAD7C3**.

Agradecimentos

Engana-se quem acredita que o caminho percorrido ao longo do desenvolvimento de um trabalho de doutorado é apenas profissional. Muito pelo contrário, ele nos molda e nos forma, em todas as áreas da nossa vida. Chego aqui mais humana, reconhecendo o quanto sou vulnerável, mas também reconhecendo o quão forte e resiliente sou e ainda posso ser. Finalizar uma etapa tão significativa, jamais seria possível sem o apoio e participação de muitas pessoas.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por sua bondade e misericórdia infinita. Por me conceder a oportunidade de realizar esse trabalho ao lado de profissionais tão brilhantes, e por sempre colocar ao meu lado pessoas de tão bom coração.

Agradeço a minha família. Minha mãe, minha avó, irmãos e sobrinha, por suas orações que me sustentam, por sempre me apoiarem e serem meu porto seguro. Ao José, por ser minha fonte de amor mais pura.

Agradeço ao meu orientador Flávio, por ter aberto as portas de seu laboratório a me receber, e por me mostrar com seu exemplo de vida, o quanto um profissional pode ser brilhante e humano ao mesmo tempo. Agradeço as minhas co-orientadoras Alice e Raissa, e também à Flávia, que foram essenciais na realização desse trabalho.

Agradeço ao Mateus, com quem aprendi como é essencial ter um amor leve, tranquilo e que nos sustente nessa caminhada. Obrigada por tudo. Agradeço a todos os familiares e amigos, em especial a Ariane e as meninas com quem dividi a casa e a vida, obrigada pela amizade e companheirismo, essenciais para toda vida humana.

Agradeço aos colegas de trabalho do LVBA e do CT Vacinas, pela acolhida e conhecimento compartilhado, por toda ajuda, consolo nos dias difíceis e pelos nossos cafés. Agradeço a Debora e Tiago por serem tão solícitos sempre. A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, em especial as professoras Jordana e Edel, por contribuírem de maneira crucial em minha formação. Aos profissionais exímios que fazem parte da banca, obrigada pela disponibilidade em avaliarem esse trabalho.

Por fim, agradeço a UFMG pela acolhida em tão belo e acolhedor Campus, as agências de fomento (CNPq, Capes, Fapemig e Finep Zika) pelo apoio financeiro e a todos os colaboradores, o meu muito obrigada.

“Agora, finalmente, estavam começando o Capítulo Um da Grande História que ninguém na terra jamais leu: a história que continua eternamente e na qual cada capítulo é muito melhor do que o anterior.”

C.S. Lewis (Nárnia — A Última Batalha)

Que venham novos capítulos dessa história.

“É justo que muito custe, o que muito vale”

Santa Teresa d’Avila

RESUMO

Por décadas, as infecções causadas pelo vírus Zika (ZIKV) foram negligenciadas em função de seus sintomas leves e número limitado de casos. Nos últimos anos, a rápida disseminação do ZIKV e sua ligação inesperada com a síndrome congênita do Zika e a síndrome de Guillain-Barré transformaram o vírus em um problema emergente de saúde pública de interesse global, para o qual não há vacina disponível. Dentre as áreas que se apresentam de forma atrativa e com grande potencial de utilização no desenvolvimento de plataformas vacinais eficientes, a nanotecnologia tem ganho destaque, principalmente as nanopartículas de ouro. Suas propriedades ópticas e químicas únicas permitem sua ligação a moléculas orgânicas, como proteínas, incluindo seu uso como carreadores vacinais. No presente trabalho, mostramos a expressão heteróloga e purificação da proteína do envelope do ZIKV (ZIKV-E), a funcionalização de nanobastões de ouro comerciais (Nanopartz) com a proteína ZIKV-E e a caracterização da vacina experimental produzida. Finalmente, avaliamos a resposta imune celular e humoral gerada após a imunização de camundongos BALB/c com a proteína produzida e com os nanobastões de ouro ligados à proteína, cada qual combinado com os adjuvantes vacinais monofosforil A lipídio (análogo de LPS) e 7DW8-5 (análogo α -GalCer) e também com alumínio. Para isso, produzimos em *E. coli* BL21 e purificamos uma versão recombinante da proteína E de ZIKV (ZIKV-E) truncada em sua porção C-terminal. A proteína purificada foi reconhecida por anticorpos Anti-His e Panflavi 4G2 em ensaios de western-blot. Na sequência, os nanobastões de ouro foram funcionalizados com a proteína recombinante produzida e a ferramenta caracterizada por espectroscopia UV/Vis, avaliação do potencial zeta, avaliação do raio hidrodinâmico e fluorometria, confirmando a ligação da proteína à superfície dos nanobastões de ouro. Após a imunização dos camundongos com as vacinas experimentais, 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 dos animais imunizados com atividade polifuncional de secreção de importantes citocinas em um contexto de infecção viral e ativação de células de memória. Observamos aumento do IFN- γ secretado por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no grupo imunizado com a vacina experimental completa, além disso, avaliamos a presença do marcador CD127, em populações com fenótipos de memória efetora (CD44⁺) e central (CD44⁺CD62L⁺). Juntos, nossos resultados são significativos e o imunógeno promissor para novos ensaios. Os próximos passos deste trabalho incluem avaliar a proteção desta vacina experimental frente a um desafio com ZIKV.

Palavras-chave: vírus Zika, vacina de subunidade, nanobiotecnologia, nanobastões de ouro.

ABSTRACT

For decades, infections caused by the Zika virus (ZIKV) were neglected because of their usual mild symptoms and limited number of cases. In recent years, however, the rapid spread of ZIKV and its unexpected link to congenital Zika syndrome and Guillain-Barré syndrome have turned the virus into an emerging public health problem of global concern, for which no vaccine is available. Among the areas that present themselves in an attractive way and with great potential for use in the development of efficient vaccine platforms, nanotechnology has gained prominence, especially gold nanoparticles, for their unique optical and chemical properties that allow their binding to organic molecules, such as proteins, including their use as vaccine carriers. In the present work, we show the heterologous expression and purification of the Zika virus envelope protein (ZIKV-E), the functionalization of commercial gold nanorods (Nanopartz) with the produced protein and the characterization of the experimental vaccine produced. Finally, we evaluated the cellular and humoral immune response generated after immunization of BALB/c mice with the produced protein and with the protein-bound gold nanorods, each combined with the vaccine adjuvants monophosphoryl lipid A (LPS analog) and 7DW8-5 (α -GalCer analogue) and also with alum. For this, we produced in *E. coli* BL21 and purified a recombinant version of the ZIKV protein E (ZIKV-E) truncated in its C-terminal portion. The purified protein was recognized by Anti-His and Panflavi 4G2 antibodies in western-blot assays. Subsequently, commercial gold nanorods were functionalized with the recombinant protein produced and the tool characterized by UV/Vis spectroscopy, evaluation of the zeta potential, evaluation of the hydrodynamic radius and by fluorometry, confirming the binding of the protein to the surface of gold nanorods. Upon mice immunization with the experimental vaccines, high levels of anti-ZIKV neutralizing antibodies were detected. Besides that, experimental vaccines were able to induce the activation of immune system cells from immunized animals with polyfunctional activity of secretion of important cytokines in a context of viral infection and activation of memory cells. We observed an increase in IFN- γ secreted by specific CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the group immunized with the complete experimental vaccine, in addition, we evaluated the presence of the CD127 marker, in populations with the effector (CD44⁺) and central (CD44⁺ CD62L⁺) memory phenotype. Together, our results are significant, and the immunogen promising for further trials. The next steps of this work include evaluating the protection of this experimental vaccine in the face of a challenge with ZIKV.

Keywords: Zika virus, subunit vaccine, nanobiotechnology, goldnanorods.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -GalCer – alfa-galactosilceramida

ADE – *Antibody Dependent Enhancement* (aprimoramento dependente de anticorpo)

Al - alumínio

ATCC – *American Type Culture Collection* (Coleção de Cultura de tipo Americano)

BARDA - Autoridade de Pesquisa e Desenvolvimento Biomédico Avançado

BG250 - *Coomassie brilliant blue* (Coomassie azul brilhante)

BHK-21 - Baby Hamster Kidney fibroblasts

BoHV-1 - Bovine herpesviruses type 1 (Herpesvírus bovino tipo 1)

BrdU - bromodesoxiuridina

BVDV - Bovine viral diarrhea virus (vírus da diarreia viral bovina)

cDNA – DNA complementar

CHIKV - Chikungunya virus (vírus Chikungunya)

CMC – Carboximetilcelulose

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

DENV – Dengue vírus (vírus da Dengue)

DMEM – Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco

DT - Difteria e Tétano

EDAC - N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

GNP – *Gold nanoparticles* (Nanopartículas de ouro)

GNR – *Gold nanorods* (Nanobastões de ouro)

H₂O_{dd} - água destilada e deionizada

HBV – Hepatite B virus (vírus da Hepatite B)

HCV – Hepatite C virus (vírus da Hepatite C)

HEV – Hepatite E virus (vírus da Hepatite E)

HIV - Human Immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)

HPV - Human papilloma virus (vírus do papiloma humano)

HSV-1 – Herpes simplex virus (vírus herpes simples)

IFN- α – Interferon alfa

IFN- β – Interferon beta

IFN- γ – Interferon gama

IgG - imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

IL-1 β - interleucina-1 β

IPTG - isopropil-b-D-galactosídeo

JEV - Japanese encephalitis virus (vírus da encefalite Japonesa)

LB - Linfócitos B

LPS - Lipopolissacarídeo bacteriano

LSPR - *localized surface plasmon resonance* (ressonância de plasmon de superfície localizado)

LT – Linfócitos T

MAbs - anticorpos monoclonais

MAYV – Mayaro virus (vírus Mayaro)

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MFA – Microscopia de Força Atômica

MFE - Microscopia de Força Elétrica

MHC - *Major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

MPLA - Lipídio Monofosforil A

MTT – brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação em Biotecnologia)

NIAID - National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas)

NIR - Espectroscopia de infravermelho próximo

NHS - N-hidroxisuccinimida

NK - *natural killer*

ORF - *open reading frame* (fase de leitura aberta)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PDB - *Protein Data Bank* (banco de dados de proteínas)

PERL - *Practical extraction and report language* (extração prática e linguagem de relatório)

PIV – *purified inactivated virus* (vírus inativado purificado)

PRNT - *Plaque reduction neutralization test* (teste de redução de placas por neutralização)

PVDF - Polyvinylidene difluoride

RE - retículo endoplasmático

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium* (Meio Instituto Memorial Roswell Park)

RT-PCR - *Reverse transcription polimerase chain reaction* (Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase)

SERS – *Surface-enhanced Raman spectroscopy* (Espectroscopia Raman amplificada por superfície, ou dispersão)

SGB - síndrome de Guillain-Barré

SNP – Nanopartículas de prata

UFP – Unidade formadora de placas

SFB – Soro fetal bovino

SINV – Sindbis virus (vírus Sindbis)

TBEV - Tick-borne encephalitis virus (vírus da encefalite transmitida por carrapatos)

TMB - tetrametilbenzidina

VACV – Vaccinia virus (vírus Vaccinia)

VSV – Vesicular stomatitis virus (vírus da estomatite vesicular)

YFV – Yellow fever virus (vírus da Febre Amarela)

ZIKV – Zika virus (vírus Zika)

WEE - Western equine encephalomyelitis virus (vírus da encefalite equina do Oeste)

WNV - West Nile virus (vírus do oeste do Nilo)

WRAIR - Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ocorrência do ZIKV no mundo.....	21
Figura 2. Representação esquemática da partícula viral dos flavivírus.....	23
Figura 3. Estrutura do genoma de Flavivírus e expressão de proteínas.....	24
Figura 4. Esquema dos estágios propostos para o processo de fusão dos flavivírus.....	25
Figura 5. Ciclo de multiplicação dos flavivírus.....	26
Figura 6. Representação dos 3 Domínios da glicoproteína do Envelope do ZIKV.....	27
Figura 7. Representação de nanoestruturas.....	52
Figura 8. Taça de Lycurgus.....	53
Figura 9. Micrografias eletrônicas de nanopartículas de ouro em várias formas e tamanhos.....	54
Figura 10. Esquema de oscilação de uma nanopartícula após irradiação de luz.....	57
Figura 11. Nanopartículas de ouro comumente usadas.....	58
Figura 12. Nanopartículas de ouro como nanocarreadores multifuncionais com conjugação de fármacos ou ligantes de direcionamento.....	61
Figura 13. Estratégias de Funcionalização GNP-Proteína.....	62
Figura 14. Caracterização dos GNR comerciais (Nanopartz).....	80
Figura 15. Estrutura química globular do ácido lipóico.....	81
Figura 16. Esquema do processo de funcionalização das Nanopartículas a proteína ZIKV-E.....	82
Figura 17. Estratégia de avaliação da resposta imune de camundongos Balb/c imunizados com ZIKV-E.....	86
Figura 18. Estratégia de gatte painel de ativação para avaliar ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ com expressão de CD69 de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	89
Figura 19. Estratégia de avaliação da capacidade dos linfócitos T produzirem de IFN- γ após estimulação com ZIKV-E.....	90
Figura 20. Estratégia de avaliação do fenótipo de memória de células T de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	90
Figura 21. Estratégia de avaliação da capacidade de secreção de TNF- α por células T de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	91
Figura 22. Estratégia de avaliação da expressão de CD127 em células T de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	92

Figura 23. Análise in silico de hidrofobicidade (ProtScale), tendência a porção transmembrana (TMHMM Server) e tendência a desordem estrutural (IUPRED) para ZIKV-E.....	99
Figura 24. Alinhamento, pelo Clustal Omega, comparando a sequência de ZIKV-E antes e após a otimização e remoção das porções transmembrana.....	100
Figura 25. Predição da estrutura tridimensional para ZIKV-E.....	101
Figura 26. Mapa do plasmídeo sintético desenvolvido contendo a sequência do gene de interesse.....	102
Figura 27. Restrição enzimática do DNA plasmidial para a confirmação da presença do gene de interesse no vetor pET-21a	103
Figura 28. SDS-Page das etapas envolvidas na padronização da expressão proteica de ZIKV-E (50 kDa).....	104
Figura 29. SDS-Page da avaliação da solubilidade da proteína ZIKV-E em ureia (2M, 4M, 6M e 8M).....	104
Figura 30. Processo de purificação da proteína recombinante ZIKV-E.....	105
Figura 31. SDS-Page da Purificação de ZIKV-E.....	106
Figura 32. SDS-Page de ZIKV-E após quantificação.....	106
Figura 33. SDS-Page de ZIKV-E após o processo de dialise.....	107
Figura 34. <i>Western-blot</i> mostrando a reação entre a proteína ZIKV-E e os anticorpos comerciais Anti-His e Panflavi 4G2.....	107
Figura 35. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas com LA.....	109
Figura 36. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas EDC-NHS.....	109
Figura 37. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas covalentemente com ZIKV-E.....	110
Figura 38. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas covalentemente com ZIKV-E.....	110
Figura 39. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas covalentemente com LA, EDC-NHS e ZIKV-E.....	111
Figura 40. Medida do Potencial Zeta.....	112
Figura 41. Medida do raio hidrodinâmico.....	113
Figura 42. Medida da fluorescência da ferramenta GNR-ZIKV-E após marcação com FITC	114

Figura 43. Ativação de linfócitos TCD4+ CD69+ e TCD8+ CD69+ de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	116
Figura 44. Dosagem de IFN- γ secretados por linfócitos TCD4+ e TCD8+ de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	117
Figura 45. Dosagem de IFN- γ secretados por linfócitos TCD8+ com marcador de superfície CD107a de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	118
Figura 46. Fenótipo de memória representativos de células T de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	119
Figura 47. Fenótipos de memória de células T CD4+ e CD4- de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	120
Figura 48. Análise de TNF- α secretados por células T CD3+ CD4+ e CD3+ CD4- com fenótipo de memória central e efetora de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E.....	121
Figura 49. Avaliação de células T CD3+ CD4+ e CD3+ CD4- de camundongos BALB/c com fenótipo de memória central e efetora com marcador de memória CD127.....	122
Figura 50. Resultados do ELISA anti-IgG ZIKV-E com soros dos animais imunizados.....	123
Figura 51. Resultados do Teste de redução de placas por neutralização (PRNT) com soros dos animais imunizados.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vacinas contra ZIKV em ensaios clínicos.....	37
Tabela 2. Características dos Nanobastões de Ouro comerciais (Nanopartz™).....	80
Tabela 3. Grupos experimentais utilizados para avaliação da Imunogenicidade.....	86
Tabela 4. Sequencias otimizadas dos genes codificadores de ZIKV-E.....	97
Tabela 5. Análises de porção transmembrana e hidrofobicidade de ZIKV-E.....	98
Tabela 6. Propriedades físico-química de ZIKV-E.....	100
Tabela 7. Resumo da avaliação da resposta imune de camundongos Balb/c imunizados com ZIKV-E.....	126

SUMÁRIO

1.	Introdução	19
1.1	Zika Vírus	19
1.1.1	A Febre Zika – Epidemiologia	19
1.1.2	Taxonomia viral	22
1.1.3	Estrutura e Genoma viral	22
1.1.4	Ciclo de multiplicação	24
1.1.5	Proteína do Envelope (E)	27
1.1.6	Manifestações clínicas	28
1.1.7	Diagnóstico e tratamento	29
1.1.8	Resposta imune ao Zika virus	31
1.2	Vacinas experimentais para Zika	35
1.2.1	Vacinas de vírus vivo atenuado	37
1.2.2	Vacinas de vírus inativado	38
1.2.3	Vacinas de Vetor viral recombinante.....	39
1.2.4	Vacinas de DNA	41
1.2.5	Vacinas de mRNA	43
1.2.6	Vacinas de subunidades recombinantes.....	44
1.2.7	Adjuvantes vacinais	46
1.2.7.1	Alúmen.....	48
1.2.7.2	Monofosforil lipídio A (MPLA).....	49
1.3	Nanotecnologia.....	51
1.3.1	Nanopartículas de Ouro (GNP).....	52
1.3.2	Processos de Síntese de GNP.....	54
1.3.3	Propriedades ópticas das Nanopartículas de Ouro (GNP).....	55
1.3.3.1	Ressonância de Plasmon de superfície	56
1.3.3.2	Cores do Ouro	57
1.3.4	Toxicidade Celular e Biocompatibilidade	59
1.3.5	Utilização de GNP na Medicina	60
1.3.6	Potencial imunogênico das GNP	64
2.	Justificativa	66
3.	Objetivos.....	68
3.1	Objetivo geral	68

3.2	Objetivos específicos	68
4.	Material e métodos.....	69
4.1	Fluxograma de trabalho	69
4.2	Análises de Bioinformática e Construção da sequência sintética de ZIKV-E.....	70
4.2.1	Desenho, síntese e subclonagem do gene de interesse.....	70
4.2.2	Análises <i>in silico</i> de ZIKV-E.....	71
4.3	Produção da proteína Recombinante ZIKV-E	72
4.3.2	Preparo de células competentes	72
4.3.3	Clonagem em bactérias <i>Escherichia coli</i> XL-10 quimiocompetentes.....	72
4.3.4	Extração de DNA plasmidial (Mini prep).....	73
4.3.5	Digestão do DNA plasmidial.....	73
4.3.6	Transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i> BL-21 quimiocompetentes	74
4.3.7	Padronização das condições ideais de produção de ZIKV-E	74
4.3.8	Produção e Purificação da proteína ZIKV-E recombinante	76
4.3.8.1	Verificação da eficiência da purificação.....	77
4.3.9	Quantificação Proteica.....	77
4.3.10	Díálise e Concentração das proteínas	78
4.3.11	Western blot.....	79
4.4	Nanobastões de Ouro (“ <i>GoldNanorods</i> ”).....	80
4.4.2	Funcionalização dos Nanobastões de Ouro (GNR)	81
4.4.2.1	Metodologia.....	81
4.4.2.2	Padronização do processo de funcionalização dos GNR.....	82
4.4.2.3	Verificação da eficiência da funcionalização	83
4.4.3	Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E.....	84
4.4.3.1	Espectroscopia UV-Vis-NIR	84
4.4.3.2	Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS).....	84
4.4.3.3	Detecção da formação do complexo GNR-ZIKV-E por fluorimetria	84
4.5	Avaliação da imunogenicidade da vacina experimental GNR-ZIKV-E.....	85
4.5.2	Estratégia de imunização	85
4.5.3	Avaliação da Resposta Imune Celular	87
4.5.2.1	Estratégias de Avaliação da Resposta Imune Celular por Citometria de Fluxo	89
4.5.4	Avaliação da Resposta Imune Humoral por Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)	

4.5.5	Avaliação da Resposta Imune Humoral por Teste de redução de placas por neutralização (PRNT).....	93
4.5.5.1	Células e vírus.....	93
4.5.5.1.1	Células C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>) e Vero (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	93
4.5.5.1.2	Origem dos vírus e produção de estoque trabalho.....	94
4.5.5.1.2	Titulação do estoque viral	94
4.5.4.2	Teste de redução de placas por neutralização (PRNT).....	95
5.	Resultados.....	97
5.1	Análises de Bioinformática e Construção da sequência sintética de ZIKV-E	97
5.1.1	Análises de porção transmembrana, hidrofobicidade e desordem estrutural.....	97
5.1.2	Análises físico-químicas e estruturais de ZIKV-E	100
5.3	Expressão e purificação da proteína recombinante ZIKV-E	102
5.3.1	Verificação da antigenicidade de ZIKV-E.....	107
5.4	Nanobastões de ouro (GNR).....	108
5.4.1	Funcionalização dos Nanobastões de ouro (GNR).....	108
5.4.2	Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E.....	111
5.4.2.1	Potencial Zeta	111
5.4.2.2	Raio hidrodinâmico.....	113
5.4.2.3	Marcação fluorométrica	113
5.5	Análise da resposta imune frente à imunização com a vacina experimental GNR-ZIKV-E	114
5.5.1	Análise da resposta imune celular	115
5.5.2	Avaliação da resposta de memória de células T	118
5.5.3	Análise da Resposta Imune Humoral por Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)	122
5.5.4	Análise da Resposta Imune Humoral por Teste de redução de placas por neutralização (PRNT)	123
6.	Discussão	127
7.	Conclusões	138
8.	Perspectivas	139
9.	Referências Bibliográficas	140
	ANEXOS.....	159
	ANEXOS I. Certificados CEUA	159
	ANEXOS II. Produção Científica durante o período de Doutorado (2019- 2022)	160

1. Introdução

1.1 Zika Vírus

1.1.1 A Febre Zika – Epidemiologia

A febre Zika é uma doença viral aguda causada pelo Zika vírus (ZIKV), geralmente transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. A capacidade de transmissão do ZIKV pelo *Aedes aegypti* (Vetor urbano) e pelo *Aedes albopictus* (Vetor silvestre) impõe grande preocupação para a saúde pública, uma vez que estes artrópodes se encontram amplamente distribuídos em zonas tropicais, subtropicais (*Aedes aegypti*) e temperadas (*Aedes albopictus*), abrangendo um enorme contingente de indivíduos susceptíveis (Chaves et al., 2015, Ferraris et al., 2019, WHO 2019).

Apesar da picada por um mosquito infectado ser a principal via de infecção pelo ZIKV, fluidos corporais vêm sendo considerados como rotas infecciosas, uma vez que o vírus foi detectado em fluidos biológicos como sangue, urina, sêmen, secreção vaginal, fluido cerebral, saliva, leite materno e líquido amniótico. Dessa forma, novas rotas transmissionais surgem como consequência da circulação do vírus entre os seres humanos e das relações interpessoais entre estes estabelecidas, incluindo as relações sexuais, o contato materno-fetal e a doação de sangue (Besnard et al., 2014, Musso et al., 2014, Musso et al., 2015, Martins et al., 2017).

O ZIKV foi inicialmente isolado em abril de 1947 em macacos *Rhesus febris*, na floresta de Uganda (África) (Dick et al., 1952). Casos humanos foram detectados em 1952 na Uganda e Tanzânia, e em 1968 na Nigéria. Até recentemente, apenas casos humanos esporádicos eram registrados. Em 2007, casos relacionados ao ZIKV foram documentados, com destaque para uma epidemia na Polinésia Francesa e a circulação do vírus por vários países da Oceania. Em 2014 foi detectada a presença deste vírus no continente Americano, dando origem a uma epidemia (Duffy et al., 2009, Luz et al., 2015).

No Brasil, a entrada do ZIKV foi associada a dois grandes eventos ocorridos em 2014: a Copa do Mundo de Futebol, trazidos por turistas africanos, e ao Campeonato Mundial de Canoagem, do qual participaram esportistas de países do pacífico afetados pelo vírus (Zanluca et al., 2015). Entretanto, em um estudo desenvolvido recentemente, foi descoberto que o vírus em circulação chegou no Brasil em 2013, vindo do Haiti através de imigrantes ilegais e militares em missões de paz, tendo o vírus migrado da Polinésia Francesa para a Oceania, posteriormente

para a Ilha de Páscoa e, em seguida, para América Central e Caribe, o mesmo caminho percorrido pelos vírus da dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV) (Campos et al., 2018).

As análises da sequência genética do ZIKV têm sido importantes na elucidação de padrões de disseminação global. Duas linhagens principais de ZIKV, conhecidas como linhagem asiática e linhagem africana foram identificadas, as quais diferem em cerca de 5% no nível de aminoácidos, inclusive no gene da proteína do envelope. A linhagem asiática foi identificada pela primeira vez na Ásia e, posteriormente, se espalhou para as ilhas do Pacífico e, em seguida, para as Américas (Kuno & Chang, 2007, WHO, 2019).

A epidemia de 2015-2016 nas Américas foi causada pela linhagem asiática, comumente referida como linhagem americana. Estima-se que houve cerca de 1,5 milhões de infecções 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). Entretanto, vale ressaltar que, como as manifestações clínicas da infecção pelo ZIKV são semelhantes às causadas por outros flavivírus, é possível que os números relatados sejam menores do que a incidência real de casos (Baud et al., 2017).

Desde sua descoberta até a sua recente disseminação, não se sabia que a doença afetaria tão significativamente o hospedeiro humano. O surto de 2015 a 2016 nas Américas resultou em aumento de casos mundiais associados a viagens. Até julho de 2019, um total de 87 países e territórios apresentaram evidências de transmissão autóctone do ZIKV por mosquitos, distribuídos em quatro das seis regiões da OMS (Região Africana, Região das Américas, Região do Sudeste Asiático e Região do Pacífico Ocidental) (figura 1) (WHO, 2019).

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 (Gomez et al., 2022).

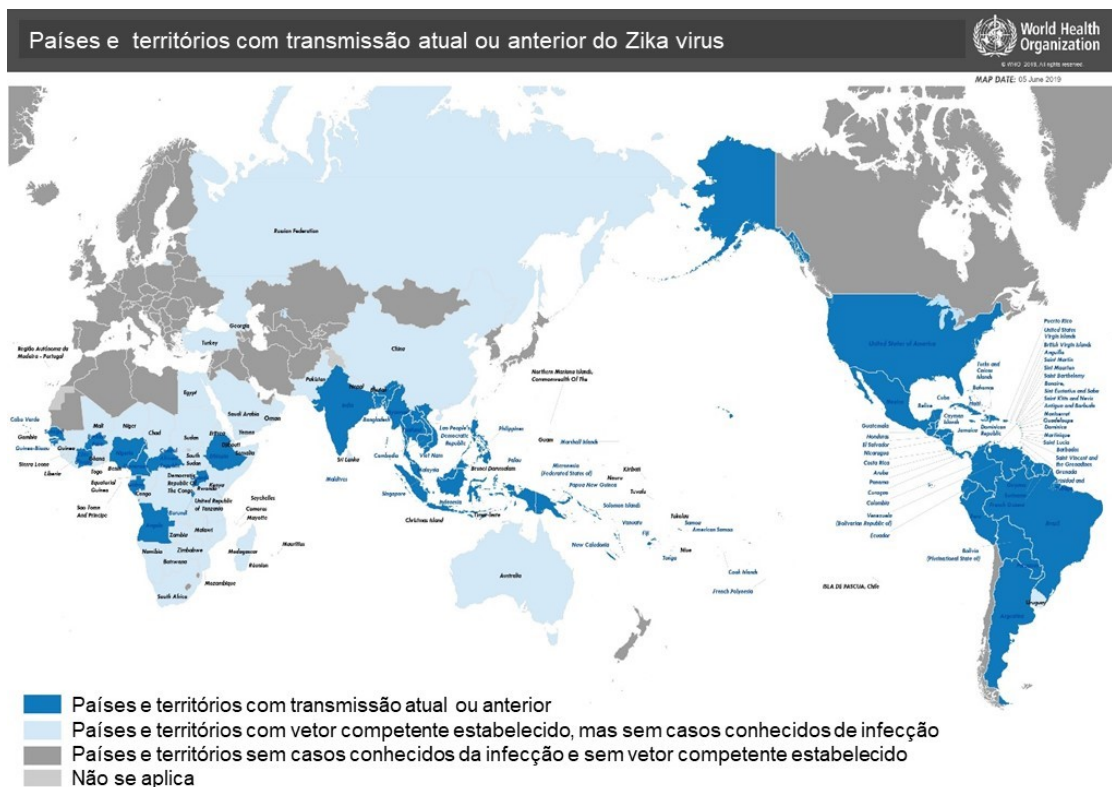


Figura 1. Ocorrência do ZIKV no mundo. Países e territórios com transmissão do ZIKV atual ou anterior, países com vetor competente estabelecido, mas sem casos conhecidos, e países sem o vetor competente estabelecido e sem casos conhecidos (Adaptado de: WHO, 2019).

No Brasil, a primeira transmissão autóctone foi confirmada em abril de 2015 (Zanluca et al., 2015). Nesse mesmo ano foi identificado no Brasil um aumento da prevalência de microcefalia fetal em vinte vezes. Ainda no Brasil, o ZIKV foi detectado no líquido amniótico de gestantes de bebês com microcefalia e no tecido de um recém-nascido com microcefalia que morreu após o nascimento, demonstrando a transmissão materno-fetal. Assim, o Ministério da Saúde brasileiro associou essa malformação à transmissão vertical do ZIKV (Nunes et al., 2016, Oliveira & Vasconcelos, 2016, Ventura et al., 2016). Além da transmissão vertical, a possibilidade de transmissão sexual e a capacidade de se replicar em células testiculares e dos olhos são propriedades únicas do ZIKV que complicam o controle e o tratamento da infecção (Pierson & Graham, 2016).

Desde 2017, as incidências de infecção pelo zika vírus diminuíram significativamente e nenhum outro surto epidêmico foi documentado. O número de casos de ZIKV desde então caiu significativamente, apesar de casos ainda serem relatados (Ferraris et al., 2019, Yeasmin et al., 2022). Em 2022, dados coletados entre as semanas epidemiológicas 1-40, apontam a ocorrência de 9.882 casos prováveis de infecção pelo ZIKV, correspondendo a uma taxa de incidência de 4,6 casos por 100 mil habitantes no Brasil. Em relação a 2019, os dados representam um

aumento de 5,9% no número de casos do país. Quando comparado com o ano de 2021, observa-se um aumento de 66,6% no número de casos (Ministério da Saúde, 2022).

Estudos recentes de vigilância apontaram a circulação de uma 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 congênitos (Aubry et al., 2021).

1.1.2 Taxonomia viral

A espécie *Zika virus* é pertencente ao super reino *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Kitrinoviricota*, classe *Flasuviricetes*, ordem *Amarillovirales*, família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. A família *Flaviviridae* se divide em quatro gêneros: *Hepacivirus* (com 14 espécies), *Pestivirus* (com 14 espécies), *Pegivirus* (com 11 espécies) e *Flavivirus*, no qual são agrupados 53 espécies virais, das quais muitas possuem grande relevância médica e veterinária, como o vírus da dengue (*Dengue virus*, DENV), o vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*, YFV) o vírus da encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus*, JEV), o vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus*, WNV) e o vírus Zika (ICTV, 2022).

Os vírus da família *Flaviviridae* (do latim *Flavus*, amarelo) compartilham similaridades na morfologia da partícula viral, organização do genoma e estratégias de multiplicação, entretanto exibem propriedades biológicas e espectro de hospedeiros diversos, resultando em diferentes consequências para a população (Lindenbach et al., 2007).

Os flavivírus mais conhecidos são pertencentes ao grupo dos arbovírus, termo derivado de “*arthropod-borne virus*”, caracterizado por agentes virais que se multiplicam e são disseminados por vetores artrópodes hematófagos. Grande parte dos arbovírus possuem genomas de RNA, exibindo altas frequências de mutação, podendo causar infecções em larga escala (Weaver et al., 2004, Weaver et al., 2021).

1.1.3 Estrutura e Genoma viral

O ZIKV é um vírus de RNA fita simples e polaridade positiva. Assim, o próprio RNA do vírus atua como RNA mensageiro, codificando diretamente uma poliproteína viral que

posteriormente é clivada em proteínas individuais. As partículas dos Flavivírus possuem tamanho de aproximadamente 50 nm e um núcleo elétron-denso com 30 nm, circundado por um envelope lipídico (figura 2) (Lindenbach et al., 2007, Chang et al., 2016, Plourde & Bloch, 2016).

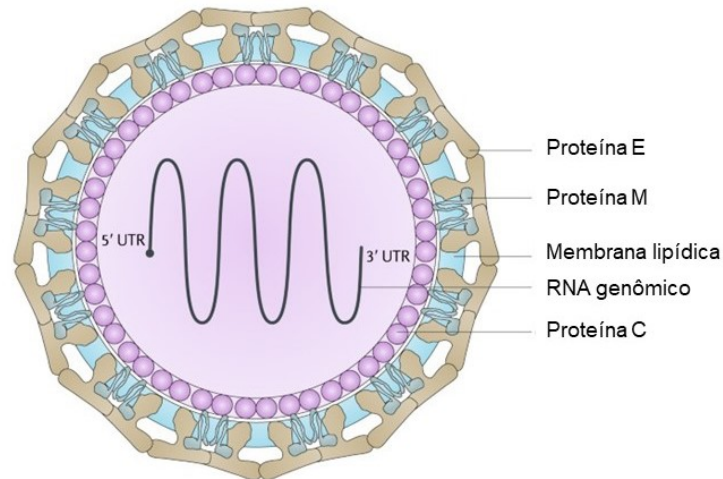


Figura 2. Representação esquemática da partícula viral dos flavivírus. Representação do nucleocapsídeo circundando o RNA viral. Indicação das proteínas estruturais na partícula (Proteína M: proteína da membrana, Proteína E: envelope e Proteína C: capsídeo) (Adaptado de Abbink et al., 2018).

O genoma do ZIKV possui 10,8 Kb e uma janela aberta de leitura (*open reading frame*, ORF) a qual codifica uma poliproteína precursora de 3400 aminoácidos (figura 3A) (Pierson & Diamond, 2008, Plourde & Bloch, 2016). As proteínas do vírus são geradas a partir da poliproteína que, posteriormente, é clivada por proteases em três proteínas estruturais que protegem o RNA viral (proteína do Capsídeo - C, proteína de Membrana - M e proteína do Envelope - E) e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), envolvidas com a replicação viral, montagem da partícula viral e modulação da resposta imune (figura 3B e 3C) (Lindenbach & Rice, 2003, Lindenbach et al., 2007).

Além disso, a região codificadora do genoma é flanqueada por regiões não codificadoras, que contém estruturas secundárias essenciais para a tradução, replicação do genoma e montagem da partícula viral, e uma estrutura de cap na região 5', a qual previne a degradação do RNA e permite sua interação com o ribossomo para a tradução (Chambers et al., 1990, Gebhard et al., 2011, Plourde & Bloch, 2016).

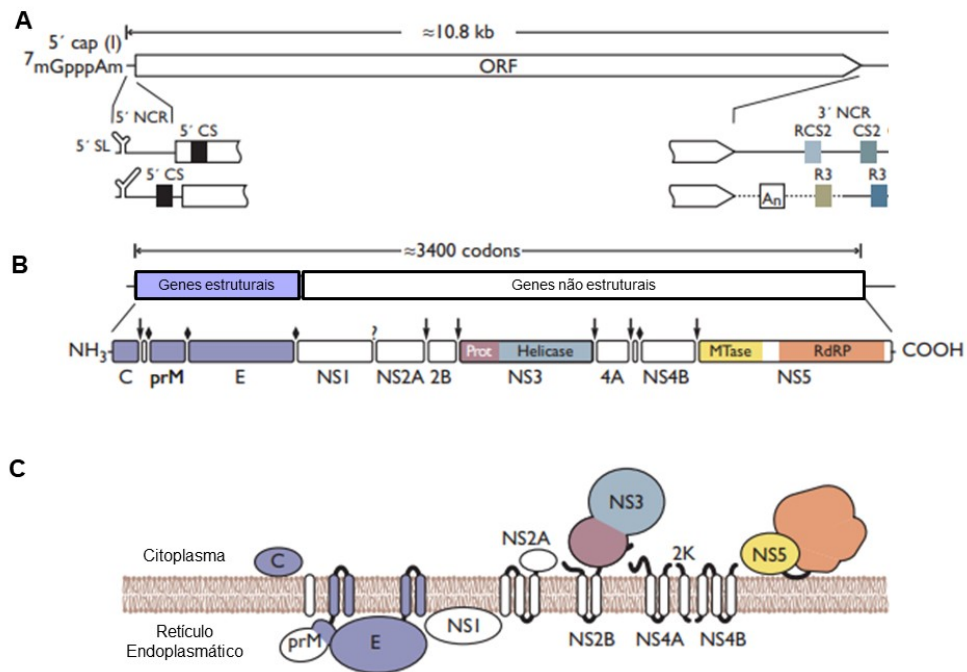


Figura 3. Estrutura do genoma dos Flavivírus e expressão de proteínas. (A) Estrutura do genoma e elementos de RNA. O genoma viral é representado com o quadro de leitura aberto (ORF), o limite 5' e as regiões não codificantes 5' e 3' (NCR) são indicadas (B) Processamento de poliproteínas e produtos de clivagem. As caixas abaixo do genoma indicam precursores e proteínas maduras geradas após o processamento proteolítico. (C) Topologia de membrana da poliproteína (Adaptado de Lindenbach et al., 2007).

Ainda, em relação as proteínas estruturais, a proteína C é essencial para a montagem dos vírions, ela interage com o material genético para a montagem do nucleocapsídeo que se dobra em um dímero simétrico, no qual cada monômero é composto de quatro alfa hélices. A proteína M, associada à membrana, é formada a partir de uma molécula precursora (prM) e produzida durante a maturação viral que ocorre durante a via secretora do vírus. A glicoproteína E é uma potente indutora de anticorpos neutralizantes, e uma estrutura de ligação dos vírus aos receptores da célula, atuando como principal determinante antigênico das partículas virais (Gebhard et al., 2011, Tsai et al., 2013).

1.1.4 Ciclo de multiplicação

Os flavivírus realizam sua multiplicação no citoplasma das células que infectam. O seu ciclo multiplicativo é iniciado quando um vírion infecta uma célula hospedeira permissiva, ocorrendo a ligação dos vírus à superfície da célula por múltiplas interações entre receptores específicos virais e celulares. No caso do ZIKV, podemos citar macrófagos placentários, células progenitoras neurais humanas e células testiculares (Neufeldt et al., 2018).

As partículas virais são internalizadas por endocitose mediada por receptor, através da interação da glicoproteína do envelope (proteína E) aos receptores celulares (Perera et al., 2008). Uma vez dentro do endossoma, ocorre uma queda de pH resultante da acidificação dos endossomas primários, gerando um rearranjo conformacional da estrutura das glicoproteínas virais que atuam na fusão das membranas virais e endossomais celulares (Bressanelli et al., 2004, Neufeldt et al., 2018). Sendo assim, ocorre a fusão da membrana lipídica da partícula viral com a membrana lipídica do endossoma, a desencapsidação do genoma viral, com a consequente liberação do RNA viral no citoplasma, onde o nucleocapsídeo é desnudado e a replicação do genoma de RNA e a montagem de partículas é iniciada (figura 4) (Lindenbach et al., 2007).

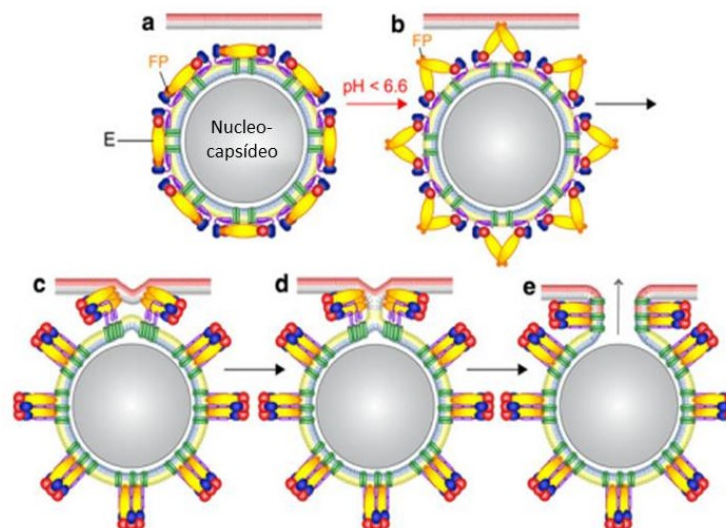


Figura 4. Esquema dos estágios propostos para o processo de fusão dos Flavivírus. Código de cores: Membrana viral amarela/azul, Membrana alvo vermelha/cinza, Domínio I da proteína E vermelho, Domínio II da proteína E amarelo, Domínio III (DIII) da proteína E azul, Peptídeo de Fusão laranja, Porção transmembrana (C-terminal) verde **(a)** Dímero da proteína E em um vírus maduro **(b)** Diminuição do pH promove uma mudança conformacional em E, expondo o peptídeo de fusão, que induz a interação com a membrana alvo **(c)** Formação inicial do hairpin da membrana e trimerização de E, através da relocação de DIII **(d)** Fusão parcial, em que apenas uma camada de cada membrana é associada **(e)** Geração de uma estrutura pós-fusão final (trímero de E) e a abertura de um poro de fusão (Adaptado de Kaufmann & Rossmann, 2011).

Com o genoma dentro do citoplasma, o processo de transcrição se inicia. Para tal, ocorre a síntese de uma fita de RNA intermediária de polaridade negativa formando um intermediário de cadeia dupla (dsRNA) que, por sua vez, será usado para a síntese de novas moléculas de RNA de polaridade positiva (+). Estas servirão quer como RNA genômico, a ser encapsidado nas novas partículas virais, quer como mRNA diretamente traduzidas nos ribossomos para produção da poliproteína que, após clivagem e processamento pós-traducional, dá origem às três proteínas estruturais e às sete proteínas não-estruturais (Lindenbach et al., 2007, Perera et

al., 2008). As proteínas não estruturais atuam replicando ativamente o RNA viral em complexos de replicação associados a membranas celulares (Mackenzie et al., 2001).

Em relação à montagem da partícula viral, inicialmente, partículas imaturas são formadas no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Essas partículas imaturas, que contêm proteína E, proteína M, membrana lipídica e nucleocapsídeo, não podem induzir a fusão das células hospedeiras, ou seja, neste estágio elas não são infecciosas (carecem de proteína do capsídeo e RNA genômico). As partículas não infecciosas são transportadas pelo Complexo de Golgi e liberados da célula hospedeira por exocitose. Nesta trajetória de pH baixo do trans-Golgi, a porção pr do complexo prM é clivada por ação de furinas celulares, tornando as partículas imaturas em vírions maduros infecciosos (figura 5) (Bressanelli et al., 2004, Mukhopadhyay et al., 2005).

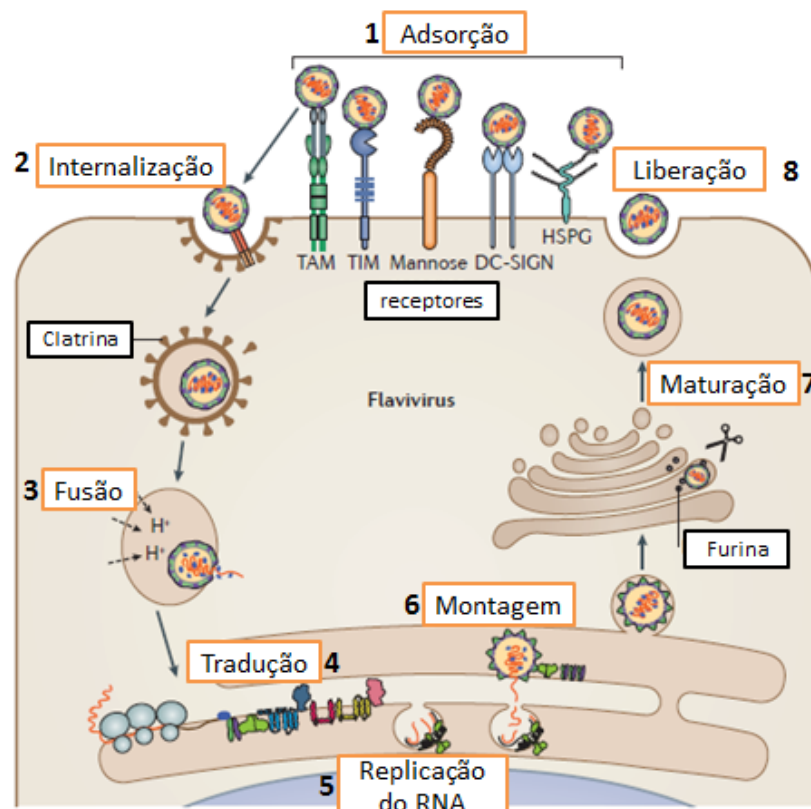


Figura 5. Ciclo de multiplicação dos Flavivírus. (1) Ligação do vírion aos receptores na superfície da célula (2) Endocitose mediada por clatrina (3) Acidificação dentro dos endossomos, ocorre a fusão de membranas viral-celular mediada por proteínas virais, resultando na liberação do RNA viral em um processo chamado de desnudamento (4) Tradução do mRNA em uma única poliproteína que é processada por proteases do vírus e da célula hospedeira (5) Replicação do RNA por proteínas não-estruturais virais (6) Montagem do nucleocapsídeo na membrana do Reticulo endoplasmático, com ativação de furinas para clivagem da prM (7) Maturação da partícula viral e brotamento (8) Liberação dos vírus maduros por exocitose (Adaptado de Neufeldt et al., 2018).

1.1.5 Proteína do Envelope (E)

Como mencionado, a proteína E, com aproximadamente 53 kDa, é a principal proteína estrutural presente na superfície das partículas virais dos flavivírus e desempenha um papel essencial no ciclo de multiplicação viral, atuando como mediadora tanto da ligação ao receptor (adsorção), quanto da fusão do envelope viral com as membranas celulares, permitindo assim a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (Lindenbach et al., 2007, Pierson & Diamond, 2007). Essa proteína também é o principal alvo para anticorpos neutralizantes, sendo responsável por induzir uma resposta imune protetora (Heinz & Stiasny, 2012, Stiasny et al., 2013).

Análises microscópicas da estrutura da proteína do envelope do ZIKV revelam que algumas regiões são semelhantes as do vírus da Dengue e outras próximas de flavivírus neurovirulentos, tais como WNV e JEV. Essas semelhanças são importantes, uma vez que regem o tropismo celular e contribuem para o desfecho da doença (Sirohi et al., 2016).

A proteína E apresenta três domínios (DI, DII e DIII) conservados entre os flavivírus, uma região membranaar (chamada de “haste”) e uma âncora transmembrana na região carboxi terminal (figura 6) (Stiasny et al., 2013). Os domínios estão dispostos como dímeros, com três dímeros paralelos entre si, que formam uma espécie de balsa cobrindo a superfície viral (cerca de 30 balsas). O domínio central (DI) é responsável pela união dos domínios II e III, e pelas mudanças conformacionais durante o processo de fusão. O domínio II contém o peptídeo que interage com as membranas durante a fusão, enquanto o domínio III possui conformação semelhante a uma imunoglobulina (*Ig-like*) e contém os sítios de ligação aos receptores celulares, mediando a adsorção (figura 6) (Mukhopadhyay et al., 2005, Pierson & Diamond, 2008).

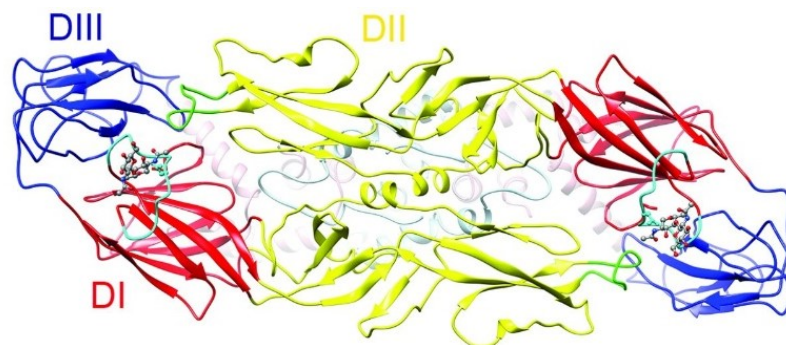


Figura 6. Representação dos 3 Domínios da glicoproteína do Envelope do ZIKV. Onde têm-se o domínio I em vermelho, domínio II em amarelo e domínio III em azul (Adaptado de Pierson & Diamond, 2008).

Avanços acerca da determinação da estrutura dos flavivírus e do desempenho de suas proteínas estruturais dão especial destaque às mudanças conformacionais sofridas pela proteína E, como as transições realizadas entre as formas imaturas e maduras, e de seu importante papel durante a montagem do vírus. A redução do pH desencadeia rearranjos conformacionais da proteína E, iguais ou similares aos do contato do vírus com o receptor celular, resultando na formação de trímeros e expondo o peptídeo de fusão (figura 4) (Hernandez et al., 2014).

Além disso, regiões específicas da proteína E são descritas como potenciais alvos para o desenho de fármacos antivirais e estratégias alternativas para a inibição viral que são abordadas com base na interação da proteína E com moléculas receptoras e anticorpos neutralizantes, uma vez que epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes foram identificados nos três domínios da proteína E. A informação estrutural adquirida a partir dessas interações pode ser utilizada para conceber novos inibidores de entrada de vírus com eficácia aumentada (Perera et al., 2008).

1.1.6 Manifestações clínicas

A apresentação clínica da infecção por ZIKV é inespecífica e, por essa razão, pode ser confundida com outras doenças febris, como as febres dengue e chikungunya, o que contribui para a subnotificação dos casos e desconhecimento da real incidência da febre causada pelo ZIKV (Luz et al., 2015, Chang et al., 2016, Musso et al., 2016). Há relatos de testes laboratoriais positivos para infecção por ZIKV em pessoas assintomáticas, de modo que menos de 20% dos indivíduos infectados apresentam alguma manifestação clinicamente evidente (Chang et al., 2016, Ferraris et al., 2019).

Em humanos, o período de incubação da picada do mosquito ao aparecimento de sintomas é de 3 a 12 dias (Plourde & Bloch, 2016). Após esse período, a maioria dos pacientes sintomáticos apresenta uma doença branda e autolimitada, com duração de até 15 dias (Chang et al., 2016, Plourde & Bloch, 2016). Os sintomas mais comuns incluem conjuntivite, erupção cutânea, mialgia, dor de cabeça e garganta, febre, dor e inchaço nas articulações. Os sintomas menos comuns incluem dor abdominal, constipação, diarreia, tonturas, fotofobia, náuseas e dor retro-orbital (Zanluca et al., 2015, Chan et al., 2016). Em alguns grupos, a febre causada pelo ZIKV apresenta quadros atípicos. Em crianças foi relatado quadro cutâneo com lesões vesiculares. Em imunossuprimidos é possível a ocorrência de quadros com complicações viscerais graves e prolongadas, podendo levar o indivíduo a óbito (Luz et al., 2015).

Embora a doença geralmente seja benigna e de curta duração, complicações de origem neurológica, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB), foram relatadas na epidemia ocorrida nas Américas (2015) (Uncini et al., 2017). 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 distúrbios respiratórios e de deglutição, com consequências potencialmente fatais (Chang et al., 2015, Zanluca et al., 2015, 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).

Além disso, sequelas clínicas mais graves têm sido cada vez mais associadas ao ZIKV. Durante o surto no Brasil, relatos de bebês nascidos com microcefalia aumentaram acentuadamente em 20 vezes (Chan et al., 2016, Plourde & Bloch, 2016). Desde então, estudos relataram possível neurotropismo do ZIKV (Costa et al., 2018). Acredita-se que a maior probabilidade de desenvolver essa malformação ocorre quando a infecção materna coincide com o primeiro trimestre da gravidez. Tabata e colaboradores (2016) sugerem em seu estudo que fetos infectados nos primeiros meses de gestação são expostos a mais vírus por mais tempo durante a gravidez. Uma vez que, a infecção materna no início e no meio da gestação dissemina o vírus para a circulação fetal em um estágio crítico no desenvolvimento cerebral, quando a alta carga viral aumenta o risco de malformações.

Embora a microcefalia tenha ganho grande atenção, a infecção por ZIKV durante a gravidez também leva a outras malformações, incluindo anormalidades oculares, musculoesqueléticas, craniofaciais e, em alguns casos, associadas ao aborto espontâneo. Esse amplo espectro de manifestações clínicas fetais resultantes da infecção materna pelo ZIKV é chamado de síndrome congênita do Zika (Victoria et al., 2016, Polonio et al., 2017, Shirley & Nataro, 2017, Sanz Cortes et al., 2018). Em adultos, sequelas neurológicas graves também foram associadas à infecção por ZIKV, incluindo meningite e meningoencefalite (Plourde & Bloch, 2016).

1.1.7 Diagnóstico e tratamento

Devido à semelhança e sobreposição dos sintomas com outras arboviroses, o diagnóstico específico da febre zika representa um desafio, e dificilmente será corretamente diagnosticada apenas com descrição dos sintomas clínicos. Assim, é fundamental a realização de testes laboratoriais de alta sensibilidade e especificidade (Nunes et al., 2015). A importância

do diagnóstico em indivíduos infectados com ZIKV, mesmo em pacientes assintomáticos, está ligada principalmente ao risco das anormalidades congênitas relatadas e à possibilidade de transmissão sexual (Musso et al., 2015, Meaney-Delman et al., 2016).

Os hemogramas laboratoriais em sua maioria não exibem alterações em uma infecção por ZIKV, embora leucopenia, linfocitose e plaquetopenia sejam possíveis. Sorologias, como as realizadas por ensaios imunoenzimáticos de captura de anticorpos da classe IgG e IgM (ELISA), ou o teste de neutralização de redução de placa (PRNT, *Plaque reduction neutralization test*), podem ser positivas após a fase sintomática da doença, adquirindo importância enquanto diagnóstico retrospectivo para fins epidemiológicos (Heinz & Stiasny, 2012, Kerkhof et al., 2019). Entretanto, a sorologia pode ter menor especificidade em regiões onde circulam outros flavivírus, devido à reatividade sorológica cruzada entre eles, especialmente DENV (Speer & Pierson, 2017, Gullo et al., 2022).

Dessa forma, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia de polimerase quantitativa (RT-qPCR) com *primers* específicos para ZIKV é a abordagem diagnóstica mais indicada durante a fase aguda da doença (<7 dias após o início dos sintomas), uma vez que possui alta sensibilidade e especificidade (Heinz & Stiasny, 2012, Plourde & Bloch, 2016). A detecção do RNA viral em soro ou urina fornece diagnóstico conclusivo de infecção, mas o intervalo para isso é limitado a 1-2 semanas após o início dos sintomas devido ao rápido declínio da presença do vírus no soro e na urina (Gorchakov et al., 2019).

Em relação ao diagnóstico pré-natal da infecção por ZIKV, o padrão-ouro para o diagnóstico pré-natal da infecção é o ensaio da reação em cadeia de polimerase (PCR) sobre fluido amniótico. Entretanto alguns sinais de ultrassom típicos da infecção por ZIKV não são encontrados em outras infecções congênitas, dentre eles: a desproporcionalidade no crescimento fetal com uma restrição incomum no crescimento do fêmur, calcificações cerebrais e lesões destrutivas na fossa posterior do crânio (Gullo et al., 2022).

O tratamento da febre Zika inclui basicamente o tratamento sintomático, aliado ao repouso e hidratação, não existindo uma abordagem específica contra o vírus. O uso de anti-inflamatórios não esteroides devem ser evitados até que a dengue seja excluída, devido ao risco de hemorragia em pacientes com dengue (Plourde & Bloch, 2016). Os casos de SGB devem ser tratados em ambiente hospitalar, se necessário com terapia intensiva e, em casos especiais, a plasmaferese (Luz et al., 2015).

Nenhuma terapia clinicamente aprovada está disponível para tratamento de quaisquer infecções por flavivírus (Weaver et al., 2016). Assim como outras arboviroses, a medida mais

importante para o controle é a profilaxia, especialmente com o controle do vetor, portanto, medidas de controle de vetores artrópodes baseadas em ações governamentais e privadas são fundamentais para bloquear o caráter epidêmico da doença. Além disso, conforme mencionado, ainda não há vacina licenciada ou antivirais disponíveis contra o ZIKV (Luz et al., 2015).

1.1.8 Resposta imune ao Zika virus

A imunidade contra infecções virais depende da ação integrada das respostas imunológicas inata e adaptativa, cujos objetivos são bloquear a infecção, eliminar as células infectadas e produzir memória imunológica de longo prazo (Machado et al., 2004). Ainda são necessários muitos estudos acerca da resposta imune contra o ZIKV, sendo esta inferida a partir de estudos de flavivírus relacionados (Dai et al., 2016).

A resposta imune do hospedeiro é fundamental para o controle de infecções por flavivírus, começando com a imunidade inata. Assim, na fase inicial das infecções virais o controle da infecção é realizado por intermédio da imunidade inata, cujos principais mecanismos consistem na ação de macrófagos, produção dos interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) e morte das células infectadas mediada pelas células *natural killer* (NK) que proliferam robustamente durante infecções virais (Dai et al., 2016; Maucourant et al., 2019). A produção de interferons do tipo I, principais citocinas envolvidas na resposta imune inata antiviral, é desencadeada por células infectadas por vírus e fornecem proteção às células não infectadas. Macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos produzem IL-12, capaz de estimular citotoxicidade por células NK. O acionamento das células NK é responsável por eliminar alvos infectados (Machado et al., 2004; French et al., 2006).

Segundo Glasner e colaboradores (2017), a infecção por ZIKV induz um aumento na expressão de moléculas de MHC de classe I, induzido pelo aumento na produção de IFN- β . Sabe-se que a expressão aumentada de MHC de classe I é inibidora da ação de células NK, uma vez que as moléculas de MHC-I se ligam a receptores inibidores de morte que são expressos nas células NK, inibindo sua ativação. Dessa forma, as células NK parecem estar agindo na infecção por ZIKV, mais pela produção de citocinas, do que por sua ação citotóxica. Além disso, as células NK produzem IFN- γ que aumenta o potencial microbicida dos macrófagos (Raphael et al., 2015).

A resposta imune adaptativa acontece por ação da resposta imune celular, mediada pelos linfócitos T (LT), bem como por meio da resposta imune humoral, mediada pelos linfócitos B

(LB) (Abbas et al., 2015). De maneira geral, uma infecção por Flavivírus ativam tanto a resposta mediada por linfócitos T CD4⁺ como a resposta mediada por linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos). Na presença de diferentes estímulos, as células T CD4⁺ se diferenciam em variados subgrupos de células T auxiliares (Th), Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg 43 (células Th reguladoras) e células T foliculares (Thf), as quais colaboram para a produção de anticorpos pelas células B. Coletivamente, os estudos desenvolvidos até o momento indicam que a resposta das células T CD8⁺ ao ZIKV compartilha muitas semelhanças com a resposta à infecções causadas pelo DENV (Wen & Shresta, 2017).

Os anticorpos por sua vez, atuam nos vírus extracelulares por meio de neutralização e podem ser adjuvantes no processo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos pela atuação das células NK. Ainda nessa resposta, os linfócitos T CD8⁺ quando ativados se diferenciam em células T citotóxicas, com alto poder de eliminar alvos infectados pelos seus mecanismos de citotoxicidade (Raphael et al., 2015).

Desde o início do surto de ZIKV na América do Sul, pesquisas relevantes têm sido realizadas para aprofundar nossa compreensão sobre a resposta das células T à infecção pelo ZIKV. O ZIKV induz ativação robusta de células T, o que leva ao estabelecimento de uma população de células T de memória, sugerindo um papel importante dos LT CD4⁺ e LT CD8⁺ na resposta imune ao ZIKV (Pardy & Richer, 2019).

Tappe e colaboradores (2016) avaliaram os níveis de citocinas e quimiocinas em 6 pacientes infectados com o ZIKV em diferentes estágios da infecção, mostrando um perfil misto de citocinas, incluindo citocinas imunorregulatórias, interleucinas, proteínas inflamatórias de macrófagos e do fator de crescimento do endotélio vascular, não havendo necessariamente uma polarização de padrão de resposta imune mediada por células T auxiliares. Ngono e colaboradores (2017) relataram que, além do papel protetor das células T CD8⁺ na infecção pelo ZIKV, há possibilidade destas células também estarem envolvidas na eliminação das partículas virais. Acredita-se que a resposta celular de LT CD4⁺ e CD8⁺ ao ZIKV possui como alvo tanto proteínas estruturais (E, C e prM) quanto proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS3, NS4B e NS5) (Ngono et al., 2017).

As células T têm um papel essencial na proteção contra uma variedade de infecções. De fato, o desenvolvimento de formulações de vacinas bem-sucedidas exigirá a geração de respostas de células T potentes e duradouras (Badolato-Corrêa et al., 2018). As células T CD8⁺ específicas da dengue estão presentes em frequências mais altas em comparação com suas contrapartes CD4⁺ (Rivino et al., 2013).

Uma comparação de sequências de aminoácidos de epítomos de células T CD8⁺ de DENV e ZIKV apontam uma alta homologia de sequência entre os dois vírus e sugere que alguns desses epítomos CD8⁺ também podem existir no ZIKV (Rivino et al., 2016). Em pacientes infectados por ZIKV, foram detectadas respostas de células T ao proteoma viral completo: células T CD8⁺ se concentram preferencialmente em proteínas estruturais, enquanto as células T CD4⁺ têm como alvo as proteínas não estruturais, ambos produtores de IFN (citocina pró-inflamatória que inicia sinais e ativa a diferenciação das células T). O direcionamento diferencial semelhante de células T CD4⁺ e CD8⁺ também foi observado em resposta à infecção por JEV e à vacina YFV (Ngono et al. 2017).

Os primeiros estudos relataram que as células T CD8⁺ e CD4⁺ humanas específicas para DENV podem produzir interferon- γ (IFN- γ), após estimulação de DENV e lisar células-alvo infectadas por DENV (Kurane et al., 1989). Incentivado por essas observações, Yauch e colaboradores (2009) investigaram o papel protetor das células T usando um modelo de infecção primária por DENV em camundongos com deficiência de receptor de IFN tipo I (IFNAR^{-/-}). Esses camundongos desenvolvem uma doença com as principais características da dengue grave em humanos, incluindo tropismo/viremia viral, trombocitopenia, vazamento vascular e tempestade de citocinas. Os autores descobriram que camundongos IFNAR^{-/-} depletados de células T CD8⁺ antes da infecção tinham carga de DENV significativamente maior nos tecidos em comparação com animais não depletados. Além disso, a imunização com epítomos de peptídeo DENV de células T CD8⁺ imunodominantes aumentou a depuração viral dos camundongos, confirmando um papel protetor para células T CD8⁺ durante a infecção primária por DENV (Yauch e outros 2009).

IFNs tipo I e tipo III induzem estados antivirais através da indução de genes estimulados por IFN que controlam a replicação viral (Pierson & Diamond, 2018). A este respeito, o IFN- γ tem um papel crítico no reconhecimento e eliminação de patógenos infecciosos. O IFN- γ , sendo o efetor central da imunidade mediada por células, pode coordenar uma infinidade de funções antimicrobianas. Servindo para aumentar a apresentação de antígenos por meio de células apresentadoras de antígenos (APCs), potencializa o reconhecimento de antígenos por meio de interação de células T cognatas, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários de nitrogênio reativos (RNIs), além de ser capaz de induzir respostas antivirais (Colavita et al., 2018; Kak et al., 2018; Van Leur et al., 2021).

Além disso, o IFN- γ tem funções antivirais contra ZIKV na decídua materna (endométrio) e placenta durante a gravidez. A secreção constitutiva de IFN- γ pelos

sinciciotrofoblastos correlacionou-se com sua capacidade de restringir a infecção pelo ZIKV. A importância da sinalização do IFN na mediação da restrição do hospedeiro do ZIKV foi demonstrada pela patogenicidade do ZIKV em *Ifnar1^{-/-}* e *Stat2^{-/-}*, mas não em camundongos imunocompetentes (Pierson & Diamond, 2018).

Foi visto que a infecção por ZIKV também desencadeou a expressão elevada de citocinas pró-inflamatórias em tecidos cerebrais fetais humanos. Dentre as quais o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória produzida durante a inflamação aguda e responsável por uma variedade diversificada de eventos de sinalização dentro das células (Lin et al., 2017). Ainda em relação a resposta de células T, o CD127 possui valor como marcador de memória, é receptor de IL-7, uma citocina-chave para avaliar a manutenção da memória de células T CD8 a longo prazo de forma independente de antígenos (Nanjappa et al., 2008).

No que se refere a resposta imune humoral, anticorpos neutralizantes também desempenham um papel importante na proteção contra flavivírus. Anticorpos neutralizantes gerados como consequência de infecção ou vacinação são críticos para o desenvolvimento de imunidade a infecções virais. Entre os flavivírus, existem vacinas bem-sucedidas para YFV e JEV. O desenvolvimento de vacinas contra outros flavivírus, como DENV e ZIKV, foi parcialmente confundido devido à alta conservação de sequência e reatividade cruzada imunológica entre suas glicoproteínas de envelope. As respostas de anticorpos a esses vírus são principalmente induzidas às proteínas E, prM e NS1 (Van Leur et al., 2021). A proteína E é o alvo primário dos anticorpos neutralizantes, esta é o antígeno mais abundante na superfície da partícula viral, foi demonstrado que esses anticorpos se ligam a epítopos localizados em todos os três domínios estruturais da proteína E (Ngono et al., 2017).

Dowd e colaboradores (2016) mostraram que a infecção por ZIKV induz resposta imune humoral amplamente neutralizante e protetora contra linhagens africanas e asiáticas, sugerindo um único sorotipo de ZIKV. Dessa forma, infecções múltiplas como aquelas causadas pelo DENV não são prováveis. Entretanto, infecções sequenciais por diferentes flavivírus podem acontecer, especialmente entre o DENV e o ZIKV, uma vez que este vírus se dissemina em áreas previamente expostas ao DENV e outros flavivírus relacionados (Culshaw et al., 2017).

1.2 Vacinas experimentais para Zika

Os flavivírus representam alguns dos arbovírus patogênicos humanos mais importantes em todo o mundo, assim, vacinas já vem sendo utilizadas para proteger os humanos de vírus pertencentes à essa família (Heinz e Stianly, 2012). Vacinas clinicamente aprovadas estão disponíveis para quatro flavivírus, incluindo o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), o vírus da dengue (DENV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV) (Weaver et al., 2016). O sucesso observado para as vacinas desenvolvidas contra esses flavivírus suscita expectativas positivas e viáveis para o surgimento de uma vacina contra o ZIKV. Embora o objetivo do desenvolvimento da vacina contra ZIKV seja prevenir a doença em todos os potenciais pacientes afetados pelo vírus, a patogênese e o tropismo observados no ZIKV destacam um requisito específico para induzir uma resposta imune capaz de proteger tanto a mãe quanto o feto (Pierson & Graham, 2016, Weaver et al., 2016).

A indução de anticorpos neutralizantes correlaciona-se com a proteção pela vacinação para a maioria das vacinas existentes de flavivírus. Para o ZIKV, pelo fato de o vírus existir como um único sorotipo, considera-se que a infecção primária confira imunidade a infecções subsequentes. Além disso, simplifica a seleção de linhagens para inclusão em vacinas candidatas e métodos para avaliar a imunogenicidade do potencial candidato vacinal, o mesmo não ocorre para o DENV, por exemplo, pela existência de múltiplos sorotipos virais e pelo potencial de ADE (*Antibody-dependent enhancement*) (Pierson & Diamond, 2014, Dowd et al., 2016).

Acredita-se que uma única vacina para ZIKV será eficaz contra todas as linhagens circulantes devido à baixa diversidade de linhagens de ZIKV (Ali et al., 2017). O objetivo imunológico primário das abordagens vacinais para ZIKV tem sido o de induzir anticorpos neutralizantes contra a proteína E, presente na superfície do vírus (Pierson & Graham, 2016). O desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV vem sendo trabalhado sob diferentes abordagens antigênicas, incluindo vacinas de ácido nucleico (mRNA e DNA), vacinas de vírus inativados, vacinas de vírus vivo-atenuado e de vetores virais (Richner & Diamond, 2018).

Vários candidatos vacinais foram submetidos ao desenvolvimento pré-clínico bem-sucedido. Anticorpos neutralizantes foram induzidos por diversas vacinas testadas em camundongos, as quais também foram capazes de fornecer proteção de curto prazo em camundongos contra desafio com ZIKV (Abbink et al., 2018).

Diferentes ensaios clínicos têm sido realizados para avaliar a segurança e eficácia das vacinas candidatas anti-Zika. A tabela 1 resume os estudos para ZIKV que se encontram completos ou em fase clínica de testes registrados na plataforma *clinicaltrials.gov*. Entretanto, deve-se notar que cada abordagem vacinal tem seus prós e contras. Assim, é necessário que abordagens complementares sejam exploradas simultaneamente para que a vacina contra ZIKV avance (Pierson & Graham, 2016, Weaver et al., 2016).

Uma vez que não há surto de ZIKV atualmente em todo o mundo notificado pelas agências de vigilância e devido ao número limitado de casos, a realização de testes clínicos de fase 2 e 3 está se mostrando problemática com muitos desenvolvedores de vacinas suspendendo seus testes (Yeasmin et al., 2022).

Tabela 1. Vacinas contra ZIKV em ensaios clínicos.

Vacina	Plataforma	Patrocinadores	Ensaio clínico	Fase
mRNA-1325	mRNA codificando prM-E	Moderna	NCT03014089	Fase I Concluído
mRNA-1893	mRNA	Moderna	NCT04064905	Fase I Concluída
mRNA-1893	mRNA	Moderna	NCT04917861	Fase II Recrutamento
VRC5288	DNA codificando prM-E (ZIKV)	NIAID	NCT02840487	Fase I Concluída
VRC5283	DNA codificando PrM-E (ZIKV)	NIAID	NCT02996461	Fase I Concluída
VRC5283	DNA codificando PrM-E (ZIKV)	NIAID	NCT03110770	Fase II Concluída
ZPIV	Vírus inativado purificado	NIAID	NCT02963909	Fase I Concluído
ZPIV	Vírus inativado purificado	NIAID	NCT02952833	Fase I Concluída
ZPIV	Vírus inativado purificado	NIAID WRAIR	NCT02937233	Fase I Concluída
ZPIV	Vírus inativado purificado	NIAID	NCT03008122	Fase I Concluída
VLA1601	Vírus inativado purificado	Biosoluções emergentes de ValNeva	NCT03425149	Fase I Concluída
TAK-426	Vírus inativado purificado	Takeda	NCT03343626	Fase I Concluída
MV-ZIKA	Vetor do Sarampo	Themis Biosciences	NCT02996890	Fase I Concluída
MV-ZIKA	Vetor do Sarampo	Themis Biosciences	NCT04033068	Fase I Concluída
rZIKV/D4Δ30-713	Vírus vivo atenuado	NIAID	NCT03611946	Fase I Concluída
ChAdOx1 Zika	Vetor viral	Universidade de Oxford	NCT04015648	Fase I Concluído
ChAdOx1 Zika	Vetor viral	Universidade de Oxford	NCT04440774	Fase Ib Concluído
GLS-5700	DNA codificando PrM-E (ZIKV)	GeneOne Life Science	NCT02887482	Fase I Concluído

BARDA - Autoridade de Pesquisa e Desenvolvimento Biomédico Avançado.

NIAID - Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas.

WRAIR - Instituto de Pesquisa do Exército Walter Reed.

1.2.1 Vacinas de vírus vivo atenuado

As vacinas de vírus vivos atenuados são conhecidas por desencadearem uma resposta imune mais robusta, quando comparada a outras estratégias vacinais, desencadeando consequentemente maior proteção (Weaver et al., 2016). Além disso, vacinas de vírus vivos

atenuados possuem a vantagem de serem aplicadas em dose única, e possuírem indução rápida da imunidade. Este é um fato importante a ser observado, uma vez que o ZIKV é endêmico principalmente em países de baixa renda, dessa forma, vacinas de dose única são aliados particularmente importantes ao controlar um surto explosivo ou imunizar populações em áreas remotas, onde doses múltiplas são desafiadoras (Shan et al., 2017). Assim, vacinas de vírus vivos atenuados podem ser úteis para imunizar as populações que vivem e viajam para áreas endêmicas do ZIKV (Who, 2017).

No estudo desenvolvido pelo instituto Evandro Chagas (Rio de Janeiro, Brasil), em parceria com as Universidades do Texas e de Washington, uma vacina de vírus vivo atenuado contendo deleções na região 3'UTR do genoma do ZIKV (ZIKV-3'-UTR-LAV) mostrou-se capaz de proteger contra a transmissão vertical em um modelo de gravidez de camundongos e também danos aos testículos de camundongos e primatas não humanos. Após uma vacinação de dose única, fêmeas de camundongos C57BL/6 grávidas, infectadas no 6º dia e avaliadas no 13º dia da gestação, mostraram diminuição significativa dos níveis de RNA viral nos tecidos materno, placentário e fetal. Nos camundongos machos vacinados, a vacina protegeu contra a infecção, lesão e oligospermia dos testículos. Apesar de ser composta pelo vírus vivo atenuado, os pesquisadores mostraram um perfil de segurança para esta vacina, sugerindo desenvolvimento adicional para humanos (Shan et al., 2017).

Ainda, segundo dados registrados na plataforma *clinicaltrials.gov*, encerrou-se em julho de 2022 (dados não publicados), ensaios clínicos com a vacina de vírus atenuado rZIKV/D4Δ30-713 (NCT03611946). O objetivo deste estudo foi avaliar a segurança, a reativação e a imunogenicidade de uma única dose da vacina atenuada *in vivo* rZIKV/D4Δ30-713 em adultos sem histórico de infecção por flavivírus.

1.2.2 Vacinas de vírus inativado

As vacinas de vírus inativado, também chamadas de vacinas de vírus inativado purificado (do inglês, “*purified inactivated virus*”, PIV), já estão licenciadas para vacinação contra o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV). Embora essas possuam vantagens sobre as vacinas de vírus atenuados, como a impossibilidade de apresentarem fenótipo patogênico, não são gerados anticorpos contra as proteínas não-estruturais, além de ser necessário o uso de adjuvantes para aumentar a imunogenicidade, o que aumenta os custos de produção (Pierson & Graham, 2016).

Uma vacina de vírus inativado foi desenvolvida pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID), a qual contém uma amostra de ZIKV cultivada em células Vero, inativada e purificada por cromatografia (PRVABC59). Para avaliar a eficácia protetora de ZPIV, macacos *Rhesus* foram imunizados com ZPIV e, posteriormente, infectados por via subcutânea com 10^6 partículas virais. Após o desafio, as cargas virais foram quantificadas por RT-qPCR e a infecciosidade viral confirmada pelo crescimento em células Vero. Nos animais placebo os títulos de ZIKV aumentaram após o desafio, contudo, os macacos vacinados com ZPIV mostraram proteção completa contra ZIKV, como evidenciado por nenhum vírus detectável no sangue, urina, secreções colorretais e secreções cervicovaginais em todos os animais imunizados (Abbink et al., 2016).

Posteriormente foram relatados três ensaios clínicos da vacina ZPIV (NCT02963909, NCT02952833, NCT02937233), os quais incluíram participantes que receberam duas doses da vacina ZPIV com o adjuvante hidróxido de alumínio, administrada intramuscularmente no dia 1 e 29. Os eventos adversos relacionados à vacina foram leves a moderados, sem eventos adversos graves relatados. Após a dosagem de anticorpos neutralizantes, observou-se que cerca de 95% dos participantes tiveram pico de anticorpos neutralizantes após a segunda dose (Modjarrad et al., 2020). Segundo a plataforma clinicaltrials.gov encerrou-se em abril de 2022, um ensaio clínico da vacina ZPIV (NCT03008122), o qual avaliou a segurança e imunogenicidade de ZPIV em adultos de uma área endêmica de flavivírus (dados não publicados).

Outro ensaio clínico de fase I com uma vacina inativada ZIKV (TAK-426) foi liderado pela Empresa Farmacêutica Takeda (NCT03343626). Neste estudo, avaliou-se a segurança, tolerabilidade e imunogenicidade de duas doses da vacina contra ZIKV, com intervalo de 28 dias em 240 indivíduos saudáveis. Foram aplicadas três dosagens diferentes de vacina contendo 2, 5 ou 10 μg cada. Todas as doses TAK-426 foram bem toleradas sem mortes, sem eventos adversos graves relacionados à vacina e taxas semelhantes de eventos adversos leves a moderados. A resposta de anticorpos neutralizantes após duas doses no grupo de 10 μg foram significativamente maiores em relação as dosagens mais baixas. Assim, a dose TAK-426 de 10 μg foi selecionada para posterior desenvolvimento clínico (Han et al., 2021).

1.2.3 Vacinas de Vetor viral recombinante

As vacinas baseadas em vetores virais são outra abordagem promissora para imunizar contra vários patógenos. Os vetores virais são constituídos por vírus não patogênicos atenuados, que são capazes de produzir antígenos de outros patógenos quando inoculados em indivíduos vacinados. Sendo dessa forma, originadas pela substituição de genes que codificam proteínas estruturais do vírus atenuado pelos genes que codificam as proteínas equivalente de outro vírus. A hipótese é que a atenuação característica do vírus vetor garantirá também a atenuação do vírus recombinante, porém mantendo o caráter imunogênico da proteína do vírus, a qual apresenta um papel dominante na geração de anticorpos neutralizantes e indução de resposta imune protetora (Xie et al., 2017, Abbink et al., 2018).

Dentre as vacinas baseadas nessa metodologia, a vacina Dengvaxia produzida pela Sanofi Pasteur foi licenciada no Brasil e em outros países da América Latina e Ásia no final de 2015. Esta vacina foi gerada a partir da amostra vacinal da febre amarela, porém, substituindo os genes prM e E de YFV pelos dos 4 sorotipos de DENV, incorporando a antigenicidade de DENV ao fenótipo bem caracterizado de atenuação do YFV 17D, cada um expressando as proteínas pré membrana “prM” e do envelope dos quatro sorotipos virais (Capeding et al., 2014, Hadinegoro et al., 2015). Entretanto, observou-se em ensaios clínicos que a vacinação com a Dengvaxia é mais eficaz entre pessoas com mais de 9 anos de idade. A imunidade estimulada pela vacina dura até 4 anos, e o sorotipo do vírus, idade e infecção prévia por DENV do indivíduo antes da vacinação parecem afetar a eficácia da vacina, suscitando discussões sobre o uso da mesma (El Fezzazi et al., 2017, Deng et al., 2020).

Vacinas baseadas em vetores virais recombinantes têm mostrado resultados promissores em modelos pré-clínicos para ZIKV, e certos vetores se beneficiam de experiências anteriores em ensaios clínicos para outros patógenos (Prow et al., 2018). Um exemplo de vacina de vetor viral recombinante foi proposta por Chattopadhyay e colaboradores (2018), a qual é baseada no vírus da estomatite vesicular quimérica (VSV) que expressa a poliproteína do envelope CHIKV (E3-E2-6K-E1) no lugar da glicoproteína VSV (G) e também expressa as glicoproteínas envelope-membranares (M e E) do ZIKV. Esta vacina induziu respostas de anticorpos neutralizantes tanto ao CHIKV quanto ao ZIKV em camundongos do tipo selvagem e em camundongos A129. Uma única dose foi capaz de proteger estes animais contra ambas as infecções, fornecendo proteção duradoura e de baixo custo. Estes resultados, aliados a estudos com outros vírus, indicam o potencial dos vírus quiméricos para o desenvolvimento de vacinas bivalentes.

Prow e colaboradores (2018) também apresentaram resultados satisfatórios em modelo animal com sua plataforma vacinal bivalente, onde um único vetor foi capaz de codificar os genes estruturais da poliproteína dos vírus Zika e Chikungunya, gerando anticorpos neutralizantes contra ambos os vírus. Ainda se tratando de vacinas bivalentes para ZIKV e CHIKV, atualmente, um estudo da fase I determinou a segurança e a imunogenicidade da vacina candidata para ZIKV (ChAdOx1 ZIKV) em voluntários adultos saudáveis, dado como uma vacina autônoma ou coadministrado em protocolo heterólogo com a vacina candidata para CHIKV (ChAdOx1 CHIKV), ambas desenvolvidas pela Universidade de Oxford (NCT04015648 e NCT04440774). Ressalta-se aqui a importância de estratégias vacinais multipatógenas, uma vez que tais arboviroses são transmitidas por vetores em comum e, frequentemente, co-circulantes.

Também para ZIKV, a vacina MV ZIKV desenvolvida pela Themis Bioscience GmbH (NCT02996890) foi projetada para expressar as proteínas prM e E do ZIKV (MV-ZIKA) e já foi testado a imunogenicidade em camundongos e macacos. Segundo a plataforma clinicaltrials.gov o ensaio clínico em humanos avaliou a segurança e a imunogenicidade de uma dose alta ou baixa quando dada como regimes de dose única ou duas doses em indivíduos saudáveis.

Além disso, uma vacina patrocinada pela Janssen Vaccines and Prevention B.V. se encontra em testes clínicos. Este estudo tem como objetivo testar a segurança e a imunogenicidade de duas doses diferentes da vacina em um teste clínico duplo-cego e controlado por placebo em dois locais, no Kansas e Massachusetts, Estados Unidos (Abbink et al., 2018).

1.2.4 Vacinas de DNA

As vacinas de material genético contra patógenos infecciosos, incluindo o ZIKV, constituem uma área ativa de investigação que vem crescendo desde a descoberta, na década de 1990, de que o DNA geneticamente modificado pode ser entregue na forma de vacina e desencadear uma resposta imune (Danko et al., 2011). Vacinas de DNA são plasmídeos codificando um gene de interesse sob o controle de um promotor. As vacinas de DNA podem ser desenvolvidas e produzidas rapidamente, e vem sendo estudadas devido a sua eficácia em ativar o sistema imune (celular e humoral) (Abbink et al., 2018, Deng et al., 2020). Acredita-se que vacinas de DNA sejam mais favoráveis quando comparadas a estratégias de vírus vivo

atenuado por garantirem maior segurança, uma vez que se trata de uma plataforma não infecciosa onde não há risco potencial de infecção ou mutagênese, especialmente ao considerar-se gestantes e mulheres em idade fértil como população alvo (Oliveira e Vasconcelos, 2016, Pardi et al., 2018).

Além das vantagens anteriormente citadas, as vacinas de DNA possuem relativa facilidade de produção quando comparadas à outras vacinas, estabilidade, baixo custo, capacidade de transporte a temperatura ambiente e adequadas para a produção em massa. Em contrapartida, essas vacinas geralmente não são eficazes em doses única, necessitam da adição de adjuvantes e equipamentos de injeção especializado, o que dificulta a produção e aplicação na população em países de baixa renda e potencialmente endêmicos. Portanto, a modificação plasmidial com promotores altamente eficientes, estratégias alternativas de entrega, doses múltiplas e a co-imunização com adjuvantes podem ser as formas de lidar com os desafios enfrentados (Deng et al., 2020).

A eficácia *in vivo* de uma nova vacina de DNA sintética direcionada às proteínas prM e do envelope do ZIKV foi avaliada por Muthumani e colaboradores (2016), em que camundongos e primatas não humanos foram imunizados. Nesse estudo foi observado que os animais vacinados geraram imunidade celular e humoral antígeno-específica e atividade de neutralização viral. Também, Abbink e colaboradores (2016) testaram uma vacina de DNA plasmidial e um vetor de sorotipo 52 de adenovírus de macacos *Rhesus* recombinante, expressando a proteína M do ZIKV, que também foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes e proteger completamente os macacos contra a infecção por ZIKV.

A primeira avaliação clínica da segurança e imunogenicidade de uma vacina de DNA ZIKV, expressando os genes das proteínas prM e E de ZIKV, foi liderada pela GeneOne Life Science e Inovio Pharmaceuticals (ensaio clínico NCT02887482). Nesse ensaio clínico, 160 participantes foram distribuídos em dois grupos e receberam uma dose de 0 mg ou 2 mg da vacina de DNA GLS-5700 por injeção intradérmica, com doses de reforço na semana 4 e 12. A vacina foi bem tolerada sem reações adversas graves relacionadas, e os níveis de anticorpos específicos do ZIKV na semana 14 foram avaliados por ELISA e ensaio de soroneutralização, os quais mostraram 100% de soroconversão no grupo vacinal, os títulos de anticorpos observados foram dependentes da dose (Abbink et al., 2018).

Uma vacina de DNA também foi proposta pelo NIAID. A vacina é composta por um único plasmídeo de DNA circular fechado que codifica as proteínas transmembrana M (prM) e do envelope (E) da amostra H/PF/2013 do ZIKV, e é fornecida em dose única de 4 mg com

injeção intramuscular. A vacina VRC5283 apresentou resultados promissores de anticorpos detectáveis e avançou para testes de eficácia da fase 2 (NCT03110770). No estudo clínico de fase 2 avaliou-se a segurança, imunogenicidade e a eficácia de um regime de vacinação de 3 doses com a vacina de DNA do ZIKV ou placebo, a previsão é que os testes sejam concluídos em 2022 e os dados serão informados assim que disponíveis (Gaudinski et al., 2018).

1.2.5 Vacinas de mRNA

Vacinas de mRNA (uma plataforma baseada em genes semelhante às vacinas de DNA), também foram desenvolvidas para ZIKV. Como para flavivírus, o mRNA é traduzido diretamente em uma proteína após entrar no citoplasma celular, as vacinas mRNA contornam a necessidade de atravessar o envelope nuclear para serem expressas. Esse caminho poderia potencialmente diminuir as doses necessárias para as vacinas de mRNA, mantendo a imunogenicidade observada com vacinas de DNA (Pardi et al., 2018).

O uso de mRNA tem várias características benéficas, entre elas a segurança, assim como nas plataformas de DNA, uma vez que o mRNA é degradado por processos celulares normais. Em segundo lugar, a eficácia: várias modificações tornam o mRNA mais estável e altamente traduzível. O mRNA é o vetor genético mínimo: assim, a imunidade antivectorial é evitada e as vacinas de mRNA podem ser administradas repetidamente. Em terceiro lugar, a produção: as vacinas de mRNA têm o potencial para uma fabricação rápida, barata e escalável, principalmente devido aos altos rendimentos das reações de transcrição *in vitro* (Kariko et al., 2008, Pardi et al., 2018).

Para avaliar a resposta imune para ZIKV, mRNA contendo a sequência das proteínas prM e E foi encapsulado em uma nanopartícula lipídica para maior estabilidade da sequência e foi feita a imunização de camundongos e primatas não humanos. Reichmuth e colaboradores (2016) observaram que a vacina proposta induziu altos níveis de anticorpos neutralizantes que protegiam contra a infecção por ZIKV. Nos modelos de gravidez de camundongos, as vacinas de mRNA previniram a morte fetal, enquanto a reabsorção fetal foi observada em camundongos infectados não imunizados. No entanto, os níveis de material genético do vírus ainda poderiam ser detectados no baço materno e no cérebro, bem como na placenta e cabeça fetal em camundongos imunizados (Pardi et al., 2017).

Três ensaios clínicos em humanos, fase I/II liderado pela Moderna Therapeutics, foram realizados para avaliar a segurança e a imunogenicidade de duas vacinas baseadas em plataformas de mRNA: mRNA-1325 (NCT03014089) e mRNA-1893 (NCT04064905 e

NCT04917861). As estratégias avaliam a segurança e eficácia das vacinas em participantes soropositivos e soronegativos para flavivírus. As vacinas de mRNA podem ser econômicas, pois um número alto de doses pode ser produzido de forma eficiente. No entanto, resta determinar se os dados pré-clínicos promissores se traduzem em humanos. As propriedades imunoestimulatórias das vacinas de mRNA podem ser aumentadas com a inclusão de um adjuvante. Além disso, a estabilidade das vacinas de mRNA precisa ser levada em consideração (Abbink et al., 2018, Pardi et al., 2017).

Ainda, recentemente foi realizado um ensaio clínico liderado pelo NIAID avaliando a eficácia da vacina de mRNA (NCT03008122) em Porto Rico, área endêmica de flavivírus (dados não publicados).

1.2.6 Vacinas de subunidades recombinantes

As vacinas de subunidade consistem em proteínas ou peptídeos que são sabidamente imunogênicos, podendo-se incluir as proteínas estruturais ou não-estruturais. Antígenos de diversos vírus, principalmente a proteína E ou seus domínios, têm sido produzidos em sistemas de expressão para geração de candidatos vacinais de subunidade, as quais são capazes de induzir de moderados a altos níveis de anticorpos após imunização em camundongos (Tripathi & Shrivastava, 2018).

Em comparação com as abordagens tradicionais de vacinas atenuadas ou vivas, as vacinas de proteínas recombinantes oferecem um grande benefício em função da maior segurança. Por envolverem proteínas de antígeno recombinantes altamente purificadas, essas vacinas podem fornecer uma vacinação mais segura devido à ausência de impurezas. Além disso, o uso de uma vacina de subunidade proteica pode evitar as preocupações que giram em torno do uso de uma vacina atenuada viva, como uma reversão complicada a um vírus patogênico em pacientes imunocomprometidos (Kim et al., 2021).

Diversos estudos relatam o papel importante desempenhado por anticorpos neutralizantes na proteção contra a infecção por muitos flavivírus, esses anticorpos são diretamente correlacionados com a robusta proteção de vacinas aprovadas contra vírus da febre amarela (YFV) e o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) (Belmusto-Worn et al., 2005, Heinz et al., 2007). Nos exemplos bem-sucedidos baseados nesses outros flavivírus, as vacinas de subunidades recombinantes vêm apresentando resultados confirmatórios

relacionados ao alto efeito preventivo e ao rápido tempo de desenvolvimento (Ali et al., 2017, Han et al., 2017).

Para os flavivírus, sabe-se que a Proteína E é responsável por mediar a montagem viral, a ligação a receptores celulares, essencial para a fusão de membrana subsequente envolvida na entrada do vírus na célula, determinante do tropismo celular e um antígeno importante na obtenção de anticorpos neutralizantes durante a resposta imune, uma vez que é um dos principais alvos das respostas dos anticorpos do hospedeiro (Ye et al., 2016). Estudos de mapeamento de anticorpos e epítomos funcionais demonstraram que os três domínios são antigênicos e reconhecidos por anticorpos neutralizantes que inibem o processo de entrada viral (Heinz & Stiasny, 2012, Stiasny et al., 2013, Han et al., 2017). Particularmente o domínio III da proteína E dos flavivírus contém os epítomos de ligação ao receptor celular. Recentemente, descobriu-se que esse domínio também é alvo de vários anticorpos específicos contra o ZIKV, com atividades neutralizantes distintas, mas potentes, sendo, portanto, um alvo lógico para projetar vacinas de subunidades para ZIKV baseadas em proteínas (Yang et al., 2017).

Devido às vantagens citadas, vacinas que induzem títulos elevados de anticorpos neutralizantes vêm se tornando candidatos vacinais eficazes contra o ZIKV. No estudo de Han e colaboradores (2017), a proteína E de ZIKV com 90% da região N-terminal preservada foi clonada e expressa em *Escherichia coli* (*E. coli*), purificada, caracterizada e, posteriormente, utilizada como indutor de resposta humoral específica para ZIKV em modelos de camundongos adultos e neonatos. Sendo o recombinante ZIKV E90 descrito, apontado como uma vacina promissora e indicada para testes clínicos.

Qu e colaboradores (2018) também desenvolveram e avaliaram a resposta imune de uma vacina para o ZIKV baseada na proteína E recombinante, demonstrando que o Domínio III da proteína E produzido em células de *Drosophila* S2 induz eficientemente respostas de anticorpos protetores em camundongos, além de serem facilmente purificados, proporcionando assim uma vantagem significativa sobre a expressão em *E. coli*, onde as proteínas se acumulam como corpos de inclusão e requerem, portanto, um processo complexo de desnaturação/redobramento para purificação. Adicionalmente, proteínas do envelope produzidas em células de inseto apresentam modificações pós-traducionais importantes, como a adição de açúcares ao esqueleto proteico, o que não ocorre em proteínas produzidas por bactérias. Além da capacidade de induzir resposta de anticorpos neutralizantes, Qu e colaboradores observaram que esse domínio da proteína E foi capaz de induzir a produção de células T CD4+, fato que contribui para a proteção induzida pela vacina contra a infecção pelo ZIKV.

A seleção dos sistemas de expressão das proteínas recombinantes depende de alguns fatores principais, como o rendimento da proteína, sua qualidade, capacidade de escalonar, tempo e custo de produção. A maioria das proteínas virais recombinantes para estudos de desenvolvimento de vacinas são produzidas em bactéria (*E. coli*), leveduras (*S. cerevisiae* e *P. pastoris*), células de mamíferos (HeLa, HEK, Vero e BHK), células de insetos (Sf-9 e S-2), ou plantas transgênicas (*Nicotiana tabacum* e *N. benthamiana*). Os estudos seguem na perspectiva da produção da proteína E vir a ser otimizada, com eficácia e segurança aumentada (Tripathi & Shrivastava, 2018).

Contudo, as vacinas de subunidade apresentam algumas das dificuldades enfrentadas pelas vacinas de vírus inativados, como a necessidade de adjuvantes e de múltiplas doses para uma imunização eficaz, além de desafios na produção dos domínios da proteína utilizada. Coletivamente, os estudos sugerem que a resposta imunológica neutralizante às vacinas de flavivírus utilizando proteína E recombinantes são viáveis. Além disso, este tipo vacinal pode ser considerado seguro, pois não é necessária a manutenção de vírus em cultura de tecidos e não há inoculação de agentes viáveis nos indivíduos vacinados (Zlatkovic et al., 2011, Yang et al., 2017).

A distribuição de proteínas/peptídeos terapêuticos vem sendo amplamente estudada nos últimos anos, embora as perspectivas em sua utilização sejam grandes, existem algumas limitações após a sua administração, uma vez que proteínas exógenas livres no organismo podem estar sujeitas a condições de eliminação ou degradação, baixa biodistribuição e solubilidade ou mudanças conformacionais indesejadas. Para evitar essas limitações é recomendável a utilização de proteínas acopladas a sistemas de carreadores, responsáveis por aumentar as propriedades de distribuição, o direcionamento e taxa de entrega, as ações farmacológicas e terapêuticas e consequente ação no sistema imune (Tiwari et al., 2012, Vieira & Gamarra, 2016).

1.2.7 Adjuvantes vacinais

Cada vez mais, a literatura aborda a necessidade das plataformas vacinais possuírem a função de proteção a longo prazo. Uma estratégia atraente é estudar o desenvolvimento da memória em plataformas vacinais não vivas, buscando formas sobre como alcançar uma melhor duração de proteção. O componente-chave da maioria das plataformas vacinais que é

extremamente necessário para estimular uma resposta imune significativa é o adjuvante vacinal (Lycke et al., 2010).

Adjuvantes vacinais são substâncias que através da associação física ou química com antígenos ajudam a melhorar e modular a imunogenicidade do mesmo, uma vez que atuam impulsionando o sistema imunológico (Kwissa et al., 2007, Di Pasquale et al., 2015, He et al., 2015). Os adjuvantes são frequentemente usados para vacinas de subunidades porque essas vacinas não possuem alguns dos componentes intrínsecos presentes em patógenos inteiros que desencadeiam a resposta imune inata, de modo que uma resposta adaptativa a jusante eficaz seja menos provável de ser alcançada (Vetter et al., 2018).

Nas últimas décadas, centenas de materiais foram estudados como potenciais adjuvantes, exemplos incluem metabólitos bacterianos, óleos minerais, surfactante com estimulante imunológico, micropartículas, ácidos nucleicos, lipossomos e polissacarídeos (He et al., 2015). Em geral, esses adjuvantes funcionam por meio de vários mecanismos de apresentação de antígeno, entrega de antígeno para células dendríticas (DC), recrutamento de células do sistema imunológico e imunomodulação (Wang & Singh, 2011).

Os benefícios na identificação de adjuvantes eficazes e seguros englobam o uso de uma menor dose do antígeno e um meio de deslocar a resposta imune em direção a um fenótipo de célula T específico (Th1, Th2 ou Th17) para montar a resposta apropriada contra o patógeno em questão, de forma que esta seja mais robusta (Mbow et al., 2010). A potencialização pode estar relacionada a fatores como a liberação vagarosa do antígeno no organismo e ao aumento de captação de células apresentadoras de antígenos (APC) para ativação da resposta imune. (Lycke et al., 2010). Assim, a combinação certa de antígenos e adjuvantes pode potencializar a resposta imune, permitindo o desenvolvimento de vacinas mais eficazes (Di Pasquale et al., 2015).

Devido à capacidade de ativar respostas imunes inatas, os adjuvantes podem ampliar ou estender as respostas imunes e melhorar as respostas de memória, permitindo assim reduzir o número de doses necessárias ou a quantidade de antígeno necessária em cada dose. Os adjuvantes também podem melhorar as respostas imunes em populações com respostas tipicamente baixas (como bebês, idosos ou indivíduos imunocomprometidos) (Di Pasquale, 2015). A identificação de adjuvantes vacinais que podem ajudar a desencadear uma resposta imune ampla e sustentada em populações imunologicamente hiporresponsivas é extremamente necessária. Já que, na maioria dos casos, as vacinas preventivas são administradas a um grande

número de crianças saudáveis nos primeiros anos de idade, portanto, devem ser seguras e bem toleradas (Mbow et al., 2010).

O conhecimento sobre adjuvantes é extremamente importante, especialmente no esforço para combater patógenos, uma vez que as características citadas podem ter implicações importantes para melhorar o fornecimento global de vacinas, importante fator a ser observado, ilustrado atualmente na Pandemia de Covid-19 (Danielsson & Eriksson, 2021).

1.2.7.1 Alúmen

Os adjuvantes à base de alumínio têm um histórico bem estabelecido, foram introduzidos como adjuvantes em vacinas por Glenny e colaboradores em 1926, quando demonstraram a adição de sais de alumínio para aumentar a imunização contra a Difteria em humanos, em comparação com o uso apenas das toxinas. Hoje, sabe-se que os adjuvantes à base de alumínio são capazes de induzir fortes respostas imunes humorais, mediadas principalmente por anticorpos específicos para o antígeno secretados, particularmente IgG1 (He et al., 2015, Danielsson & Eriksson, 2021).

As primeiras vacinas com alumínio foram preparadas pela adição de base a uma solução de antígeno misturado com sulfato de potássio de alumínio, resultando em precipitação do antígeno e de um sal de alumínio. O nome comum do sulfato de potássio de alumínio é alúmen, e é o adjuvante mais amplamente usado, com um registro de uso bem-sucedido na vacinação humana há mais de 70 anos (Danielsson & Eriksson, 2021). O alúmen é incorporado a uma variedade de vacinas contra doenças em que anticorpos neutralizantes são tidos como necessários para a proteção, e é encontrado em várias vacinas em uso, incluindo vacinas para Hepatite A, Hepatite B, Papilomavírus humano (HPV), Difteria e Tétano (DT), *Haemophilus influenza* (Mbow et al., 2010, Oleszycka et al., 2014).

Em geral, a absorção do alúmen aumenta a captação do antígeno e a estabilidade no local de aplicação da vacina. Além disso, o alúmen induz uma reação pró-inflamatória local que pode aumentar a imunogenicidade (Mbow et al., 2010). As explicações atuais para o modo de ação dos adjuvantes à base de hidróxido de alumínio incluem, entre outros, o efeito repositório, efeito pró-fagocítico e ativação da via NLRP3 pró-inflamatória. Até recentemente, os adjuvantes à base de hidróxido de alumínio eram conhecidos por ativar preferencialmente respostas imunes do tipo Th2. No entanto, os resultados de estudos mais recentes mostram que,

dependendo da rota de vacinação, os adjuvantes à base de hidróxido de alumínio podem melhorar tanto as respostas celulares Th1 quanto Th2 (He et al., 2015).

1.2.7.2 Monofosforil lipídio A (MPLA)

O Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) é um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas que possui importantes propriedades imunomodulatórias. O LPS é reconhecido pelo receptor Toll-Like 4 (TLR4), o qual é expresso em uma variedade de leucócitos e ativa vias de sinalização. A ativação da sinalização induz a produção de numerosos mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico, que facilitam as características da inflamação, como aumento da permeabilidade vascular, formação de edema e recrutamento de leucócitos. No entanto, a aplicabilidade clínica do LPS como agente terapêutico ou profilático é impedida pela toxicidade e um índice terapêutico estreito em humanos (Romero et al., 2011).

O Lipídio Monofosforil A (MPLA) é um derivado do lipopolissacarídeo que é usado como adjuvante vacinal (Khoruts et al., 2018). O MPLA é produzido por hidrólise do lipídio difosforila nativo A, sendo um componente do LPS reconhecido pelo TLR4, resultando na remoção de todos, exceto um único grupo fosfato. Tais alterações diminuem a toxicidade em 99% em relação ao lipídio nativo A, gerando em um agente imunomodulatório com maior potencial de uso clínico. A toxicidade atenuada do MPLA é associada a redução da indução de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interferon gama (IFN- γ) durante a exposição inicial (Romero et al., 2011).

Semelhante ao LPS, ele exerce sua ação por meio do receptor toll-like 4 (Wang & Shing, 2011). O MPLA induz uma forte resposta imune de células auxiliares T CD4 tipo 1 (Th1), que desempenha um papel crítico na maturação da afinidade de anticorpos e é licenciado como adjuvante vacinal na Europa e nos EUA (Chen et al., 2019). A vacina de papilomavírus humano (HPV) 16/18 (Cervarix®) é uma vacina recombinante não infecciosa produzida usando partículas purificadas semelhantes a vírus (VLPs) que induz uma forte resposta imunogênica com altos níveis de anticorpos anti-L1 VLP. O adjuvante utilizado na vacina (AS04) é composto por hidróxido de alumínio juntamente com monofosforil lipídio A, os quais são responsáveis por potencializar a resposta imune celular e humoral. A vacina AS04-adjuvante HPV 16/18, administrada em um cronograma de três doses ao longo de 6 meses, é capaz de induzir uma alta resposta imunogênica e é altamente protetora contra a neoplasia intraepitelial cervical e

infecção relacionada a tipos de HPV oncogênicos de alto risco (McKeage & Romanowski, 2011).

Antígenos recombinantes de *Leishmania* e *Toxoplasma* ao serem combinados com adjuvantes derivados de lipídio A apresentaram respostas enviesadas em Th1 e Th2 (Wang & Shing, 2011). Ainda, diversos estudos avaliaram o potencial uso de MPLA com o objetivo de melhorar a eficiência de vacinas contra os vírus da raiva (Chen et al., 2016), gripe (Patil et al., 2014) e HIV (Poiliot et al., 2014).

Diversos grupos de pesquisa têm buscado por novas combinações de diferentes adjuvantes vacinais, a fim de obter novas formulações. Coelho-dos-Reis e colaboradores (2016) demonstraram em seu estudo que o MPLA combinado com 7DW8-5 (um potente análogo de α -GalCer) exibe um efeito adjuvante robusto e é capaz de promover os níveis de respostas de células T CD8⁺ específicas e imunidade protetora contra malária e câncer. Para tal, a formulação de adjuvantes proposta foi combinada com um antígeno da malária, uma proteína circunsporozoita de *Plasmodium yoelii*, e um antígeno tumoral de Wilms Tumor-1 (WT-1). Os antígenos foram combinados com 7DW8-5 e MPLA em regimes de imunização isolados e co-administrados com resultados satisfatórios, tornando essa combinação uma promissora formulação de adjuvante de vacinas.

O α -galactosylceramida (α -GalCer) é um agonista de células NKT dependente de CD1d, também tem sido usado como adjuvante para aumentar a eficácia de diferentes vacinas experimentais. O efeito adjuvante do α -GalCer e seus análogos é mostrado como mediado por moléculas CD1d, células NKT e interferon tipo I (Padte et al., 2013). 7DW8-5, é um glicolipídio sintético derivado do α -galactosylceramida (α -GalCer), estima-se que o efeito adjuvante de 7DW8-5 é cerca de 100 vezes o de α -GalCer (Feng et al., 2022). Anteriormente, o 7DW8-5 mostrou um efeito adjuvante nas vacinas experimentais contra a malária (Padte et al., 2013), influenza (Kopecky-Bromberg et al., 2009) e HIV (Feng et al., 2019).

1.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência envolvida na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos com dimensões entre 1 e 100 nm (onde 1 nm corresponde a 10^{-9} m). Trata-se de uma ciência multidisciplinar que envolve engenharia, física, química, biologia e medicina (Sahoo et al., 2007). Os nanomateriais são encontrados em uma, duas e três dimensões. Materiais na nanoescala apresentam propriedades funcionais únicas, devido à sua elevada área superficial que está diretamente relacionada à grande interação existente entre o nanomaterial e a matriz no qual está inserido (Chau et al., 2007).

O controle do tamanho físico dos materiais pode ser usado para ajustar suas propriedades, as quais existem nesses materiais devido ao efeito de superfície e confinamento. Sendo assim, as propriedades magnéticas, ópticas, catalíticas e de transporte de cada material dependem diretamente do tamanho, devido às restrições de movimentação dos elétrons e formato do material (Murray et al., 2000).

A aplicação da Nanotecnologia na biologia e medicina é uma área promissora e com impacto direto na vida dos humanos (Sun et al., 2008, Dykman et al., 2011). A utilização de nanomateriais faz com que as instrumentações e metodologias tradicionais sejam potencialmente melhoradas. Entre os nanomateriais mais utilizados estão as nanopartículas de ouro, prata, cobre, albumina, nanotubos de carbono, lipossomos, nanopartículas de albumina e óxido de zinco (figura 7) (Sun et al., 2008, Versiani et al., 2017, Ma et al., 2020, Medhi et al., 2020). Os quais possuem as mais diversas aplicações, seja como biosensores de diagnósticos, carreadores vacinais, terapia de câncer, entrega de fármacos, imagem e estratégia de tratamento antimicrobiano (Dykman et al., 2011, Tiwari et al., 2012, Patra et al., 2018, Ma et al., 2020, Medhi et al., 2020).

Devido às suas dimensões reduzidas, as nanopartículas podem penetrar em diversas regiões do organismo de um indivíduo por serem menores que células humanas, utilizadas para diagnóstico ou terapia, oferecem interações com biomoléculas, tanto na superfície quanto no interior das células (Sun et al., 2008). A possibilidade de incorporação de diversos tipos de moléculas na superfície das nanopartículas permite a adição de propriedades adicionais ao nanomaterial. A eficiência do carreamento ainda pode ser potencializada ao se utilizar sistemas com poros ou utilizando sistemas com três dimensões, como no caso de nanopartículas metálicas (Tiwari et al., 2012).

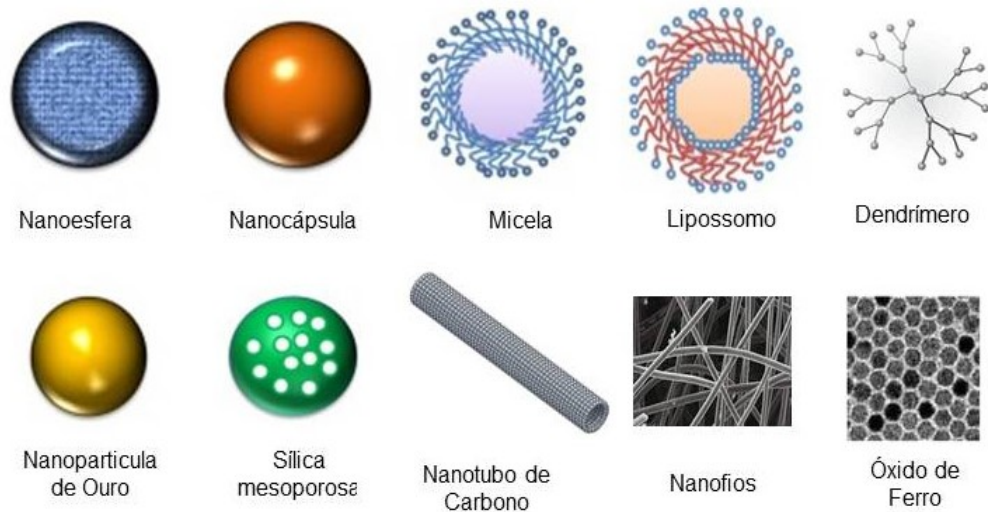


Figura 7. Representação de nanoestruturas. As nanoestruturas representadas como exemplos orgânicos são: nanoesfera, nanocápsula, micela, lipossomo, dendrímero. Já as nanoestruturas Inorgânicas estão representadas por: nanopartícula de Ouro, sílica mesoporosa, nanotubo de carbono, nanofios e óxido de Ferro (Adaptado de Aguirre et al., 2016).

1.3.1 Nanopartículas de Ouro (GNP)

As nanopartículas de ouro (GNP) são definidas como partículas de 1 a 100 nm de tamanho, no regime de comprimento de onda da luz visível (Jeong et al., 2019). As GNP são as nanopartículas metálicas mais estáveis e versáteis relatadas até o momento, e apresentam aspectos fascinantes, como sua existência em vários formatos e tamanhos, o comportamento das partículas individuais, alta estabilidade química e biocompatibilidade, disponibilidade através de síntese de fase líquida fácil e modificação de superfície, além das propriedades químicas, eletrônicas, magnéticas, mecânicas, térmicas e ópticas únicas, tornando-as promissoras para as ciências biomédicas (Daniel & Astruc, 2004, Loh et al., 2016, Xie et al., 2017, Sani et al., 2021).

O ouro foi um dos primeiros metais descobertos pelos humanos, é um metal inerte e resistente à oxidação que sempre esteve presente na história da humanidade em seus mais distintos momentos (Dykman & Khlebtsov, 2011). O exemplo mais antigo conhecido da utilização de nanomateriais é a Taça de Licurgo exposto no British Museum (figura 8), proveniente dos tempos Romanos, fabricado no século IV d.C. Análises de sua matriz revelam coloides de ouro (GNP) e de prata (SNP) que medem aproximadamente 70 nm na proporção 1:4 (GNP:SNP). Essa composição, com capacidade eficiente de espalhamento e reflexão da luz, faz com que ela possua a propriedade dicróica, mudando sua coloração dependendo da luz incidente, resultando em cores distintas e brilhantes, sendo vermelho à luz transmitida de dentro da taça e verde à luz refletida (Castro et al., 2019).



Figura 8. Taça de Licurgo. Feita de vidro com nanopartículas de ouro e prata, datada do século IV d.C. A taça exibe cor verde quando a luz incide de fora para dentro e cor vermelha se iluminado de dentro para fora (fonte: Hypescience, 2014).

Nos séculos V e VI, cientistas chineses, árabes e indianos obtiveram ouro coloidal e o usaram para fins médicos. Na idade média, ouro nanoparticulado foi utilizado empiricamente para tratamentos de estética e fins curativos, sendo relatado seu uso combinado a extratos vegetais no tratamento de males como disenteria, epilepsia, transtornos mentais, sífilis e problemas cardíacos. Em 1880 foi apresentado um método para tratar o alcoolismo por injeção intravenosa de uma solução de ouro coloidal. Mais tarde, em 1927, o uso de ouro coloidal foi proposto para aliviar o sofrimento de pacientes inoperáveis contra o câncer através da ingestão de partículas de ouro coloidal, denominado na época por “ouro potável ou solúvel” (Dykman & Khlebtsov, 2011).

Apesar do conhecimento histórico, somente nas últimas décadas o uso de GNP em pesquisas biológicas começou a ser compreendido. Em 1970, os pesquisadores britânicos W. P. Faulk e G.M. Taylor descreveram pela primeira vez uma técnica para conjugar anticorpos com ouro coloidal para visualização microscópica eletrônica direta de antígenos da superfície de *Salmonella*, representando o marco inicial onde conjugado de ouro coloidal serviu como marcador imunológico (Dykman & Khlebtsov, 2011). Desde então, um corpo crescente de pesquisas é dedicado ao uso potencial dessas nanopartículas no diagnóstico e tratamento de infecções, uma vez que mesmo sendo consideradas biologicamente inertes, tais partículas podem ser projetadas para possuir funcionalidade, de forma que se tornem atraentes para diversas aplicações (Pissuwan et al., 2010).

As GNP podem apresentar diferentes formatos (figura 9), entre os quais estão: nanoesferas (do inglês, “*nanospheres*”), nanobastões (do inglês, “*nanorods*”), nanoconchas (do inglês, “*nanoshells*”), nanocaixas (do inglês, “*nanocages*”) (Cai et al., 2008). As nanoconchas

de ouro são compostas de um núcleo de silício em torno de 100 nm e uma fina casca de ouro de cerca de poucos nanômetros. Já as nanocaixas de ouro são nanoestruturas de ouro ocas e porosas, que são formadas por uma reação de substituição galvânica entre nanocubos de prata e ácido aúrico em solução aquosa (Huang et al., 2010).

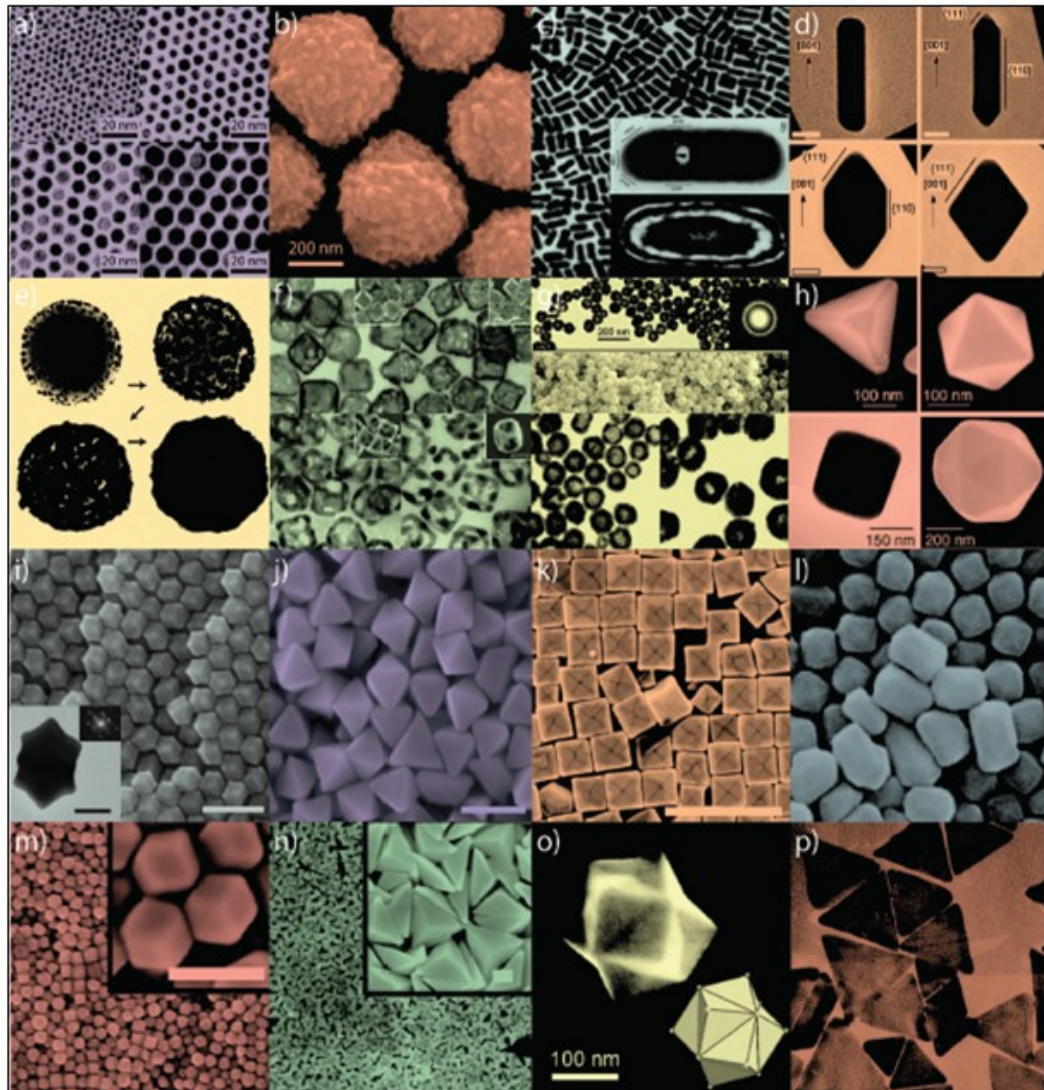


Figura 9. Micrografias eletrônicas de nanopartículas de ouro em várias formas e tamanhos (a) Nanoesferas pequenas (b) Nanoesferas grandes (c) Nanobastões (d) Nanobastões com extremidades afiladas (e) Nanoshells (f) Nanocages (g) Nanosferas ocas (h) tetraedra/octaedra/cubos/ isosaedra (i) dodecaedra rômbrica (j) octaedra (k) nanocubos côncavos (l) tetrahedra (m) dodecaedra rômbrica (n) bipirâmides triangulares obtusas (o) trisoctaedra e (p) Nanoprismas (fonte: Versiani, 2014).

1.3.2 Processos de Síntese de GNP

O primeiro pesquisador a descrever a síntese de GNP foi Michael Faraday, em 1857, quando utilizou fósforo branco como agente redutor e o dissulfeto de carbono como

estabilizante, resultando em uma solução de coloração Rubi (Dreaden et al, 2012). Desde então, grandes esforços têm sido dedicados à síntese, estabilização e funcionalização de GNP com tamanho e formato controlados, haja visto as propriedades ópticas fascinantes que tais partículas nanométricas possuem (Brust et al., 1994, Daniel & Astruc, 2004).

Atualmente, os métodos de preparação dos GNP incluem processos químicos, físicos e biológicos (seja por enzimas, microrganismos ou plantas). As diferentes metodologias empregadas buscam controlar tamanhos e formas das GNP, sua estabilidade em relação ao ar e altas temperaturas e eficiência da reprodutibilidade do método (Sani et al., 2021).

Os Nanobastões de Ouro (GNR) são geralmente sintetizados pelo método Físico, chamado de Método de crescimento por semente, onde nanopartículas com diâmetros de 5 nm atuam como sítios de nucleação e são adicionadas em uma solução aquosa contendo sal de ouro, nitrato de prata, ácido ascórbico e CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), essencial para a formação controlada das nanopartículas de ouro com a morfologia de bastão. Na solução aquosa, o sal de ouro (AuCl_4^-) é suavemente reduzido, enquanto o CTAB direciona a ligação dos íons Au^+ reduzidos nas laterais das sementes. Embora a largura dos nanobastões formados por este método sejam razoavelmente constantes, o comprimento pode ser prolongado aumentando a adição de nitrato de prata ou outros sais sobre o nanobastão (Huang et al., 2009, Dreaden et al., 2011).

Uma vez sintetizadas, as soluções de GNR são centrifugadas para remoção do excesso de CTAB, íons metálicos não reagidos e ácido ascórbico. Este passo é importante pela toxicidade conhecida do CTAB e também pela falha em remover espécies não reagidas resultar em alterações morfológicas dos nanobastões ao longo do tempo (Stone et al., 2010). Melhorar o desempenho de síntese exige um profundo conhecimento dos mecanismos pelos quais os nanobastões crescem, permitindo que o rendimento das reações seja melhorado, formas anisotrópicas sejam manipuladas em detalhes mais requintados e que a dependência de grandes quantidades de surfactantes citotóxicos para alcançar o controle da forma seja reduzida (Lohse & Murphy, 2013).

1.3.3 Propriedades ópticas das Nanopartículas de Ouro (GNP)

As GNP exibem propriedades ópticas fascinantes que podem ser ajustadas em uma ampla faixa espectral controlando os parâmetros geométricos das nanopartículas. O tamanho e a forma dos nanomateriais têm um impacto profundo em suas características, influenciando a

estabilidade e mobilidade. Além disso, é importante notar que as características físicas e químicas (como fluorescência, condutividade elétrica ou reatividade química) dos materiais na escala nanométrica são significativamente diferentes em comparação aos seus análogos em escalas maiores (Sztandera et al., 2019).

1.3.3.1 Ressonância de Plasmon de superfície

A característica chave que distingue as GNP dos outros nanomateriais é sua propriedade óptica única, resultante de um fenômeno físico conhecido como ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR), o qual está presente tipicamente em nanoestruturas de materiais plasmônicos, como ouro, prata, cobre e alumínio (Jeong et al., 2019). Essa propriedade resulta da oscilação coletiva dos elétrons (plasmons) excitados por radiação eletromagnética (EM), gerando uma separação de cargas entre os elétrons livres e os núcleos iônicos do metal (figura 10) (Schmid & Corain, 2003, Willets & Duyne, 2007).

Os termos “localizado” e “superfície” são usados para se referir a ressonância que está localizada na superfície e as oscilações livres dos elétrons que estão confinadas em um espaço finito, definido pelas dimensões das GNP. A LSPR manifesta-se como um efeito combinado resultante tanto da absorção quanto do espalhamento no espectro das nanopartículas. Uma das características que advém destas oscilações coletivas dos elétrons livres é a cor características de cada GNP (Kumar, 2013).

O modelo atômico de Bohr é capaz de explicar algumas características acerca dos níveis energéticos dos sólidos na escala nanométrica. Cada átomo possui níveis de energia bem definidos, entretanto, ao serem excitados por luz seus elétrons podem fazer transição entre bandas (d para sp), resultando em uma emissão de luminescência de fótons. Assim, os elétrons se propagam livremente sobre a extensão metálica da GNP, levando a fenômenos de ressonância óptica únicos e sensíveis à radiação eletromagnética. Ainda, as propriedades radioativas e de campo magnético podem ser aumentadas graças a capacidade de confinamento de fótons ressonantes que essas GNP possuem (Fan et al., 2014).

Assim, quando uma nanoestrutura metálica é iluminada por um comprimento de onda incidente apropriado, os elétrons localizados na nanoestrutura metálica oscilam e criam fortes ondas de superfície. A superfície curva da partícula gera uma força restauradora eficaz nos elétrons de condução para que a ressonância possa surgir (Chung et al., 2011). A LSPR é iniciada pela interação do campo elétrico da luz visível com o elétron confinado da partícula.

O comprimento de onda onde a LSPR é observada depende do tamanho e da forma da partícula e das propriedades dielétricas do meio circundante (Schmid & Corain, 2003).

Os nanobastões de ouro vem chamando a atenção devido à sua ressonância de plasmon de superfície única e oscilações coletivas de elétrons transversais (LSPR-T) e longitudinais (LSPR-L) (Stone et al., 2010). Assim, os GNR apresentam dois tipos diferentes de oscilações dependente da polarização da luz incidente: um está associado a oscilação em torno do eixo menor (LSPR-T), que induz uma banda de absorção similar às nanoesferas (figura 10C), e o outro em associado a oscilação dos elétrons em torno do eixo maior (LSPR-L), que induz uma banda de absorção muito mais forte (figura 10D) (Lohse & Murphy, 2013).

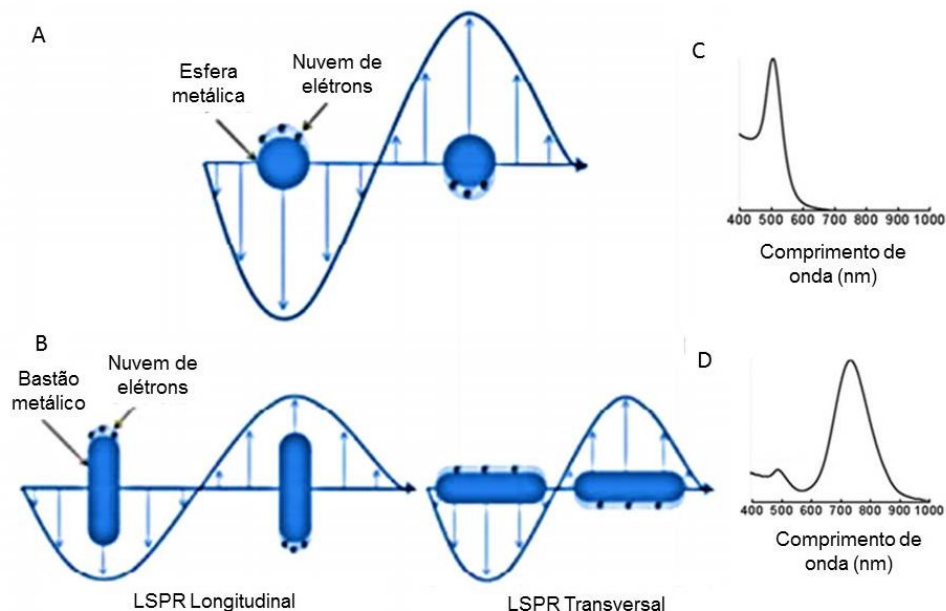


Figura 10. Esquema de oscilação de uma nanopartícula após irradiação de luz. (A) Movimento ondulatório é proveniente da interação entre os elétrons livres da superfície e o campo elétrico gerado pela nanoesfera **(B)** Movimentos longitudinal e transversal proveniente da interação entre os elétrons livres da superfície e o campo elétrico gerado pelo nanobastão. Diferença entre ressonância **(C)** das nanoesferas para **(D)** os nanobastões. Devido à forma anisotrópica dos nanobastões, dois picos de absorção podem ser observados (Adaptado: Willets & Duyne, 2007).

1.3.3.2 Cores do Ouro

Para o ouro há uma ampla possibilidade relacionada a coloração refletida, o qual possui coloração amarelada na forma a granel, cor vermelha para partículas menores que 100 nm e também azul em filmes finos de GNP (figura 11a). Além disso, o ouro coloidal, em comparação com o ouro a granel, é considerado altamente reativo, o que amplia consideravelmente seu

potencial de aplicação, fornecendo propriedades eletrônicas, catalíticas e antioxidantes, bem como a possibilidade de modificações superficiais (Sztandera et al., 2019).

Além do fator de formato para ajuste de propriedades ópticas, a variação da estrutura pode resultar em fenômeno semelhante. Dois exemplos incluem as nanoconchas e as nanocaixas de ouro. A casca presente nas nanoconchas é formada pelo envelhecimento dos aglomerados de ouro ligados ao núcleo de silício. A mudança na coloração é explicada como resultado da hibridização dos plasmons da esfera interna e da cavidade externa. O comprimento de onda LSPR de nanoconchas de ouro pode ser controlado alterando a espessura da casca. A diminuição da espessura da casca de ouro de 20 para 5 nm leva à mudança LSPR de cerca de 300 nm, o que é atribuído ao aumento do acoplamento entre os plasmons de superfície da concha interna e externa para partículas de conchas mais finas (figura 11b) (Huang & El-Sayed, 2010).

O tamanho geral das nanocaixas é de cerca de 50 nm de largura e comprimento de onda LSPR em torno de 800 nm. Controlando a quantidade de solução de ácido aúrico, a LSPR de nanocaixas de ouro poderia ser ajustada a região NIR (Espectroscopia de infravermelho próximo) com comprimento de onda especificado, influenciando diretamente na coloração observada das nanocaixas (figura 11c) (Huang & El-Sayed, 2010).

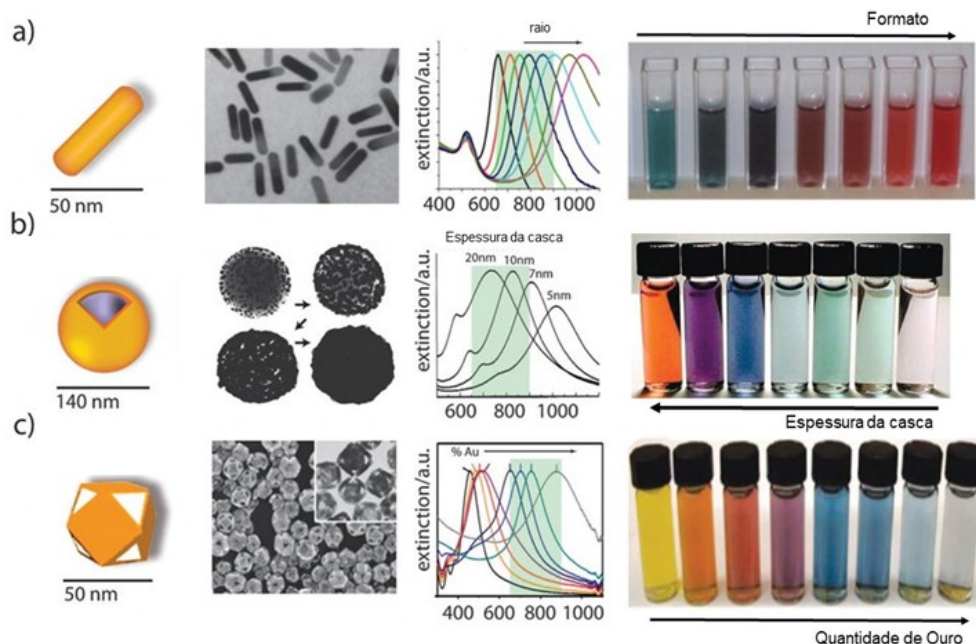


Figura 11. Nanopartículas de ouro comumente usadas. Ilustrações gráficas, micrografias eletrônicas de transmissão e espectros de extinção sinteticamente ajustáveis para (a) nanobastões de ouro (b) nanoconchas de ouro e (c) nanocaixas de ouro. Os desvios espectrais com as setas são indicados para aumentar a razão de aspecto, diminuir a espessura da casca e aumentar a quantidade de ouro, respectivamente (Adaptado de Huang & El-Sayed, 2010, Dreaden et al., 2011).

1.3.4 Toxicidade Celular e Biocompatibilidade

Diante de suas inúmeras propriedades, as GNP encontraram aceitação em seu uso devido à sua estabilidade, baixa toxicidade e tamanho controlável pela síntese. Aliadas à sua capacidade de conjugação com DNA e proteínas, sendo incorporadas em uma infinidade de novos produtos de aplicações biomédicas (Astruc et al., 2014). E à medida que os potenciais de utilização aumentam, a preocupação quanto ao impacto de sua interação com tecidos biológicos e moléculas, com a possibilidade de toxicidade na saúde humana e ambiental também aumenta (Alkilany & Murphy, 2010, Barreto et al., 2011).

Devido ao grande número de variáveis, como diferentes linhagens celulares e materiais com propriedades físico-químicas distintas, a caracterização da toxicidade das GNP constitui um desafio. Assim, é necessária uma rigorosa compreensão da relação entre as propriedades físicas e químicas da nanoestrutura e seu comportamento no sistema biológico (Fadeel & Garcia-Bennett, 2010).

A biocompatibilidade por sua vez é definida como “a capacidade de um material em realizar uma resposta adequada do hospedeiro, em uma situação específica” (Naahidi et al., 2013) e corresponde à benignidade da relação entre um material e seu ambiente biológico (Kohane & Langer, 2010). Quando as GNP são utilizadas como carreadores de fármacos e em plataformas vacinais, é crucial avaliar a biocompatibilidade da GNP para garantir a liberação segura do fármaco e minimizar a toxicidade (Bhaskar & Lim, 2017, Ellis et al., 2017). Um alto grau de biocompatibilidade é alcançado quando o nanomaterial interage com o organismo sem induzir respostas tóxicas, imunogênicas, trombogênicas e carcinogênicas (Naahidi et al., 2013).

O ouro metálico em escala visível é considerado inerte e compatível quando inserido em sistemas biológicos. O ouro coloidal encontrou uso precoce no tratamento da tuberculose na década de 1920 e, atualmente, é aprovado para aplicações clínicas no tratamento de doenças reumáticas, onde os sais de ouro são considerados importantes como agentes antirreumáticos (Fadeel & Garcia-Bennett, 2010). Entretanto, na escala nanométrica, as soluções possuem em sua composição sais, estabilizantes de superfície e produtos químicos resultantes do processo de síntese, os quais devem ser avaliados de forma criteriosa (Alkilany & Murphy, 2010, Ellis et al., 2017).

Alkilany & Murphy (2009) demonstraram em seu estudo um efeito tóxico no sobrenadante da solução de CTAB utilizada na síntese de GNR pelo método clássico mediado por semente, confirmando que a toxicidade aparente dos GNR seria proveniente do agente

surfactante. Também foi possível observar que, após realizada a purificação máxima da solução, o sobrenadante não continha GNR. Dessa forma, o conhecimento da origem da toxicidade permite a projeção de soluções para mitigar tal toxicidade. Assim, no caso das GNP cobertas com CTAB, várias abordagens têm sido empregadas visando eliminar as moléculas de CTAB livres em soluções de GNP (Versiani et al., 2016).

No que diz respeito à biocompatibilidade, diversas células do organismo mostraram-se capazes de internalizar as GNP sem apresentar efeitos citotóxicos, sendo relatado que, a mudança fundamental na resposta celular às partículas de ouro está relacionada principalmente ao tamanho das moléculas individuais (ou complexo molecular) e a faixa coloidal (Fadeel & Garcia-Bennet, 2010, Versiani et al., 2016).

Ainda, se tratando da internalização das GNPs, a eficiência da absorção celular foi encontrada por Xie e colaboradores (2017) na seguinte ordem do mais baixo ao mais alto: nanoestrelas, nanobastões e nanotriângulos de Ouro. Os possíveis mecanismos de absorção celular para os três tipos de nanopartículas de ouro também foram examinados nesse trabalho, e verificou-se que as diferentes formas de GNPs tendiam a usar as vias de endocitose em diferentes proporções, dentre elas: endocitose mediada por clatrina e caveolina.

1.3.5 Utilização de GNP na Medicina

As GNP são úteis para aplicações biomédicas principalmente devido à sua facilidade na preparação e conjugação, biocompatibilidade e propriedades ópticas dependentes de tamanho (Li et al, 2016). No entanto, as GNP nus não possuem especificidade para alvos. E para que as GNP estejam funcionalmente ativas é realizada a troca efetiva do agente de revestimento por uma nova molécula, cuja ligação tende a ser mais forte, para isso pode recorrer-se a diversos tipos de moléculas, vários autores propuseram a interação entre GNP e ligantes específicos (Tallury et al., 2010). Atualmente, nanomateriais têm sido alvo de estudos em todo o mundo de diferentes maneiras para melhorar os métodos diagnósticos existentes (McCarthy et al., 2021, Medhi et al., 2020), no desenvolvimento de vacinas (Elia et al., 2021), métodos terapêuticos (Raha et al., 2021), desinfetantes (Bakkar et al., 2021), entrega de fármacos (Akbari et al., 2020) e nanosensores de diagnóstico (Pinals et al., 2021).

As GNPs têm inúmeras vantagens para aplicações biomédicas, incluindo a facilidade de adicionar biomoléculas funcionais e sua eficiência em penetrar células (Xie et al., 2017). Assim, as GNP vem sendo utilizadas como portadores de moléculas multifuncionais, atuando

na entrega de fármacos, aminoácidos e peptídeos carregados. Outros métodos incluem a exploração da química ouro-tiol para conjugar materiais genéticos diretamente em GNP, bem como na montagem para formar os nanocarreadores de genes (Loh et al., 2016).

Ainda, se tratando da capacidade fototérmica presente nas GNP, plataformas baseadas em GNP têm facilitado avanços em relação a tratamentos não invasivos na medicina, através da terapia-alvo. Assim, as GNP podem ser usadas para terapia térmica extremamente localizada, no qual a absorção de luz é convertida em calor através de um processo conhecido como aquecimento plasmônico (Jeong et al., 2019). Uma vez que elas são aptas de aquecer uma área mil vezes superior ao seu tamanho, elas se tornam capazes da destruição de vírus e bactérias, da desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos, e até mesmo eliminação de células cancerígenas (figura 12) (Zharov et al., 2006).

Atualmente, uma das conjugações que apresenta numerosas aplicações é a de GNP e proteínas, uma vez que estas são capazes de reações precisas e devido à sua especificidade funcional e capacidade de catalisar um vasto número de reações, há muito interesse em aproveitar suas habilidades. Devido a essas características, acredita-se que nanoestruturas baseadas em proteínas podem ser a chave para o desenvolvimento de materiais funcionais com válida aplicação biotecnológica, apresentando numerosas possibilidades em detecção, imagem, distribuição de fármacos e antígenos, terapia e controle da estrutura e atividade da proteína (Versiani et al., 2016, Singh et al., 2017, Bostick et al., 2018).

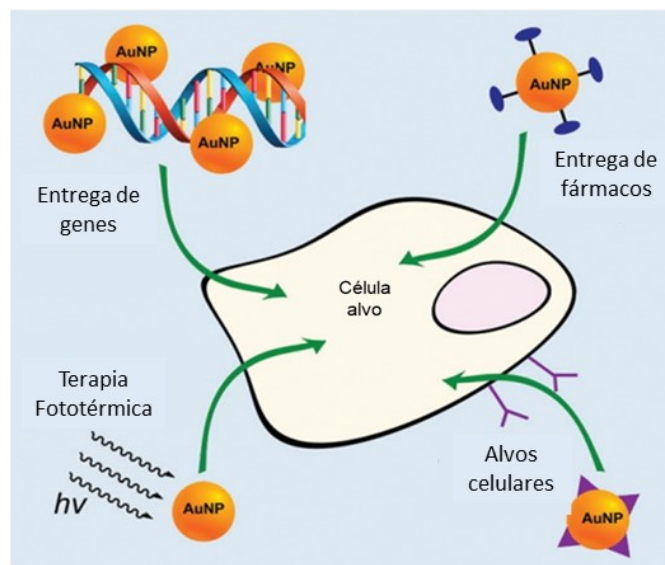


Figura 12. Nanopartículas de ouro como nanocarreadores multifuncionais com conjugação de fármacos ou ligantes de direcionamento. Onde esferas laranja= nanopartículas de ouro, fármacos= círculos azul escuro e ligantes de direcionamento= triângulo roxo (Adaptado de: Loh et al., 2016).

As estratégias envolvidas na ligação de proteínas às nanopartículas de ouro consistem em quatro abordagens principais: (a) Adsorção eletrostática da proteína, (b) Ligação covalente a um ligante presente na GNP, (c) Ligação a um cofator presente na GNP, e (d) ligação direta de um aminoácido contendo grupamento tiol à GNP (figura 13) (Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008).

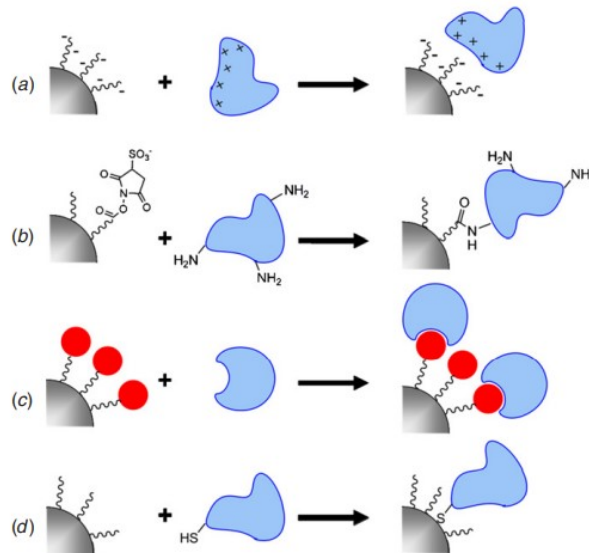


Figura 13. Estratégias de Funcionalização GNP-Proteína (a) adsorção eletrostática da proteína (b) Ligação covalente a um ligante presente na GNP (c) Ligação a um cofator presente na GNP (d) ligação direta de um aminoácido contendo grupamento tiol à GNP (Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008).

Adsorção eletrostática: É a abordagem de ligação mais amplamente utilizada devido a sua simplicidade e inespecificidade, uma vez que não requer reação química. É rotineiramente utilizada como marcador elétron denso em preparações histológicas. As proteínas são imobilizadas por adsorção passiva na superfície da GNP, o que acontece quando o pH do meio está próximo do ponto isoelétrico (pI) do peptídeo (figura 13a). A interação pode ser modulada pela alteração de pH ou força iônica do meio, na tentativa de direcionar uma face específica da proteína para adsorção na superfície da GNP (Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008).

Ligação covalente: Envolve a ligação covalente de uma proteína ao ligante GNP (figura 13b). Se a nanopartícula tiver múltiplos ligantes que podem reagir com a proteína, isso pode resultar em uma distribuição no número de proteínas na GNP, tornando a estequiometria da ligação controlável e a proporção de GNP-Proteína conjugada conhecida. Envolve intermediários químicos com a finalidade de favorecer a interação covalente requerida. Entre os quais estão compostos contendo grupamentos tiol (ácido lipoico), sulfo-N-

hidroxissuccinimida (sulfo-NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), que interagem entre si e favorecem a interação covalente requerida (Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008). Compostos contendo grupos tiol podem melhorar eficientemente a estabilidade e a dispersão de GNP em solução aquosa, uma vez que esses compostos podem se ligar covalentemente à superfície das GNP através de uma ligação ouro-tiol (Gao et al., 2012, Conde et al., 2014).

Ligação a um cofator: Estratégia onde um cofator específico é utilizado para revestir a GNP e assim garantir a especificidade da ligação (figura 13c). Um caminho atrativo para ligar uma GNP a uma proteína específica utiliza de anticorpos, pois estes podem se ligar especificamente a uma proteína alvo. Os conjugados GNP-anticorpo são úteis para visualizar a presença de proteínas e receptores específicos nas células. Assim, essa conjugação geralmente adota uma estratégia de marcação global, onde a GNP é primeiramente ligada ao anticorpo e o conjugado GNP-anticorpo pode então se ligar a uma proteína específica (Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008).

Ligação direta com átomos na superfície da GNP: A última das estratégias clássicas de conjugação envolve a interação direta de um aminoácido contendo grupamento tiol, que ocorre sem o uso de um ligante, isto pode ser conseguido pela química de ouro-thiol, onde uma proteína com uma cisteína se liga covalentemente a uma GNP (figura 13d). Este tipo de ligação é desejado se esta partícula for utilizada como biosensor, onde a transferência de elétrons é um processo essencial. Diante disso, como a proteína adsorvida está fortemente ligada, são necessárias concentrações de proteína muito menores, onde a proteína se liga reversivelmente à superfície (Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008).

Embora a conjugação de proteínas à superfície das GNP seja uma alternativa atraente, uma vez que estas são reconhecidas por serem altamente seletivas e eficazes, a ligação GNP-proteínas pode apresentar limitações na interação e estabilidade da ligação, que precisam ser resolvidos antes que todo o seu potencial seja alcançado. As preocupações envolvidas nessa interação incluem a dificuldade de o resíduo alvo atingir a superfície da GNP se o ligante da mesma estiver interagindo densamente na superfície ou por um longo período de tempo. Além disso, pode ser necessário um grande excesso de proteína na reação, principalmente se a força de interação do ligante com a superfície da GNP for semelhante ou maior do que a ligação de

proteínas à GNP, competindo com a proteína pela ligação (Aubin-Tam & Hamad-Schifferli, 2008, Conde et al., 2014).

De maneira especial, após a conjugação de partículas na superfície dos GNR é possível observar um deslocamento no espectro de absorção referente ao eixo longitudinal, que apresenta alta sensibilidade às mudanças da superfície dielétrica, tornando tais partículas responsivas às características dielétricas do ambiente circundante. Portanto, as modificações ao redor da nanopartícula, incluindo alterações em sua superfície, a agregação de solventes e partículas, determinarão mudanças nas propriedades eletrônicas da superfície da nanopartícula, resultando em alterações nos padrões do espectro de absorção (Versiani et al, 2020).

1.3.6 Potencial imunogênico das GNP

Desde as primeiras décadas do século XX, as propriedades imunológicas dos metais coloidais é interesse de pesquisadores. Esse interesse deve-se principalmente a teoria da imunidade físico-química (não específica) proposta pelo imunologista Jules Bordet, que postulou que a imunogenicidade, juntamente com a especificidade antigênica, depende predominantemente das propriedades físico-químicas dos antígenos. Além disso, foi demonstrado em estudos que a introdução de um antígeno, juntamente com os metais coloidais é capaz de estimular a produção de anticorpos (Dykman & Khlebtsov, 2017).

Em 1996, Demenev e colaboradores mostraram pela primeira vez a possibilidade de usar partículas de ouro coloidais como parte de uma vacina para o vírus da encefalite transmitida pelo carrapato. A vacina experimental oferecida apresentava propriedades protetoras mais elevadas do que seus análogos comerciais, mesmo sem adjuvantes. Atualmente, mais de 40 publicações demonstraram a aplicação bem-sucedida de GNP funcionalizadas para obter anticorpos contra diferentes antígenos (Dykman & Khlebtsov, 2017). De modo geral, GNP testadas como carreadores vacinais não apresentaram indução da formação de anticorpos anti-GNP, além de se mostraram capazes de modular a resposta imune, promover a penetração celular e direcionar a entrega de moléculas. Mais importante ainda, se mostraram inertes e não tóxicas, características estas essenciais para serem utilizadas como carreadores (Bhaskar & Lim, 2017).

Também vem sendo demonstrado que as GNP podem estimular e/ou suprimir as respostas imunes, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que várias células imunes, incluindo macrófagos, células dendríticas e linfócitos, são estimuladas por GNP que levam à

produção de citocinas pró-inflamatórias (ou seja, IL-1 β e TNF- α) e citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2) (Dykman & Khlebtsov, 2017).

Quando as nanopartículas adentram a corrente sanguínea, encontram um ambiente complexo de proteínas do plasma e células do sistema imune. A penetração das nanopartículas nestas células pode ocorrer tanto no fluxo sanguíneo, como por monócitos, plaquetas, leucócitos e células dendríticas, quanto nos tecidos, por meio dos fagócitos residentes. A interação de uma nanopartícula com proteínas plasmáticas (opsoninas) e componentes do sangue (via hemólise, trombogenicidade e ativação do complemento) pode influenciar a captação e assim afetar potencialmente a distribuição e fornecimento do nanomaterial para os locais-alvo pretendidos (Dobrovolskaia et al, 2008, Dykman & Khlebtsov, 2011).

Embora muitos esforços do uso de GNP nas ciências biomédicas tenham se concentrado no uso de GNP para fornecer drogas anticâncer, explorar o uso desse nanomaterial conjugado a proteínas virais para modular a resposta imune é uma área emergente de pesquisa e potencialmente atraente (Bhaskar & Lim, 2017). Além das variáveis citadas, o tamanho e a forma das nanopartículas são importantes variáveis a serem ajustadas, uma vez que estas características se mostraram receptivas para atender a funções específicas e influenciar o comportamento das partículas *in vivo* (Lobatto et al., 2011).

Devido às características controláveis de crescimento, propriedades ópticas únicas, possibilidade de funcionalização com biomoléculas, aliada a facilidade de identificação dessas modificações, os nanobastões foram selecionados como o material de interesse para utilização neste trabalho.

2. Justificativa

As vacinas previnem milhões de doenças e são responsáveis por salvar inúmeras vidas a cada ano, além de ter revolucionado a qualidade de vida das pessoas. Com o lançamento do Programa Expandido de Imunização da OMS em 1974 e da Aliança Global para Vacinação e Imunização em 2000, a varíola (causada pelo Orthopoxvirus variolae) foi completamente erradicada e a incidência de poliomielite, sarampo e outras doenças infantis foi drasticamente reduzida em todo o mundo. No Brasil, é inegável que a emergência e/ou re-emergência de diversas arboviroses representam grave problema de saúde pública. A febre causada pelo *Zika virus* (ZIKV) é um bom exemplo de uma arbovirose emergente em diversas partes do mundo, onde graves complicações como a síndrome de Guillain-Barré e a Síndrome congênita do Zika foram associadas a esta infecção.

Embora o ZIKV tenha sido associado no passado a surtos esporádicos na Ásia e na Oceania, em 2015 o ZIKV reemergiu e causou a maior epidemia já registrada para este vírus, com milhões de casos relatados, principalmente na África e Américas do Sul e Central. Além disso, estudos recentes de vigilância alertaram para a circulação de uma linhagem africana do vírus Zika em duas regiões brasileiras em 2019, alertando sobre um possível novo surto epidêmico no Brasil.

Abordagens vacinais convencionais, como vírus vivos atenuados e inativados, vacinas de DNA e mRNA, e vacinas de subunidades tem se mostrados capazes de fornecer proteção durável contra uma variedade de patógenos. Plataformas vacinais foram desenvolvidas para outros flavivírus, incluindo o vírus da febre amarela, o vírus da encefalite japonesa, o vírus da encefalite transmitida pelo carrapato e o vírus da dengue, mas atualmente, não há uma vacina clinicamente aprovada e licenciada para o ZIKV.

Apesar do longo histórico e sucesso das campanhas de vacinação, o desenvolvimento de vacinas eficazes e seguras é semiempírico, e permanecem grandes obstáculos ao desenvolvimento de vacinas contra uma variedade de patógenos infecciosos. Além disso, para a maioria das vacinas contra vírus emergentes, o principal obstáculo não é a eficácia das abordagens convencionais, mas a necessidade de desenvolvimento rápido e implantação em larga escala afim de pausar o avanço do agente viral.

Dentre as áreas que surgem de forma atrativa e com grande potencial de utilização no desenvolvimento de plataformas vacinais eficientes, a nanotecnologia tem ganhado destaque, em especial as nanopartículas de ouro, devido a suas propriedades ópticas e químicas únicas que permite sua ligação a moléculas orgânicas como proteínas, incluindo sua utilização como

carreadores vacinais. Adicionalmente, as nanopartículas de ouro são inertes e atóxicas em sistemas biológicos, o que as torna carreadoras ideais de antígenos e fármacos.

Nosso grupo de pesquisa tem utilizado o potencial de aplicação das nanopartículas nas ciências biomédicas com resultados surpreendentemente positivos. No trabalho conduzido por Alice Versiani (2020), foi desenvolvido um teste diagnóstico sensível e específico baseado em nanobastões de ouro funcionalizados com proteínas de DENV. Os sensores foram capazes de detectar apenas um picograma de anticorpos monoclonais anti-DENV e soros humanos altamente diluídos positivos para DENV, além disso, os sensores foram capazes de distinguir os pacientes positivos para DENV de outros pacientes infectados pelo flavivírus, incluindo o ZIKV, e até mesmo de distinguir o sorotipo de DENV.

Recentemente, também desenvolvemos um sensor diagnóstico para SARS-CoV-2, utilizando GNR funcionalizados com a proteína do N (nucleocapsídeo) recombinante do agente causador da Covid-19. O sensor se mostrou capaz de identificar anticorpos anti-SARS-CoV-2 em soros de pacientes positivos de forma eficiente e sensível. Mostrando a excelência e expertise da técnica estabelecida por nosso grupo.

Em se tratando do potencial de carregamento antigênico das nanopartículas. Os GNR, se mostraram capazes de carrear eficientemente proteínas do DENV-3 gerando respostas imunológicas intensas e protetoras em modelos de infecção murino (Versiani, 2014). Utilizando-se da experiência de excelente performance alcançada com os dados para o DENV, o presente trabalho propõe a utilização de Nanobastões de Ouro, um promissor nanomaterial com potencial de utilização biológica, no desenvolvimento de um protótipo vacinal contra o ZIKV utilizando a proteína do envelope recombinante funcionalizada à superfície dos nanobastões de ouro.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

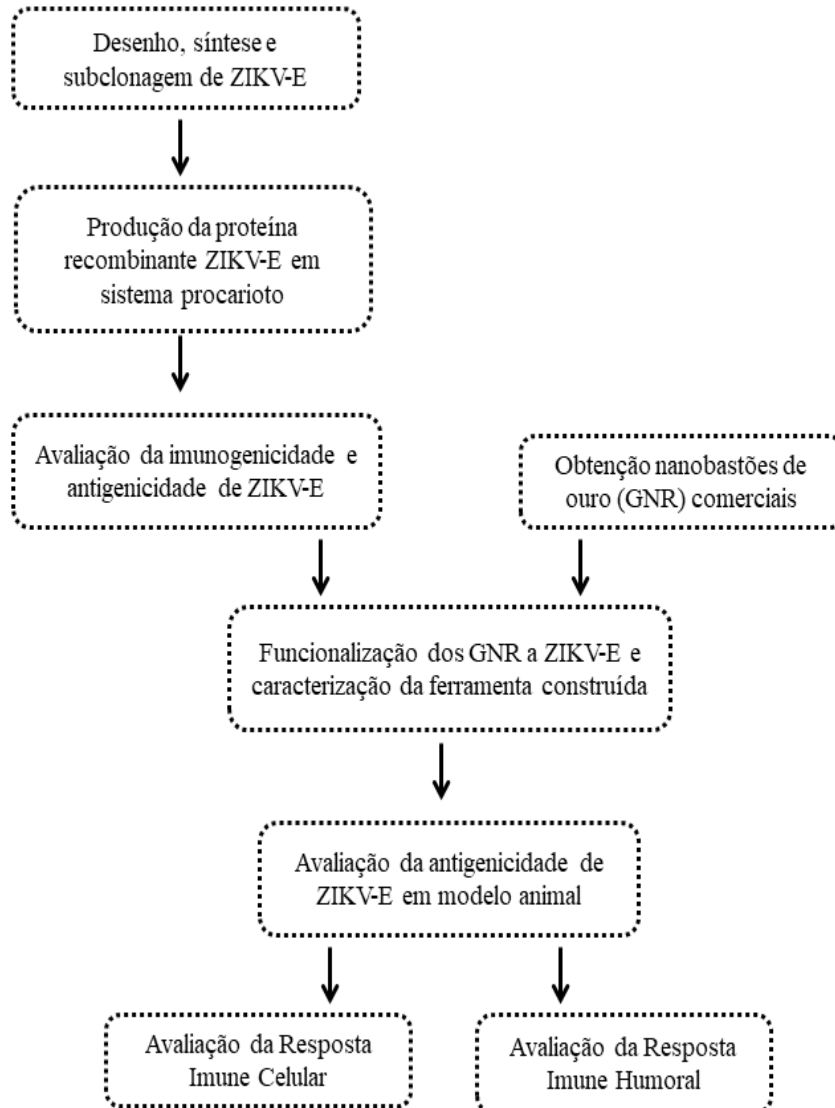
Desenvolver uma vacina de subunidade recombinante contra o Zika virus, utilizando a proteína E recombinante funcionalizada a Nanobastões de Ouro.

3.2 Objetivos específicos

- Obter sequências nucleotídicas do gene codificador da proteína E de Zika virus e modelar a proteína utilizando ferramentas de bioinformática,
- Expressar e purificar a sequência de ácido nucleico codificadora da proteína E de Zika virus, utilizando sistema de Expressão em bactérias (*Escherichia coli*),
- Funcionalizar Nanobastões de Ouro comercialmente obtidos através da sua ligação as proteínas E produzidas,
- Avaliar a antigenicidade e imunogenicidade da vacina experimental produzida (Nanobastão de ouro ligado à proteína E) utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

4. Material e métodos

4.1 Fluxograma de trabalho



4.2 Análises de Bioinformática e Construção da sequência sintética de ZIKV-E

As análises de Bioinformática envolvidas na construção de ZIKV-E apresentadas nesse tópico foram realizadas por Flávia Fonseca Bagno pertencente ao nosso grupo de pesquisa, e estão descritas detalhadamente em Bagno, 2018. A metodologia descrita é apresentada aqui, embora de forma sucinta, uma vez que a construção e análise da sequência sintética de ZIKV-E é de fundamental importância para realização e compreensão do trabalho.

4.2.1 Desenho, síntese e subclonagem do gene de interesse

Para o desenho do gene da proteína do envelope de ZIKV, genomas virais depositados no banco de dados *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) até novembro de 2016 foram alinhados no software MEGA7. Os critérios de seleção das sequências foram: anotação completa do gene e ausência de nucleotídeos indefinidos na sequência. Foram selecionadas sequências de vírus Zika isoladas mundialmente, num total de 148. A sequência utilizada como referência foi a de número de acesso KU940228, isolada da Bahia, sendo que, após o alinhamento múltiplo e delimitação da porção codificadora da proteína E, uma sequência consenso foi gerada a partir do software *cons* (EMBOSS - <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons>).

Após determinação do genoma modelo, a sequência final codificadora de ZIKV-E foi códon-otimizada para a expressão em *E. coli* pelos softwares *Atgme* (<http://atgme.org/>) e OptimumGene™ - *Codon Optimization* (Genescript). Após a tradução da sequência pelo *Translate Tool* (<https://web.expasy.org/translate/>) a sequência foi analisada pelo algoritmo Blast-P (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) para verificar a similaridade da sequência construída com sequências de proteínas já depositadas.

Em seguida, foi realizada análises de porção transmembrana e hidrofobicidade pelos softwares *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e *ProtScale -Expasy* (<http://web.expasy.org/ProtScale/>, opções *Transmembrane tendency* e *Hphob. -Kyte & Doolittle*). A partir dessas predições, a sequência foi truncada para remoção das porções transmembranas, de forma a diminuir sua hidrofobicidade e facilitar o processo de purificação. A proteína E truncada em 20%, com a eliminação de sua porção transmembrana, é considerada como sendo mais imunogênica do que a proteína total íntegra, sendo, portanto, mantida nesta forma no presente trabalho, a fim de ter sua imunogenicidade aumentada. Adicionalmente, a

remoção da porção transmembrana aumenta o potencial de expressão da proteína em vetor procarioto, aumentando sua hidrofobicidade (Men, 1991, Huabin, 2018).

Por fim, a sequência construída foi sintetizada comercialmente pela empresa Fastbio (Ribeirão Preto, SP), novamente otimizada e subclonadas em vetor de expressão pET-21a (+) entre os sítios de *NdeI* e *XhoI*, adicionando uma metionina inicial e uma cauda de histidina. As sequências antes e após a otimização e corte da porção transmembrana foram alinhadas pela ferramenta online *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4.2.2 Análises *in silico* de ZIKV-E

Após as modificações para inserção do gene da proteína de interesse no plasmídeo de expressão, sua estrutura foi estudada *in silico*. Em primeiro momento, para avaliar as propriedades físico-químicas utilizou-se a ferramenta ProtParam (Gasteiger, 2005) e a estrutura secundária foi analisada pelo BepiPred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>).

O software I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement* - <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER>) foi usado para a previsão da estrutura terciária proteica da sequência de aminoácidos. O *I-Tasser* é uma plataforma que gera modelos de estruturas tridimensionais de proteínas por meio de uma abordagem denominada *threading*. *Threading* refere-se a um procedimento de bioinformática para identificar proteínas a partir de modelos de bancos de dados de estrutura já resolvidos que tenham uma estrutura semelhante ou motivo estrutural similar à da sequência consultada. A função da proteína é então inferida pela correspondência estrutural dos modelos 3D com outras proteínas conhecidas (Roy *et al.*, 2010). Após as predições pelo *I-Tasser* foi selecionado o melhor modelo baseando-se no valor obtido de *C-score* indicado pelo programa.

A qualidade do modelo tridimensional gerado foi validada através das plataformas *ProSA-web* e *RAMPAGE*. O *ProSA-web* é uma ferramenta utilizada para verificar possíveis erros em modelos 3D de estruturas de proteínas. Seu índice de qualidade (*Z-score*) é fornecido a partir de um gráfico que mostra pontuações de todas as cadeias de proteínas determinadas experimentalmente (por raio-X ou RMN), disponíveis no PDB (*Protein data bank*), relacionando-as com a pontuação do modelo proposto (Wiederstein & Sippl, 2007).

O *RAMPAGE* é uma ferramenta para gerar gráficos de Ramachandran, uma forma de visualizar a distribuição da torção dos ângulos em uma proteína. Para isso, ele descreve as rotações da cadeia principal em torno das ligações entre N-C α (chamada Phi, ϕ) e C α -C (chamada Psi, ψ). Com ele, é possível ter uma visão geral dos ângulos das regiões permitidas e

não permitidas, sendo importante na validação da qualidade de estruturas tridimensionais (Lovell et al., 2002).

4.3 Produção da proteína Recombinante ZIKV-E

4.3.2 Preparo de células competentes

Células competentes de *E. coli* das linhagens XL10 e BL21(DE3) foram obtidas segundo procedimento de quimiocompetência, para serem utilizadas nos ensaios de transformação para clonagem e expressão do plasmídeo sintético. Para tal, células sementes foram descongeladas no gelo e transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL com 5 mL de meio LB líquido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, pH 7,0) acrescido de MgSO₄ 10mM e Glicose 0,2%, e crescidas durante 18 horas a 37 °C em agitador orbital a 200 rpm (Thermo Scientific, EUA). Após período de incubação, as culturas foram inoculadas em *erlenmeyers* de 1 L contendo 200 mL de meio LB suplementado e incubadas a 37 °C em agitador orbital a 200 rpm sob agitação, até atingir a DO₆₀₀ desejada (0,6). Posteriormente, as culturas foram transferidas para tubos, incubadas no gelo por 20 min e centrifugadas (Jouan, 2700 g, 4 °C, 15 min). O precipitado formado foi ressuspensão em meio LB para congelamento (Glicerol 36 %, MgSO₄ 10 mM, PEG 7500). As células competentes foram aliqüotadas em aliqüotas de 100 µL e estas foram estocadas a -80 °C. Após a preparação das células, a competência foi avaliada por transformação com pUC18 (controle positivo), por choque térmico, assim como descrito acima.

4.3.3 Clonagem em bactérias *Escherichia coli* XL-10 quimiocompetentes

O plasmídeo contendo o gene sintetizado comercialmente (pET21-ZIKV-E) foi ressuspensionado em água livre de nucleases, em uma concentração final de 100 ng/µL, de acordo com as recomendações do fabricante. Células competentes de *E. coli* da linhagem XL10 foram utilizadas para produção do estoque do plasmídeo.

Para realizar o processo de clonagem, 100 µL de bactérias *E. coli* linhagem XL-10 foram transformadas com 1 µL de plasmídeo através de incubação em gelo por 30 min, sendo realizado em seguida o choque térmico em banho-seco a 42 °C por 40 seg e incubado novamente no gelo por mais 2 min. Adicionou-se 900 µL de meio LB líquido no tubo de trabalho, sendo o volume total transferido para um tubo de 50 mL e incubados por 90 min a

37°C a 200 rpm em agitador orbital (Thermo Scientific, EUA). Paralelamente, foi realizado um controle celular, no qual seguiu-se os mesmos passos, em exceção à adição do plasmídeo. Por fim, as células transformadas foram plaqueadas (30 µL e 100 µL) em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37°C em estufa (Thermo Scientific, EUA).

4.3.4 Extração de DNA plasmidial (Mini prep)

Para confirmar a transformação realizada e o tamanho do inserto foi realizada uma extração por “miniprep” seguida por uma reação de restrição. Assim, bactérias transformadas contendo o plasmídeo pET21-ZIKV-E, foram crescidas em meio LB semi-sólido seletivo (100 µg/mL ampicilina), coletadas e ressuspensas em 5 mL de meio LB líquido seletivo (100 µg/mL ampicilina) em tubos de 50 mL e submetidos a incubação *overnight* em agitador orbital (37 °C, 200 rpm). Após incubação, as células foram recolhidas por centrifugação (1000 g, 10 min a 25 °C) e ressuspensas em 200 µL de solução GET (Glicose, EDTA, Tris-HCl, pH 8,0) e 400 µL de solução de lise (SDS 20%, NaOH 10 N, pH 8,0), com homogeneização suave por 3 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionada uma solução de neutralização (Acetato de Potássio em pH 4,8) e homogeneizou-se por inversão e incubada em gelo por 30 minutos, para precipitação de proteínas, RNAs de alto peso molecular e DNA cromossomal. Após período de incubação, a mistura foi centrifugada (10.000 g, 4 °C, 15 min) e o sobrenadante transferido para tubos contendo isopropanol gelado, com posterior homogeneização por inversão. O tubo foi novamente centrifugado (10.000 g, 4 °C, 15 min), sendo o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 500 µL de etanol 70%. Após uma nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e após secagem, o precipitado foi ressuspensionado em 20 µL de água *nuclease-free* e quantificado em espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE Healthcare Life Sciences), utilizando os comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm (UV).

4.3.5 Digestão do DNA plasmidial

O DNA plasmidial extraído foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI* afim de verificar se a síntese comercial do gene gerou inserto do tamanho esperado. O procedimento foi realizado com enzimas *XbaI* e *XhoI* e tampão da empresa Promega (EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação foram adicionados 2 µL do tampão D (10x), 0,2

μL de albumina sérica bovina acetilada (BSA, 10 mg/mL), 0,5 μL de *XbaI* e 0,5 μL de *XhoI* (ambas a 10 U/ μL), ddH₂O 15,8 μL e 1 μL de DNA, sendo o volume total da reação de 20 μL . A mistura foi incubada por 3 horas, em banho-maria a 37 °C. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose 1% com brometo de etídeo (0.5 $\mu\text{g/mL}$) e comparado aos padrões *Quick-Load 100 bp DNA Ladder* (New England Biolabs) e *EZ Load 1 kb Molecular Ruler* (Bio-rad).

4.3.6 Transformação de bactérias *Escherichia coli* BL-21 quimiocompetentes

Para expressão da proteína recombinante, foram utilizadas células competentes de *E. coli* da linhagem BL21(DE3). O protocolo de transformação seguiu os mesmos passos descritos em 4.3.2.

4.3.7 Padronização das condições ideais de produção de ZIKV-E

Após as células bacterianas estarem transformadas contendo o plasmídeo de interesse. A primeira etapa envolvida na produção de proteínas é a indução, que consiste na adição de um substrato específico no meio para que a transcrição de genes estruturais de um *operon* aumente. Isso se deve ao fato de a síntese proteica requerer grandes quantidades de energia e recursos, tornando inviável para a célula a expressão de todos os genes presentes em seu DNA. Inicialmente, o procedimento de indução da expressão foi realizado em pequena escala, com a finalidade da padronização das condições ideais de produção.

Na primeira etapa de padronização, a indução da proteína de ZIKV-E foi iniciada com o crescimento de quatro clones de *E. coli* linhagem BL21(DE3) em 5 mL de meio LB (Luria Bertani) rico pH 7,5, o qual é composto por 25 mg/mL de triptona, 15 mg/mL extrato de levedura, 5 mg/mL NaCl e suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) sob agitação a 200 rpm, a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, 0,5mL de cada pré-inoculo foi adicionado em 5mL de meio LB suplementado com ampicilina e mantido sob agitação a 200 rpm, 37°C até atingir a DO₆₀₀ = 0,6. Posteriormente, foi adicionado o indutor isopropil-b-D-galactosídeo (IPTG, 1 mM) e a cultura foi levada à incubação por 3 horas à 37 °C no agitador. Após 3 horas, as amostras foram centrifugadas em centrífuga Multifuge X3R (Thermo Scientific) a 13000 rpm, 20 °C por 1 min. O sedimento celular e o sobrenadante resultante da centrifugação foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % para avaliar a indução da proteína de interesse.

A próxima etapa de padronização consistiu na avaliação do melhor tempo de indução (3 horas ou *overnight*). Assim, o clone com a indução mais significativa da proteína de interesse foi selecionado e utilizado para o preparo de pré-inóculos, que após crescimento *overnight* a 37°C, foi adicionado a dois erlenmeyers contendo em cada um 250 mL de meio LB suplementado, após atingir a DO₆₀₀ desejada (0,6) o meio contendo o inóculo foi induzido com o IPTG (1mM). Após 3 horas de indução, o primeiro inóculo induzido foi centrifugado a 8000 rpm, 20°C por 10 min. O pellet resultante foi armazenado a -20 °C. O segundo inóculo induzido foi mantido em agitação a 200 rpm a 20 °C *overnight*, quando posteriormente foi centrifugado a 8000 rpm 20 °C por 10 min. Os sedimentos celulares resultantes foram ressuspensos em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM Benzamidina) e lisados em homogeneizador de alta pressão Emulsiflex C3 (Avestin, Canadá) de 15.000 a 20.000 psi repetindo o processo por três vezes. Em seguida, os extratos celulares resultantes da lise no homogeneizador foram novamente centrifugados (40000g, 4°C por 30min) e os pellets ressuspensos em 25mL de H₂O milli-Q. As frações solúveis e insolúveis resultantes da Lise foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % para determinação do melhor tempo e temperatura de indução.

Após avaliação dos géis, determinação do melhor tempo de indução e observação da presença da proteína de interesse na fração insolúvel da amostra, a próxima etapa da padronização consistiu em determinar qual molaridade de Ureia seria necessária para solubilização da proteína. Para esse teste, foram utilizadas as frações insolúveis lisadas no homogeneizador estocadas a -20 °C. Assim, quatro amostras de 100 µL de cada uma das frações insolúveis foram centrifugadas (15.000 rpm, 4 °C por 5 min) e os sobrenadantes foram descartados. Os pellets foram ressuspensos em tampão de purificação (30 mM de NaH₂PO₄, 500 mM de NaCl e 30 mM de Imidazol), em cada tampão foi adicionada diferentes quantidades de Ureia sejam elas 2M, 4M, 6M e 8M. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições, e as frações solúveis e insolúveis resultantes foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %.

Conhecidas as condições ideais de produção, o procedimento de indução foi realizado em volumes maiores para obter as proteínas recombinantes em grandes quantidades.

4.3.8 Produção e Purificação da proteína ZIKV-E recombinante

O clone anteriormente selecionado foi utilizado para o preparo do pré-inoculo, que após crescimento a 200 rpm *overnight* a 37 °C, foram adicionados a 2 L de meio LB suplementado com ampicilina. Após atingir a DO₆₀₀ desejada (0,6) foi realizada a indução pela adição de 1mM de IPTG seguido da incubação por 3 horas à 37 °C no agitador 200 rpm. Após o período de indução da expressão da proteína recombinante, a cultura foi centrifugada a 8.000 rpm a 4 °C por 10 min em centrífuga Multifuge X3R (Thermo Scientific), sendo o sobrenadante descartado e o extrato celular ressuspensionado em 200 mL de tampão de lise. A mistura contendo o extrato celular foi rompida no Homogeneizador Emulsiflex C3 de 15.000 a 20.000 psi repetindo o processo por três vezes, a amostra lisada foi centrifugada a 4000 rpm, 4 °C por 30 min e o pellet resultante ressuspensionado em 25 mL de tampão de lavagem dos corpúsculos de inclusão e armazenado em freezer a -20 °C.

A mistura (pellet em tampão de lavagem de corpúsculos de inclusão) foi submetida a 3 ciclos de lavagem e centrifugação a 4.000 g a 4 °C por 30 min. Ao final do processo de lavagem, o pellet resultante foi ressuspensionado em tampão de purificação (30 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 4 M Ureia) e deixado na geladeira *overnight* sob agitação. Posteriormente, o lisado foi clareado por centrifugação (40.000 g, 4 °C por 15 min) e o sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade.

A purificação foi realizada utilizando o sistema AKTA Prime Plus (GE Healthcare, EUA), com a coluna de afinidade HisTrap HP System (GE Healthcare Life Sciences), pelo comando “*Method Run*”, aba “*Template*” e opção “*Affinity step gradiente*”, seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, a coluna foi lavada com água Milli-Q por 5 vezes o volume da coluna. A etapa seguinte, consistiu na lavagem da coluna com tampão de ligação (30 mM de NaH₂PO₄, 500 mM de NaCl e 30 mM de Imidazol, 4 M de ureia) por 5 vezes o volume da coluna. Em seguida, houve a injeção da amostra no aparelho. Novamente, foi realizada mais uma lavagem da coluna com tampão de ligação. E a eluição da proteína purificada foi realizada com gradiente do tampão de eluição (30mM de NaH₂PO₄, 500mM de NaCl e 500 mM de Imidazol, 4 M de ureia) – de 0 a 100 % – sendo coletadas alíquotas de 1,0 mL e armazenadas a 4 °C. As amostras referentes ao pico de eluição foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %.

4.3.8.1 Verificação da eficiência da purificação

As amostras resultantes dos ensaios de expressão, avaliação da solubilidade e purificação da proteína recombinante ZIKV-E foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os géis de poliacrilamida de 1,5 mm de espessura corados por Comassie Blue® (BioRad, EUA) são compostos por dois polímeros diferentes, acrilamida e bisacrilamida em duas fases, superior e inferior que variam entre si na concentração dos reagentes utilizados. Os géis foram preparados a partir de uma solução estoque 40% acrilamida/bis, APS 10%, TEMED e tampão 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 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 a serem analisadas foram aquecidas a 95°C por 10 minutos e aplicadas no gel juntamente com o tampão de amostra (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 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 para o restante da eletroforese. Após a eletroforese, os géis foram transferidos para uma cuba contendo solução corante [1% de Azul de Coomassie (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.

4.3.9 Quantificação Proteica

A proteína purificada foi quantificada pelos métodos de Bradford e pelo Kit Randox. O método de Bradford, proposto em 1976 é considerado, um dos mais sensíveis e rápidos para a determinação de proteínas totais. Este método é baseado na interação entre as macromoléculas

de proteína e o corante BG-250 (*Coomassie brilliant blue*). No pH da reação, a interação entre a proteína de alta massa molar e o corante BG-250, provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que faz com que esse corante absorva fortemente luz no comprimento de onda de 595nm (Zaia et al., 1998). Neste método, a concentração da proteína da amostra desconhecida é calculada com base em uma curva padrão de uma proteína conhecida.

O procedimento foi realizado em microplacas de 96 poços, no qual em cada poço foram adicionados 148 µL de H₂Odd (água destilada e deionizada), 40 µL do Reagente de Bradford e 2 µL de amostra ou dos padrões. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-VIS Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, EUA) à 595 nm. A quantificação foi estabelecida em função do padrão da proteína BSA, de concentração conhecida (1mg/mL), considerando-se os resultados obtidos para cada amostra.

Em paralelo, as proteínas foram quantificadas pelo kit Randox Monza Up 1570 (Randox, RU). O procedimento foi realizado em microplacas de 96 poços de acordo com as recomendações do fabricante. A absorbância 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 para cada amostra. As proteínas foram quantificadas após os processos de purificação e diálise e sempre antes de qualquer experimento envolvendo quantidades exatas do produto, como Western Blot, Funcionalização dos Nanobastões, Imunização dos Camundongos e ELISA.

4.3.10 Diálise e Concentração das proteínas

Após o processo de purificação, a proteína estava dissolvida em um tampão contendo altas concentrações de sais como Ureia e Imidazol. Nesse 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 (Zuniga et al., 2003). Assim, em um tubo de centrifuga revestido por membrana de diálise, submerso em um béquer contendo tampão foi realizado um processo de troca subsequente de tampões, onde cada tampão permaneceu sob agitação constante a 4 °C por 3 h. Ao final do processo, a proteína se encontrava em tampão fosfato-salino (PBS 1x pH 7.4).

O próximo passo foi concentrar a proteína produzida. Para tal, foram utilizados tubos de policarbonato VivaSpin® (GE Healthcare, EUA), VivaSpin® com membrana

semipermeável de peso molecular 10kDa. As amostras foram adicionadas ao tubo e submetidas a centrifugação (1000 rpm a 4 °C) para que os componentes indesejados passem pela membrana e sejam descartados. No final dos processos de dialise a proteína foi novamente quantificada e sua integridade avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.3.11 Western blot

O *Western Blot* é uma técnica simples e eficiente, introduzida por Burnette (1981) que emprega a eletroforese em gel para separar proteínas nativas pela sua estrutura tridimensional ou proteínas desnaturizadas pelo comprimento da sua cadeia polipeptídica através da ligação de anticorpos específicos. Assim, após o processo de purificação uma amostra de ZIKV-E foi submetida a um ensaio de *Western Blot*, de forma a confirmar a imunogenicidade da proteína recombinante produzida. Para tal, foi utilizado um anticorpo específico para o *Zika virus*, e um anticorpo específico para a região c-terminal da proteína ZIKV-E que possui uma cadeia de histidina, de forma a confirmar a expressão da proteína recombinante.

Para a realização do *Western Blot* uma amostra da proteína purificada foi primeiramente desnaturada por aquecimento a 95 °C por 5 min e, juntamente com um marcador de massa molecular (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* - Thermo Scientific) foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) submetidos a um potencial elétrico. Após o fracionamento eletroforético, as amostras foram transferidas para membranas de PVDF (*Polyvinylidene difluoride* - GE Healthcare, Hybond™-P) por 75 min à 0,35 A, no aparelho Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Após o período de transferência, as membranas foram submetidas à solução bloqueadora [2,5 % (p/v) de leite desnatado em pó em PBS-T (PBS 1X + 0,1 % de Tween 20)] *overnight* a 4 °C, a fim de impedir as interações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo. Após esse período as membranas foram lavadas com tampão de lavagem PBS-T por três vezes, sendo trocado a cada 5 min. A reação foi feita com anticorpo comercial anti-histidina (*anti-his* 1:1.000, Sigma Aldrich) e anticorpo antinflavivirus (4 G2, 1:2.500, gentilmente cedido pela Profa. Dra Vivian Vasconcelos Costa, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG, MG, Brasil), os quais foram colocados em contato com as membranas durante 1 h, à temperatura ambiente. Então, as membranas foram novamente lavadas com tampão de lavagem para remover os anticorpos não ligados. Após a lavagem, as membranas foram expostas ao anticorpo secundário (*anti-mouse* 1:6.000, Sigma Aldrich) responsável por se ligar nos anticorpos primários e emitir um sinal revelador, essa reação também ocorreu durante 1 h à temperatura

ambiente, seguida de um novo processo de lavagem. Após essa última lavagem, as membranas foram reveladas com a adição de 1 mL do reagente *Luminata Classico Western HRP substrate* (Millipore) sobre a membrana.

4.4 Nanobastões de Ouro (“*GoldNanorods*”)

Nanobastões de ouro (GNR) certificados e purificados foram obtidos comercialmente da empresa Nanopartz™, US/Canada. Os GNR adquiridos comercialmente possuem alto grau de pureza e homogeneidade, além de ser um material homogêneo, garantindo a reprodutibilidade do trabalho. Como pode ser observado na tabela de especificações dos Nanobastões de ouro, as partículas apresentam pico plasmônico de 780 nm e tamanho de 38 nm de comprimento x 10 nm de diâmetro. Além disso, os GNR são caracterizados por espectroscopia de UV-visível e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (tabela 2, figura 14).

Tabela 2. Especificações dos Nanobastões de Ouro comerciais (Nanopartz™)

Característica	Valor	Técnica de avaliação
Diâmetro	10 nm	MET
Comprimento	38 nm	MET
pH	7	Mensurado
Concentração (nps/mL)	7.3E+11	Calculada
Concentração (mg/mL)	0,039	Calculada
Pico transversal – SPR (nm)	511	UV/Vis
Pico longitudinal - LSPR (nm)	785	UV/Vis
Razão de espectro	3,8	Calculada
CTAB (mM)	5	Mensurado

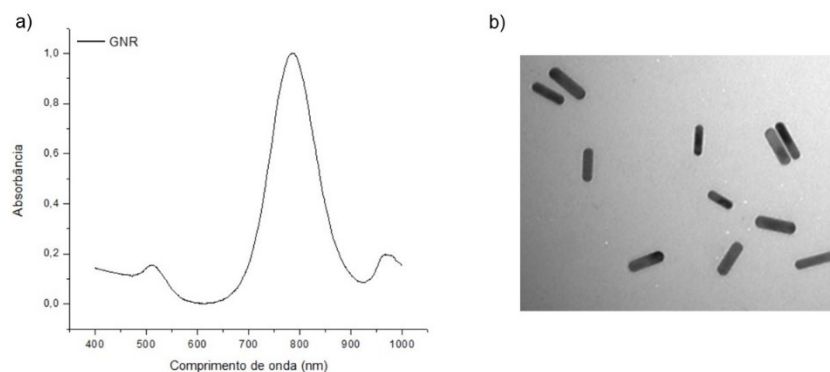


Figura 14. Caracterização dos GNR comerciais (Nanopartz) a) Espectroscopia de UV-VIS-NIR b) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos GNR.

4.4.2 Funcionalização dos Nanobastões de Ouro (GNR)

4.4.2.1 Metodologia

Antes dos nanobastões serem adicionados à solução contendo as proteínas ZIKV-E, eles devem ser previamente preparados para que esta ligação se dê de forma eficiente. Para tanto, as Nanopartículas foram tratadas em duas etapas.

Primeiramente, adicionou-se às Nanopartículas o ácido α -lipóico ($C_8H_{14}O_2S_2$, LA, Sigma-Aldrich, EUA) (figura 15), seguido do tratamento com os agentes acoplante cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDC, Thermo Fisher Scientific, EUA) e estabilizante N-hidroxisuccinimida (NHS, Thermo Fisher Scientific, EUA), para que finalmente a proteína fosse adicionada de forma eficaz.

O ácido α -lipóico ou ácido lipóico é um composto naturalmente sintetizado no fígado, que atua como um importante cofator para importantes enzimas do corpo. A ligação do ácido lipóico às nanopartículas de ouro permite a interação deste composto com as moléculas biológicas e sua utilização como carreador antigênico. O ácido lipóico foi utilizado, uma vez que possui uma extremidade livre com um grupamento carboxila e outra extremidade composta por dois grupos tiol (-SH). Assim, o grupo tiol de uma das extremidades do reagente se liga ao ouro, formando uma ligação forte. Já o grupo carboxila (-COOH) disponível é utilizado como alvo para o tratamento intermediário com EDC e NHS para a ligação covalente da proteína.

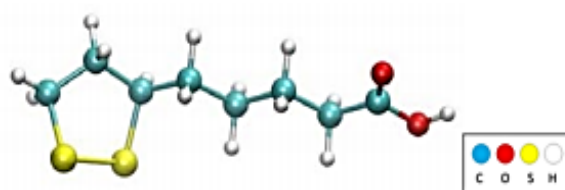


Figura 15. Estrutura química globular do ácido lipóico. Em azul estão representados os átomos de carbono, em vermelho de oxigênio, em amarelo de enxofre e por último, em branco, os átomos de hidrogênio (Adaptado de: Machado et al., 2014).

Para que ocorra a ligação entre o grupo carboxila presente na extremidade do ácido lipóico (já associado à superfície dos nanobastões) e os radicais amínicos das proteínas ZIKV-E, foram utilizados um agente acoplante cloridrato de *N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida* (EDC), e um agente estabilizante N-hidroxisuccinimida (NHS), este por sua vez evita a formação de possíveis ligações intermoleculares indesejadas entre as

proteínas, causadas pelo agente acoplante. Por fim, a solução contendo as proteínas ZIKV-E são adicionadas. A ligação de cada um dos reagentes à superfície do GNR faz com que ocorra um deslocamento no espectro UV/Vis, conforme mencionado anteriormente.

A metodologia aqui proposta foi realizada segundo Versiani et al, 2020 com algumas modificações. A figura 16 demonstra de forma esquemática a metodologia de funcionalização dos GNR.

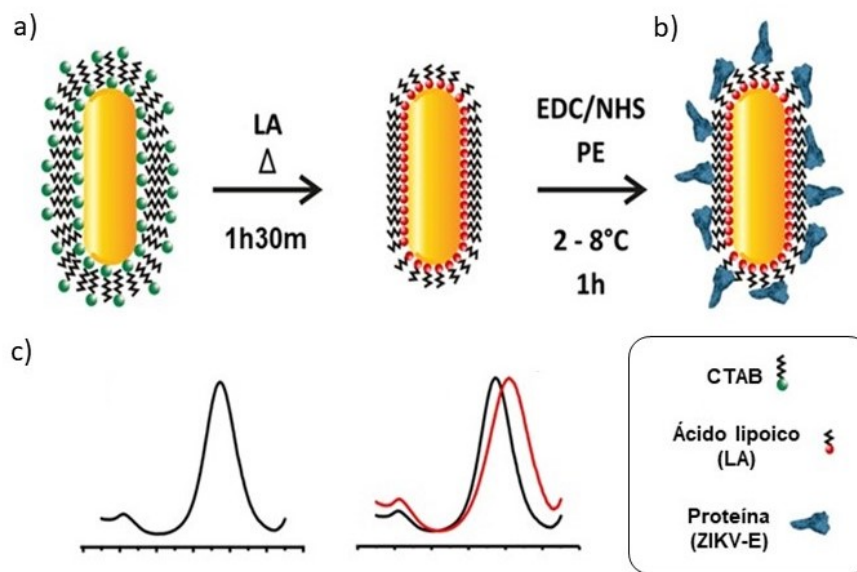


Figura 16. Esquema do processo de funcionalização das Nanopartículas de ouro com proteína ZIKV-E a) O Agente de crescimento presente na superfície dos nanobastões de ouro são substituídos pelo ácido lipóico b) Os reagentes acoplante (EDC) e estabilizante (NHS) foram inseridos para estabilizar a ligação do ácido lipóico, permitindo uma reação de substituição quando adicionada a proteína c) Alteração observada no espectro plasmônico quando os reagentes são ligados à superfície do Nanobastão, que é mensurado por seu deslocamento (espectro em vermelho). LA: Ácido Lipóico. EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. NHS: NHydroxysuccinimide (fonte: Versiani et al., 2020).

4.4.2.2 Padronização do processo de funcionalização dos GNR

Afim de verificar a quantidade ideal de ácido lipóico que deveria ser adicionada à solução de GNR, foi realizada uma curva com diferentes concentrações de ácido lipóico. Para cada solução contendo 250 μ L de GNR foi adicionado volume suficiente para uma concentração final na solução de 6 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM e 14 mM de ácido lipóico. Para tal, 250 μ L de GNR foram incubados com as diferentes concentrações de ácido lipóico por 30 min a 55 °C sob ultrasonicação, para desestabilização do CTAB presente na superfície das nanopartículas. Posteriormente, as nanopartículas foram transferidas para um banho térmico de

30 °C por 1 h sob ultrassonicação, para promover a ligação da funcionalidade desejada. As amostras foram armazenadas overnight a 4 °C para estabilização da reação.

Após período de incubação, os GNR funcionalizados com ácido lipóico foram submetidos à dois ciclos de centrifugação a 3.000 g por 10 min a 20 °C em centrífuga Micro CL17R (Thermo Electron Corporation), para que fossem retirados os agentes que não se ligaram às nanopartículas.

Após a centrifugação, os GNR foram redispersos no volume inicial de trabalho, à uma solução tampão fosfato (10 mM) contendo 0,4 M de EDC e 0,1 M de NHS, e deixados em incubação por 60 min, em banho de gelo, e sob ultrassonicação.

Por fim, após a ligação dos reagentes intermediários, a proteína de ZIKV-E foi colocada em contato com os GNR funcionalizados, em banho de gelo por 1 hora, e sob ultrassonicação. Novamente, foi realizado uma curva com diferentes quantidades da proteína ZIKV-E adicionada, para avaliar uma possível saturação do sistema. Assim, foi adicionada à solução de nanobátões, diferentes volumes contendo de 0,125 µg até 12 µg de ZIKV-E. Após período de incubação, os GNR funcionalizados com ZIKV-E foram submetidos à dois ciclos de centrifugação a 3.000 g por 10 min a 20 °C, para que fossem retirados os reagentes que não se ligaram às nanopartículas. Após centrifugação, a solução foi redispersa no volume inicial de trabalho e os espectros foram avaliados.

4.4.2.3 Verificação da eficiência da funcionalização

Para avaliar a eficiência da funcionalização realizada, foram realizadas medidas de espectroscopia UV-Vis antes e depois da adição de cada um dos reagentes, uma vez que, conforme relatado anteriormente neste trabalho, devido às propriedades ópticas das nanopartículas, a interação de moléculas em sua superfície leva a alterações específicas de ressonância plasmônica. Assim, espera-se observar um deslocamento (“*shift*”) da curva de ressonância após a ligação de cada reagente intermediário. Para as medidas, 100 µL de cada solução foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços com fundo chato de quartzo (Greiner), os espectros foram medidos em um espectrômetro de varredura UV-VIS multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, EUA) em comprimentos de onda de 400-1000nm. Os dados foram analisados pelo software SkanIt. As absorvâncias obtidas foram convertidas em gráficos e analisadas pelo programa Origin 8.1 (Origin Lab®, EUA).

4.4.3 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, afim de confirmar a ligação da Proteína na superfície do GNR. Sendo elas: Espectroscopia UV-VIS-NIR, Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS) e Ensaio de Fluorimetria.

4.4.3.1 Espectroscopia UV-Vis-NIR

Devido às propriedades óticas dos GNR, a principal forma de caracterização é por meio da avaliação do espectro de absorção de luz visível/UV. Conforme relatado anteriormente, este espectro é variável de acordo com tamanho, forma, solução dispersante e constante dielétrica do meio circundante. Dessa forma, os espectros foram medidos conforme item 4.2.2.3. Para calcular o deslocamento de plasmon correto, as curvas foram plotadas com o cálculo correspondente da interceptação do eixo X da derivada do pico gaussiano (Versiani et al., 2020).

4.4.3.2 Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS)

Para esta caracterização, 800 μ L de uma solução contendo GNR, GNR ligado ao ácido lipóico e da ferramenta completa GNR-ZIKV-E foram submetidos à análise de tamanho do raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta em solução, através da técnica de espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering - DLS) em um analisador de tamanho de partículas Litesizer 500 tipo BM10 (Anton Paar, EUA). As amostras foram testadas em pentaplicada. Os gráficos e dados estatísticos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 8.

4.4.3.3 Detecção da formação do complexo GNR-ZIKV-E por fluorimetria

Este método de caracterização foi realizado conforme descrito em Andrade et al., 2020 com algumas modificações. Para tal, 2 μ L de anticorpo antinflavivírus 4G2 (1:300) foram adicionados em 600 μ L de GNR-ZIKV-E. A solução foi incubada por 60 min em temperatura ambiente e em shaker orbital (Ionlab, BR). Para bloquear anticorpos primários não ligados, foram adicionados 10 μ L de BSA 1% na amostra. A solução foi submetida à agitação em shaker axial por 30 min. Em seguida a amostra foi centrifugada por 5 min a 5.000 rpm em centrífuga

centrifuga Micro CL17R (Thermo Electron Corporation, EUA). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 600 μ L de água Mili-Q. Para a marcação fluorescente foi adicionado 1 μ L de Fitc Anti-Mouse Clone (BD, EUA) em 300 μ L de amostra que foi deixada em incubação em shaker axial, ao abrigo da luz, por 30 min. Após a marcação fluorescente, as amostras foram colocadas em triplicata em placa ótica na seguinte disposição: 100 μ L de GNR-ZIKV-E marcado somente com o anticorpo primário por poço e 100 μ L de GNR-ZIKV-E marcado com os anticorpos primário e secundário por poço. As amostras foram lidas no equipamento Varioskan Flash spectral scanning multimode reader (Thermo Scientific, EUA) usando os comprimentos de onda de excitação de 491 nm e emissão de 516 nm.

4.5 Avaliação da imunogenicidade da vacina experimental GNR-ZIKV-E

4.5.2 Estratégia de imunização

O potencial imunogênico da vacina experimental produzida (GNR-ZIKV-E), foi avaliado através da resposta imune desenvolvida por camundongos BALB/c fêmeas. Nesse contexto, os animais experimentais de 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 (UFMG), devidamente manipulados e eutanaziados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA), sob protocolo aprovado 23/2022. A imunização seguiu um protocolo homólogo de 3 doses (dose-reforço-reforço) (figura 17), e os camundongos foram divididos em 7 grupos experimentais com 5 animais em cada (tabela 3).

Cada animal recebeu por via subcutânea 50 μ L do composto específico de cada grupo. O intervalo entre as doses foi de 14 dias. No 14º dia após a terceira imunização os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução quetamina/xilazina, o sangue foi coletado pelo plexo braquial e em seguida sofreram 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 recombinante ZIKV-E. A resposta imune humoral foi avaliada através da técnica de ELISA e PRNT.

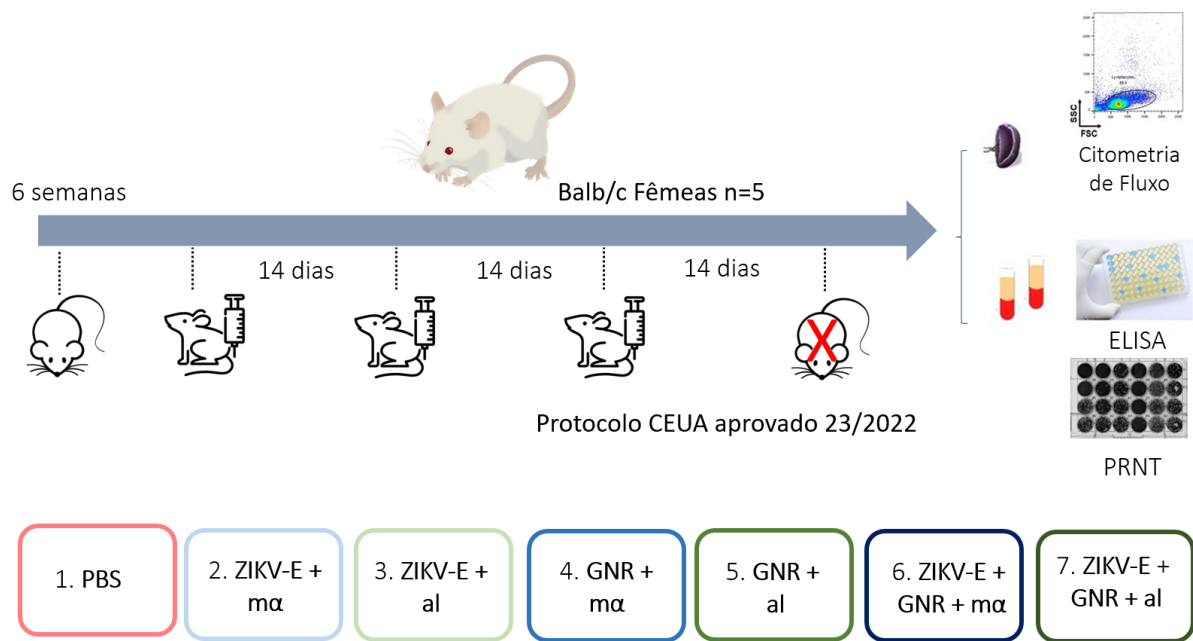


Figura 17. Estratégia de avaliação da resposta imune de camundongos Balb/c imunizados com ZIKV-E. A imunização seguiu um protocolo homólogo de 3 doses com intervalo de 14 dias, os camundongos divididos em 7 grupos experimentais com 5 animais em cada. A resposta imune celular dos animais imunizados foi realizada através da Marcação de Citocinas Intracitoplasmáticas (ICS) produzidas pelos esplenócitos estimulados com a proteína recombinante ZIKV-E. A resposta imune humoral foi avaliada com os soros dos animais imunizados através das técnicas de ELISA e PRNT. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, α = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alumínio.

Tabela 3. Grupos experimentais utilizados para avaliação da Imunogenicidade

Grupo experimental (n°)	Nome do grupo experimental	Soluções
1	PBS	Solução Salina (PBS 1X)
2	ZIKV-E + α	10 μ g de ZIKV-E purificada acrescida de 4 μ g de MPLA e 2 μ g de 7DW8-5
3	ZIKV-E + al	10 μ g de ZIKV-E purificada acrescida 30% v/v de Alumén
4	GNR + α	10 μ g de GNR purificados acrescidos de 4 μ g de MPLA e 2 μ g de 7DW8-5
5	GNR + al	10 μ g de GNR purificados acrescidos 30% v/v de Alumén
6	ZIKV-E + GNR + α	10 μ g de ZIKV-E e 10 μ g de GNR purificados acrescidos de 4 μ g de MPLA e 2 μ g de 7DW8-5
7	ZIKV-E + GNR + al	10 μ g de ZIKV-E e 10 μ g de GNR purificados acrescidos 30% v/v de Alumén

4.5.3 Avaliação da Resposta Imune Celular

Quatorze dias após a última imunização, os animais foram eutanaziados e o baço de cada animal foi extraído e armazenado em tubos de 50mL contendo 5mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) completo suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 4 mM de L-glutamina, e um coquetel dos antibióticos penicilina potássica [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL] e anfotericina B [2,5 µg/mL] (Sigma-Aldrich, EUA). Os baços foram transferidos para uma placa de 6 poços em 3mL de solução PBS (pH 7,4) e macerados com o auxílio do embolo de uma seringa de 3mL para a obtenção de uma suspensão celular homogênea. Posteriormente, a solução macerada foi filtrada em filtro de cultura de células *Cell Strainer* (Merk, Alemanha) com poro de 30 µM e as células sedimentadas em centrífuga Nuve NF 800R a 1350 rpm, 20°C por 5 min. Foi adicionado 5mL de tampão de lise de eritrócitos, ACK (NH₄Cl, EDTA, NaHCO₃) ao sedimento celular resultante da centrifugação e mantido em contato com as células por 5 min, a reação de lise foi parada com 20 mL de PBS. Novamente, as células foram sedimentadas a 1350 rpm, 20°C por 5 min e o sobrenadante descartado.

As células sedimentadas foram ressuspensas em meio RPMI completo 20 % SFB para a concentração final de 10⁷ células/mL e posteriormente transferidas para placas de cultura de 96 poços com fundo em “U” na concentração final de 10⁶ células/poço. As células foram estimuladas com 10 µg/mL de ZIKV-E e incubadas em estufa a 37 °C, 5 % de CO₂ por 1 h e 30min. Em paralelo foram incluídos no ensaio o controle positivo do experimento (células estimuladas com 5 µg/mL de ConA) e os controles negativos (células não estimuladas e células não estimuladas utilizadas para compensação do aparelho).

Após período de estimulação, foi adicionada 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 Fite Anti-Mouse CD107a Clone 1D4B (RUO) (BD, EUA) diluído 1/50. As placas foram incubadas por mais 5h a 37°C, 5% de CO₂, e posteriormente armazenadas a 4 °C *overnight*.

No dia seguinte, as células foram centrifugadas em centrífuga NUVE NF 800R a 1500 rpm, 20 °C por 5 min, e o sobrenadante descartado. Para lavagem, foi adicionado 200 µL/poço de PBS e as células submetidas a uma nova centrifugação a 2000 rpm, 20 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado. Posteriormente foi adicionada as placas 50 µL/poço da 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 a 1.500 rpm, 20 °C por 5 min.

As células foram marcadas com os anticorpos seguindo os painéis avaliados. As células na placa referente ao painel de ativação foram marcadas com Alexa Fluor 405 Anti-Mouse CD3 Clone 17A2 (RUO) (BD, EUA) diluído 1/100, PercP Anti-Mouse CD4 Clone RM4.5 (RUO) (BD, EUA) diluído 1/100, Alexa Fluor 700 Anti-Mouse CD8 Clone YTS156.7.7 (RUO) (Biolegend, EUA) diluído 1/100, PE Anti-Mouse CD69 Clone H1.2F3 (Invitrogen, EUA) diluído 1/30. A mistura de anticorpos foi reunida e diluída em PBS 1 % BSA, adicionadas 50 µL/poço e as placas incubadas por 30 min a 4 °C. As células na placa referente ao painel de memória foram marcadas com Alexa Fluor 405 Anti-Mouse CD3 Clone 17A2 (RUO) (BD, EUA) diluído 1/100, Fitc Anti-Mouse CD4 Clone GK1.5 (RUO) (BD, EUA) diluído 1/50, PE-Cy5 Anti-Mouse CD44 Clone IM7 (RUO) (BD, EUA) diluído 1/100, APC Anti-Mouse CD127 Clone (SB/199) (Biolegend, EUA) diluído 1/100.

As placas foram lavadas com 200 µL/poço de solução (PBS 1% de BSA) e centrifugadas a 2.000 rpm por 2 min. Posteriormente, foi adicionado 50 µL/poço de solução de Fixação (PBS, 1 % de Paraformaldeído) e as placas incubadas a 4 °C por 20 min. Foi adicionado 200 µL/poço de solução (PBS 1 % de BSA) e as placas foram novamente centrifugadas a 2000 rpm, 20 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e adicionada 200 µL/poço de solução de permeabilização (PBS, 1 % BSA, 0,1 % Saponina). As placas foram novamente incubadas a 4 °C por 20 min, e posteriormente centrifugadas nas condições anteriormente citadas. Novamente, foi adicionada às placas 50 µL/poço da solução de bloqueio (PBS 1% BSA, 2% soro de camundongo *naive*), seguida por nova incubação a 4°C por 5 min e submetidas a um novo ciclo de centrifugação a 1500 rpm, 20°C por 5 min.

As células foram marcadas com anticorpos intracelulares, sendo adicionado à placa referente ao painel de memória PE-Cy7 Anti-Mouse TNF Clone MP6-XT22 (RUO) (BD, EUA) na diluição de 1/280 e na placa referente ao painel de ativação APC Anti-Mouse IFN-γ Clone XMG1.2 (RUO) (BD, EUA) na diluição de 1/100. Os anticorpos foram diluídos em PBS 1% BSA, 50 µL 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 µL/poço de solução (PBS 1% BSA) e centrifugadas a 2.000 rpm por 2 min por duas vezes. As células foram ressuspendidas em 200 µL de PBS 1% BSA para a aquisição em citômetro de fluxo (LSRFortessa, BD, EUA). As análises foram realizadas utilizando o programa FlowJo (Tree Star Inc., EUA). Os gráficos e dados estatísticos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 8.

4.5.2.1 Estratégias de Avaliação da Resposta Imune Celular por Citometria de Fluxo

As análises de resposta imune celular dos camundongos imunizados foram realizadas utilizando o programa FlowJo (Tree Star Inc., EUA), e as estratégias utilizadas estão ilustradas nas figuras 17-22. Primeiramente foram selecionados linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que expressam o marcador precoce de ativação de linfócitos CD69 (figura 18).

As células do baço dos animais imunizados também foram avaliadas para a produção de IFN- γ . Para tal, foram avaliados linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ / CD3⁺ CD8⁺ / CD3⁺ CD8⁺ CD107⁺, na produção de IFN- γ após estimulação (figura 19).

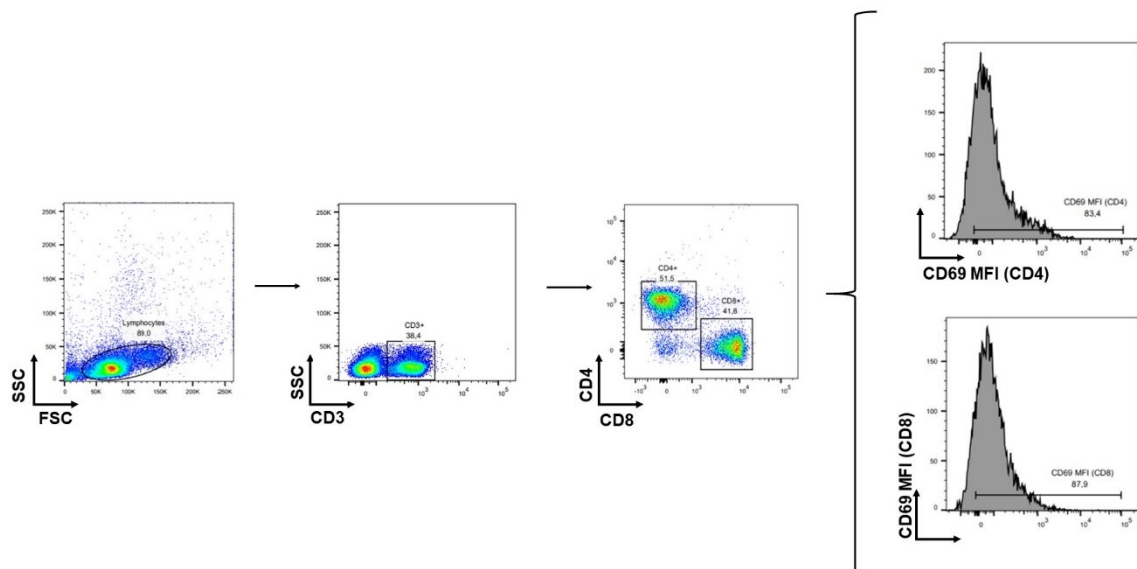


Figura 18. Estratégia de gate painel de ativação para avaliar ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ com expressão de CD69 de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC versus SSC. Em seguida, as células T foram selecionadas por CD3 versus SSC, seguido por CD8 versus CD4. Por fim, células T CD4⁺ e CD8⁺ foram avaliadas para expressão de CD69.

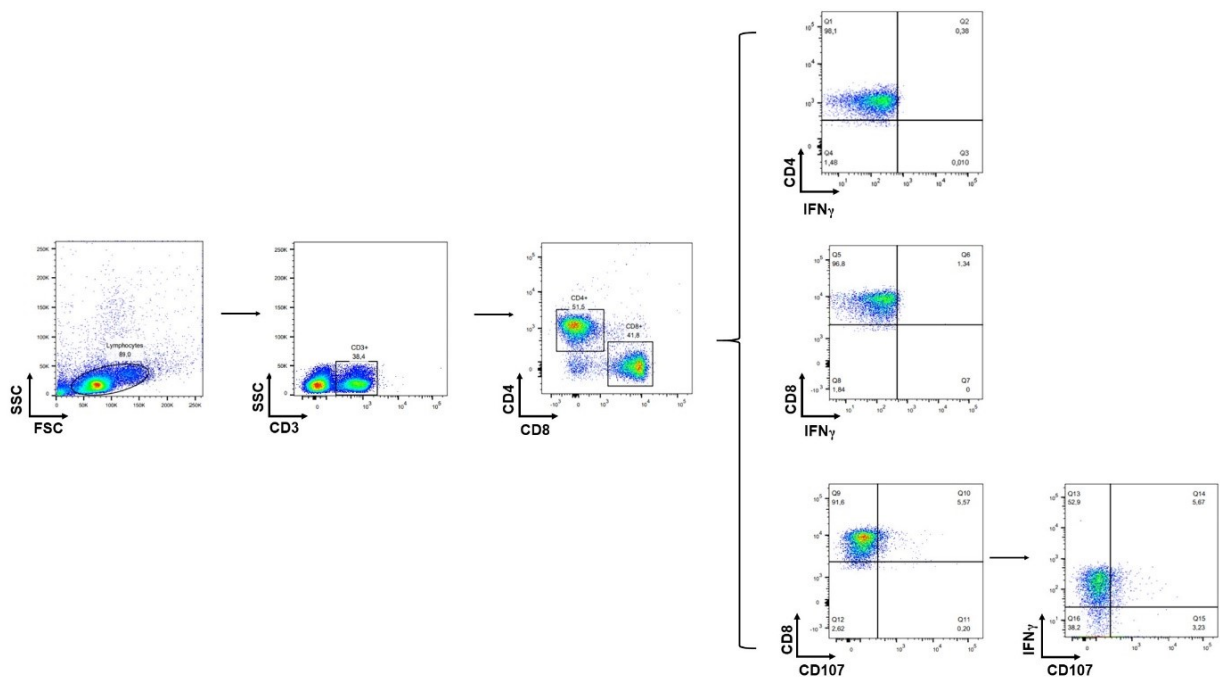


Figura 19. Estratégia de avaliação da capacidade dos linfócitos T produzirem de IFN- γ após estimulação com ZIKV-E. As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC versus SSC. Em seguida, as células T foram selecionadas por CD3 versus SSC, seguido por CD8 versus CD4. Células T CD4 +, CD8 + e células TCD8+ CD107 + foram avaliadas para expressão de IFN- γ .

Em seguida, avaliamos as porcentagens de subconjuntos de células T que expressam marcadores de memória (CD44 e CD62L). Os subconjuntos de células T CD44- CD62L-/+ , CD44+ CD62L+ e CD44+ CD62L- foram definidos como células de memória “naive”, células de memória central e células de memória efetora, respectivamente e são demonstrados na figura 20.

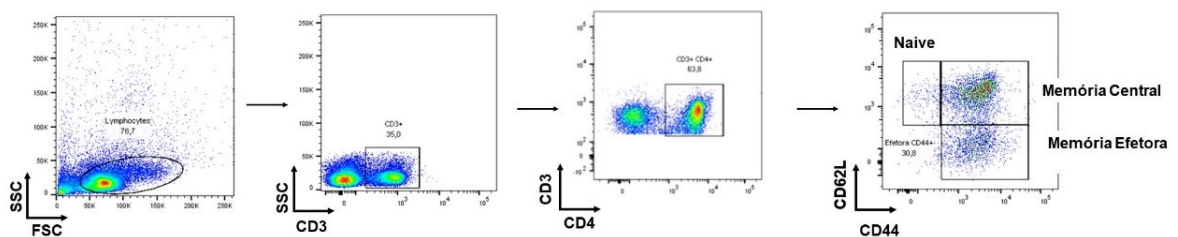


Figura 20. Estratégia de avaliação do fenótipo de memória de células T de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC versus SSC. Em seguida, as células T foram selecionadas por CD3 versus SSC, seguido por CD4 versus CD3. Células T CD4 + versus CD3 + foram avaliadas para expressão de CD62L versus CD44. Os subconjuntos CD44 – CD62L - / + , CD44 + CD62L + e CD44 + CD62L- foram definidos como células T CD4 + e CD8 + *naives*, de memória central e memória efetora, respectivamente.

Na sequência, as subpopulações de células de memória central e memória efetora foram avaliadas pela capacidade de produção da citocina TNF- α (figura 21).

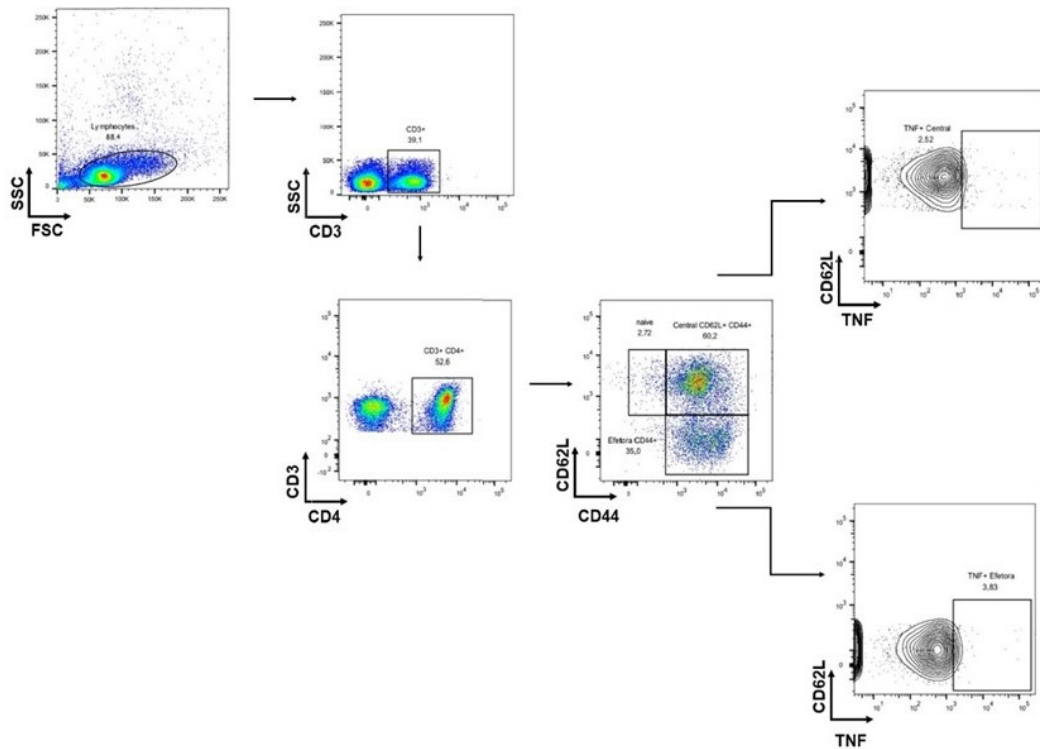


Figura 21. Estratégia de avaliação da capacidade de secreção de TNF- α por células T de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC versus SSC. Em seguida, as células T foram selecionadas por CD3 versus SSC, seguido por CD4 versus CD3. Células T CD4 + versus CD3 + foram avaliadas para expressão de CD62L versus CD44. Os subconjuntos CD44 - CD62L - / +, CD44 + CD62L + e CD44 + CD62L- foram definidos como células T CD4 + e CD8 + *naïves*, de memória central e memória efetora, respectivamente. Por fim, as subpopulações definidas como células de memória central e memória efetora foram avaliadas para secreção de TNF- α .

Por fim, as subpopulações de células de memória central e memória efetora foram avaliadas pela expressão do marcador de memória CD127 (figura 22).

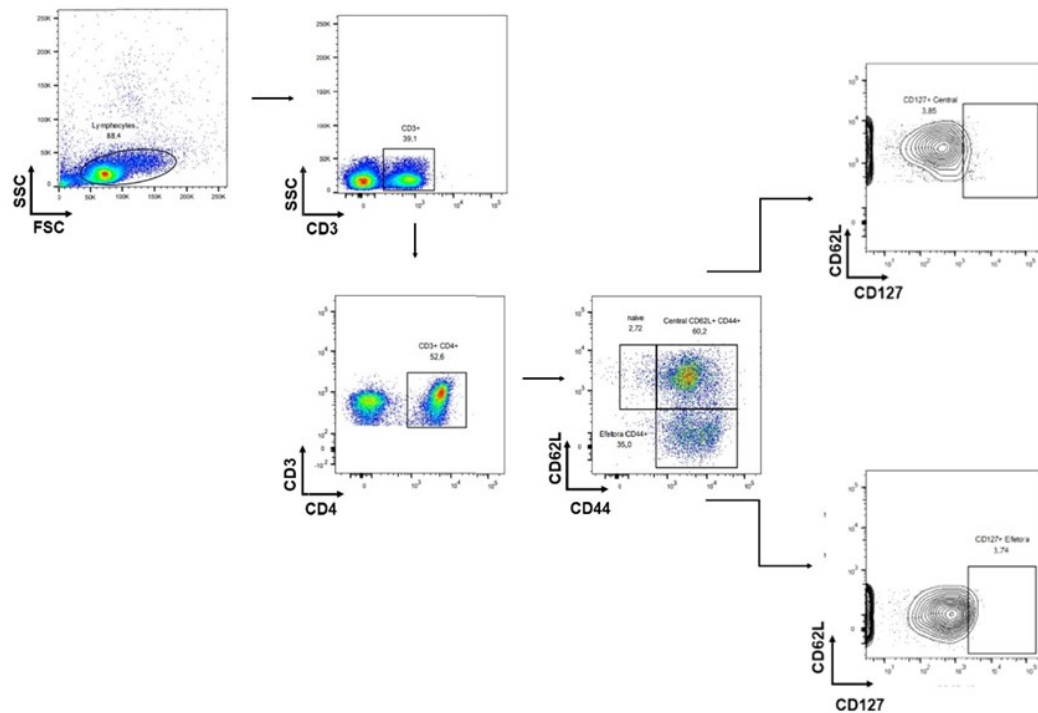


Figura 22. Estratégia de avaliação da expressão de CD127 em células T de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC versus SSC. Em seguida, as células T foram selecionadas por CD3 versus SSC, seguido por CD4 versus CD3. Células T CD4 + versus CD3 + foram avaliadas para expressão de CD62L versus CD44. Os subconjuntos CD44 – CD62L - / +, CD44 + CD62L + e CD44 + CD62L- foram definidos como células T CD4 + e CD8 + *naïves*, de memória central e memória efetora, respectivamente. Por fim, as subpopulações definidas como células de memória central e memória efetora foram avaliadas para expressão de CD127.

4.5.4 Avaliação da Resposta Imune Humoral por Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)

Os níveis de anticorpos específicos contra a proteína ZIKV-E produzidos pelos camundongos imunizados foram avaliados através do ensaio imunoenzimático 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 ELISA 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com a proteína ZIKV-E diluída em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,16 %, NaHCO_3 0,24% e pH 9,6). Após ensaios de padronização, optou-se por adicionar 400 ng/poço de ZIKV-E as quais permaneceram incubadas a 4°C *overnight*, para fixação das proteínas na superfície do poço. Após a sensibilização as placas foram lavadas com 300 μL /poço de PBS-T (PBS 1X + 0,05 % de 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 na diluição de 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 300 µL/poço de PBS-T solução de lavagem para adição do anticorpo secundário *antimouse IgG* (Sigma Aldrich) conjugado à enzima peroxidase na diluição de 1:5.000. As placas foram novamente incubadas por 1 h a 37 °C com posterior lavagem.

Nas etapas finais de revelação, aplicou-se 100 µL/poço do reagente de visualização tetrametilbenzidina (TMB – Sigma Aldrich, USA), e as placas foram incubadas ao abrigo de luz por 10 min. Onde a mudança de cor, indica a presença de anticorpos capazes de se ligar à proteína ZIKV-E, no qual a intensidade se relaciona diretamente com a quantidade de antígeno conjugado. Por fim, a reação foi parada com solução de H₂SO₄ 0,5 M (50 µL/poço) e a absorbância medida em espectrofotômetro de microplacas em comprimento de onda 450 nm no aparelho Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific). Os gráficos e dados estatísticos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 8.

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

4.5.5.1 Células e vírus

4.5.5.1.1 Células C6/36 (*Aedes albopictus*) e Vero (*Cercopithecus aethiops*)

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

Para a multiplicação de ZIKV e obtenção de estoques virais foram utilizadas células C6/36, cultivadas e mantidas em frascos de 25 cm² utilizando meio Leibowitz, L-15 (Cultilab, Brasil), contendo 5% de SFB (Cultilab, Brasil) e um coquetel dos antibióticos estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA [100 µg/mL]), penicilina potássica (Sigma-Aldrich, EUA [100 U/mL]) e anfotericina B (Bristol-Myers Squibb, Brasil, [2,5 µg/mL]). Essas células foram mantidas a 28°C, sendo repicadas semanalmente. Para os repiques, a monocamada celular era despreendida do frasco por pipetagem vigorosa. Em seguida, a suspensão celular era transferida para outro frasco estéril e adicionada quantidade necessária de meio de cultura. Para a obtenção de estoque

de células, garrafas confluentes foram submetidas à pipetagem como no repique, adicionados de 10% de DMSO, 20% de SFB e 70% de meio L-15. Em seguida, as células eram distribuídas em criotubos contendo 10^7 células e os estoques congelados em nitrogênio líquido.

Para os ensaios de titulação do estoque viral, foram utilizadas as células Vero (ATCC CCL-81), cultivadas e mantidas em frascos de 25 cm² utilizando meio Mínimo Essencial de Eagle modificado por Dulbecco-DMEM (Sigma-Aldrich, EUA), contendo 5% de SFB e os antibióticos citados acima. As culturas foram incubadas em estufa de atmosfera umidificada, a 5% de CO₂ e 37°C, sendo repicadas a cada 3 dias. Para os repiques, a monocamada celular era previamente lavada com tampão salina fosfato (PBS 1×: 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, pH 7,2) e, posteriormente, desprendida do frasco com tripsina-EDTA 0,05% (gibco, USA) e homogeneizada. Em seguida, a suspensão celular era transferida para outro frasco estéril e adicionada quantidade necessária de meio de cultura. Para a obtenção de estoque de células, garrafas confluentes foram submetidas às mesmas etapas para o repique celular, adicionados de 10% de DMSO, 20% de SFB e 70% de DMEM. Em seguida os estoques eram congelados em nitrogênio líquido, com pelo menos 10^7 células/criotubo.

4.5.5.1.2 Origem dos vírus e produção de estoque trabalho

A amostra de ZIKV isolada no Brasil (PE-243/2015, número de acesso no Genbank KX197192) foi gentilmente cedida pelo Professor Dr Claudio Bonjardim (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG). Para produção do estoque de trabalho, o vírus foi multiplicado em garrafas (75 cm²) de células C6/36 semiconfluentes a uma multiplicidade de infecção (moi) de 0,01, sendo as culturas infectadas incubadas em estufa a 28°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 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°C) a 3000 rpm por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante, clarificado, foi aliquoteado e mantido em freezer -80°C para posterior titulação. Como controle, o mesmo procedimento foi feito, porém, com a adição apenas de meio de cultura, sem infecção viral (Adaptado de Moraes et al., 2021).

4.5.5.1.2 Titulação do estoque viral

O procedimento de titulação do vírus amplificado foi realizado pelo método de contagem de placas de Dulbecco com algumas modificações (Dulbecco, 1952). Para tal, células Vero foram implantadas em placa de seis poços (3×10^5 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 de vírus foi removido, e adicionados a cada poço 2,0 mL de meio DMEM (Sigma-Aldrich) semissólido, acrescido de 1,25% 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 foram 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 foi expresso pelo número de unidades formadoras de placas (UFP), obtido nos poços cuja diluição apresentou entre 30 e 300 placas de lise viral, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para UFP/mL, como demonstrado na equação (1).

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

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.

4.5.4.2 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 Almeida et al., 2020, 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°C com 5% de CO_2 por 18 horas, para que as células pudessem alcançar confluência de 80%. Posteriormente, as amostras de soro dos camundongos foram diluídas nas concentrações de 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80 e colocadas em contato com 70 pfu de ZIKV, a mistura (vírus e soro) foi incubada por uma hora à 37°C para que a reação de neutralização ocorresse. Após esse tempo, 200 μL dessa mistura foi adicionada à cultura celular e deixada por 1 hora, para que a reação de adsorção da mistura com os receptores celulares fosse 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 retirada das placas e adicionado meio DMEM acrescido de 1,25% de SFB e 1,25% de carboximetilcelulose (CMC). As placas foram novamente incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 2 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.

O índice PRNT₇₀ 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. Resultados

5.1 Análises de Bioinformática e Construção da sequência sintética de ZIKV-E

Para o desenho do gene da proteína do envelope de ZIKV, foram selecionadas sequências de vírus Zika de circulação mundial descritos no banco de dados do NCBI (GenBank). A tabela 4 relaciona a identificação da amostra e seu respectivo número de depósito na plataforma de banco de dados.

Tabela 4. Sequência otimizada do gene codificador de ZIKV-E

Gene para clonagem	Sequência otimizada do gene codificador de ZIKV-E
Isolado Zika virus BR/BAHIA/Salvador/07/2016, genoma parcial KU940228.1	MIRCI GVS NRDFVEGMSGGTWVDV VLEHGGCVTVMAQDKPTVDIEL VTTT VSNMAEVRSYCYEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVC KRTL VDRGWGNGCGLFGKGS LVTCAKFACSKKMTGKSIQPENLEYRI MLSVHGSQHS GMIVNDTG HETDENRAKVEITPNSPRAEATLGGFGSL GLDCEPRTGLDFSDLYYLT MNNKHWLVHKEWFHDIPLPWHAGADTG TPHWNNKEALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEM DGA KGRLSSGHLKCR LKMDKLR LKGVSYSLCTAAFTFTKIP AETLHG TVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLITANPVITESTEN SKMMLELDPFPGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAK RMAVLGDTAWDFGSVGGALNSLGKGIHQILEHHHHHH

5.1.1 Análises de porção transmembrana, hidrofobicidade e desordem estrutural

Após a definição da sequência de proteína a ser produzida, esta foi adaptada para uma melhor expressão em vetor procarioto. Para isso, a sequência foi códon otimizada e teve sua porção transmembrana removida. A predição da porção transmembrana realizada pela ferramenta TMHMM 2.0 indicou a presença de regiões transmembranas a partir do resíduo de aa 456 (com 60 % de probabilidade deste resíduo pertencer a porção transmembrana). Análises de tendência a porção transmembrana e hidrofobicidade pelo *ProtScale* (Expasy, scale Hphob. / Kyte & Doolittle), apresentaram diferentes pontos de corte prováveis. Enquanto o primeiro mostrou uma tendência a TM a partir do aa 459, a análise de hidrofobicidade mostrou picos estreitos acima de score=1 ao longo de quase toda a extensão da proteína, apresentando um pico mais amplo após o aa 449 (tabela 5, figura 23).

As predições de tendência a desordem estrutural pelo IUPRED mostraram que a proteína possui desordem intermediária ao longo de sua estrutura (figura 23). Nesse tipo de análise, valores próximos a 1 indicam ausência de estrutura terciária ou uma maior linearidade.

Tabela 5. Análises de porção transmembrana e hidrofobicidade de ZIKV-E

# aa	TMHMM			<i>ProtScale (Expasy)</i>	
	Interna	Membrana	Externa	Hidrofobicidade	Transmembrana
445	0,028	0,005	0,967	0,467	0,069
446	0,028	0,006	0,965	0,000	-0,154
447	0,028	0,009	0,962	0,244	-0,091
448	0,028	0,015	0,957	0,878	0,336
449	0,028	0,017	0,955	1,233	0,577
450	0,028	0,020	0,953	0,300	-0,027
451	0,027	0,022	0,951	0,567	0,074
452	0,026	0,027	0,947	1,378	0,481
453	0,025	0,038	0,936	1,189	0,482
454	0,025	0,043	0,931	0,833	0,241
455	0,007	0,368	0,625	0,833	0,241
456	0,003	0,596	0,402	0,844	0,354
457	0,002	0,668	0,330	0,556	0,253
458	0,001	0,832	0,167	0,144	0,203
459	0,001	0,918	0,081	0,889	0,808

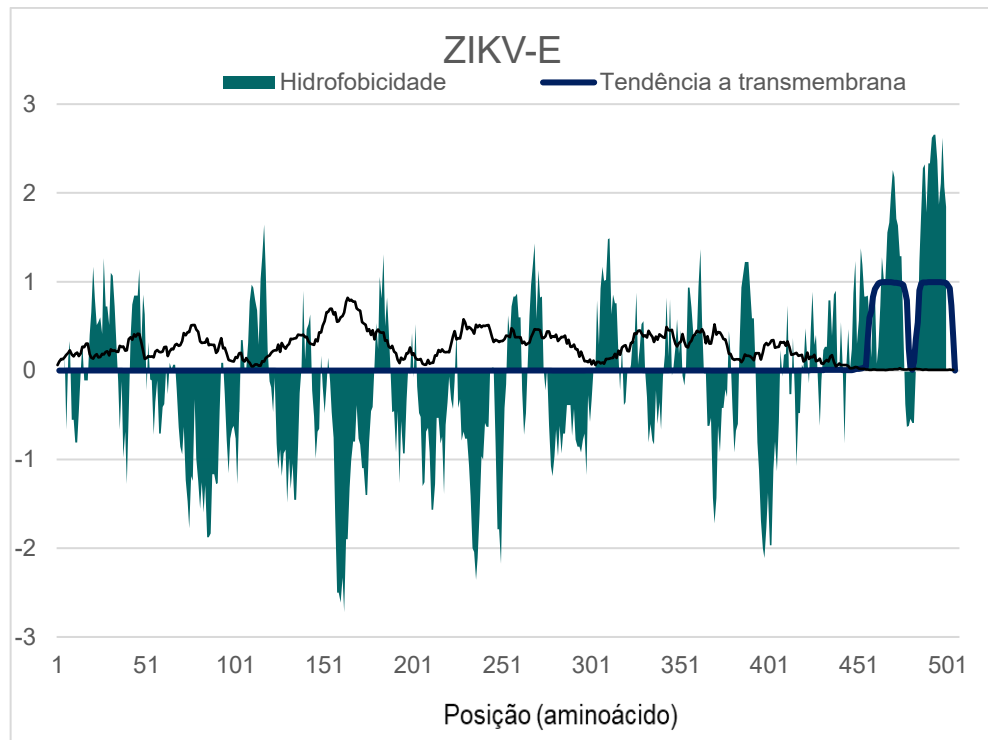


Figura 23. Análise in silico de hidrofobicidade (ProtScale), tendência a porção transmembrana (TMHMM Server) e tendência a desordem estrutural (IUPRED) para ZIKV-E (Fonte: Bagno, 2018).

Após a remoção das porções transmembrana, os genes foram códon-otimizados para uma melhor expressão em sistema procarioto. Como pode ser visto na figura 24, a comparação entre as sequências antes e após a otimização revela que este processo não alterou a sequência de aminoácidos.

```

ZIKV-E          IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTNSMAEVRSYC
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTNSMAEVRSYC
*****

ZIKV-E          YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRLGWNGCGLFGKGLVTCAKFA
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRLGWNGCGLFGKGLVTCAKFA
*****

ZIKV-E          CSKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSQMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEATL
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  CSKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSQMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEATL
*****

ZIKV-E          GFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYLTMNKHVLVHKEWFDIPLPWHAGADTGTPHWNKKE
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  GFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYLTMNKHVLVHKEWFDIPLPWHAGADTGTPHWNKKE
*****

ZIKV-E          ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALAEEMDGAKGRLSSGHLKCRLLKMDKLRLL
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALAEEMDGAKGRLSSGHLKCRLLKMDKLRLL
*****

ZIKV-E          KGVSYSLCTAAFTFKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLIT
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  KGVSYSLCTAAFTFKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLIT
*****

ZIKV-E          ANPVITESTENSKMMLELDPFPGDSYIVIGVGEKKITHHWRSGSTIGKAFEATVRGAKR
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  ANPVITESTENSKMMLELDPFPGDSYIVIGVGEKKITHHWRSGSTIGKAFEATVRGAKR
*****

ZIKV-E          MAVLGD TAWDFGSVGGALNSLKG I HQIFGAAFKSLFGGMSWFSQILIGTLLMWLGLNTK
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  MAVLGD TAWDFGSVGGALNSLKG I HQI-----
*****

ZIKV-E          NGSISLMCLALGGVLI FLSTAVSA
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  -----

```

Figura 24. Alinhamento, pelo Clustal Omega, comparando a sequência de ZIKV-E antes e após a otimização e remoção das porções transmembrana (Fonte: Bagno, 2018).

5.1.2 Análises físico-químicas e estruturais de ZIKV-E

Para avaliar as propriedades físico-químicas de ZIKV-E, utilizou-se a ferramenta ProtParam (ExPasy) capaz de estimar o peso molecular da proteína com base em sua sequência de aminoácidos (tabela 6).

Tabela 6. Propriedades físico-químicas de ZIKV-E

Número de aminoácidos	457
Peso Molecular (kDa)	50
Ponto isoelétrico (pI)	6,36

Para predição da estrutura tridimensional utilizou-se a plataforma *I-Tasser* sendo selecionado, o modelo de maior *C-score*, parâmetro que indica a qualidade do modelo predito. Valores de *C-score* giram em torno de -5 a 2, sendo que valores mais elevados indicam maior

confiabilidade. O valor encontrado para C-score foi de 1,73 e a estrutura tridimensional é apresentada na figura 25.

Em seguida, o modelo gerado pelo *I-Tasser* foi validado utilizando os programas *ProSA-web* e *RAMPAGE*. No primeiro caso, o *Z-score* indica a qualidade geral da estrutura tridimensional. Seu valor é exibido em um gráfico que contém os *Z-scores* de todas as cadeias de proteínas determinadas experimentalmente (por raio-X ou RMN) no PDB. As análises pelo *ProSA-web*, indicaram que o modelo está dentro da gama de pontuação tipicamente encontrada para proteínas nativas de tamanhos similares (figura 24B), com *Z-score* de -7,52.

O gráfico de Ramachandran obtido pelo *RAMPAGE* apresentou 80,9 % de resíduos na região favorável, 14,3 % na região permitida e 4,8 % na região não permitida (figura 25C).

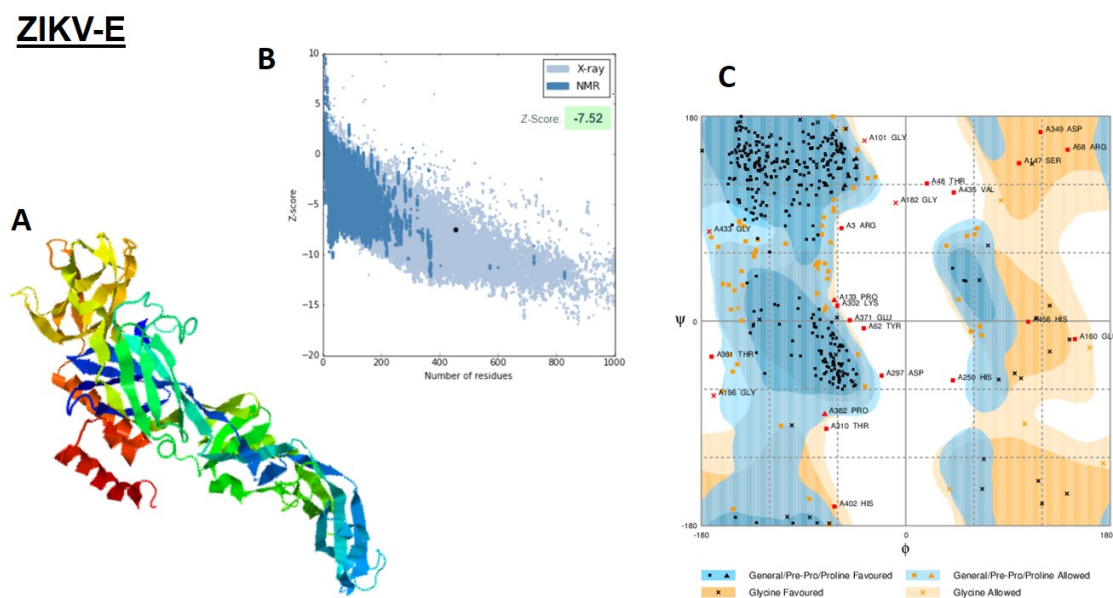


Figura 25. Predição da estrutura tridimensional para ZIKV-E. A) Representação em cartoon do modelo com maior C-score obtido pelo programa I-Tasser, B) Gráfico gerado pelo programa ProSA-web. C) Diagrama de Ramachandran gerado pelo RAMPAGE (Fonte: Bagno, 2018).

A sequência nucleotídica codificadora da proteína construída para a realização deste trabalho foi sintetizada comercialmente pela empresa Fastbio (Ribeirão Preto, SP), otimizada e subclonada em vetor de expressão pET-21a (+), entre os sítios de *NdeI* e *XhoI*, adicionando uma metionina inicial e uma cauda de histidina (figura 26).

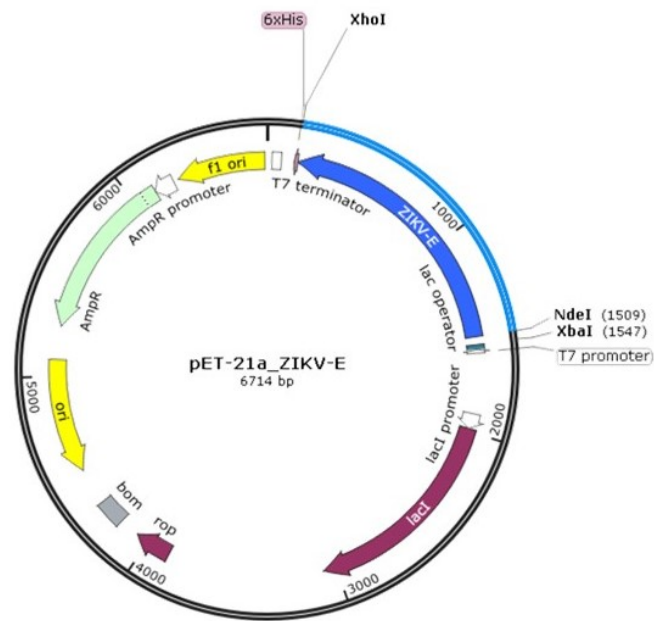


Figura 26. Mapa do plasmídeo sintético desenvolvido contendo a sequência do gene de interesse. Figura gerada a partir do programa SnapGene (GSL Biotech) (Fonte: Bagno, 2018).

5.3 Expressão e purificação da proteína recombinante ZIKV-E

Para a obtenção da proteína ZIKV-E foi utilizado sistema de expressão procarioto, onde o gene de interesse foi clonado em vetor de expressão pET21a e produzido em *E. coli*. Para confirmação do inserto sintético, bactérias *E. coli* da linhagem BL-21 foram transformadas com o plasmídeo pet-21a_ZIKV-E. Após a transformação foi feita extração de DNA plasmidial dos clones que cresceram em meio seletivo. Em sequência, foi realizada uma digestão dupla com as enzimas *XbaI* e *XhoI*. Os produtos da digestão foram analisados por gel de agarose (figura 27), onde foi observado um fragmento linear de 1389 pb, conforme esperado.

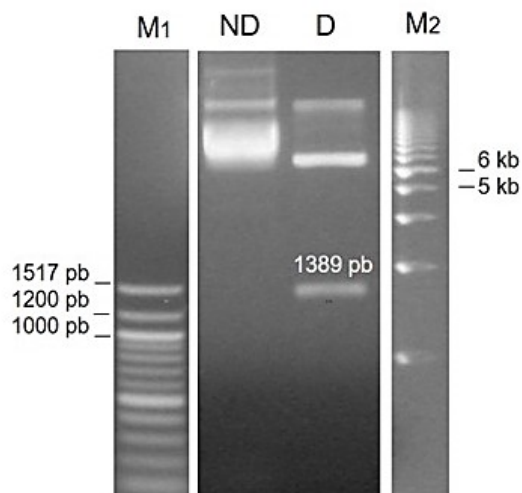


Figura 27. Restrição enzimática do DNA plasmidial para a confirmação da presença do gene de interesse no vetor pET-21a. O DNA plasmidial foi extraído por minipreparação plasmidial de suspensão bacteriana lisada e a restrição enzimática deu-se pela utilização das enzimas XhoI/NdeI. Onde: M₁= Marcador de peso molecular 100 pb, ND= plasmídeo não digerido, D= plasmídeo digerido, M₂= Marcador de peso molecular 1 Kb.

Para avaliar a expressão de ZIKV-E, primeiramente, bactérias *E. coli* da linhagem BL-21 foram transformadas com o plasmídeo peT21-a_ZIKV-E. Após crescimento em meio seletivo, 4 colônias foram selecionadas para realização do teste de indução. No teste inicial (37°C, 3h, 1mM IPTG) os quatro clones coletados de ZIKV-E apresentaram banda diferencial entre as frações induzidas (I) quando comparadas às frações não induzidas (NI) (figura 28a). A proteína ZIKV-E apresentou peso molecular esperado conforme o predito pelo ProtParam (Expasy) de 50 kDa (ZIKV-E).

A próxima etapa da padronização consistiu na avaliação do melhor período de indução, para isso foram realizados dois protocolos de expressão de ZIKV-E. Assim, foi realizada a indução por 3h a 37°C e overnight a 20°C, ambos com 1 mM de IPTG (figura 28b). Ainda, foi possível observar a presença da proteína de interesse na fração insolúvel, sendo necessário a realização de um protocolo adicional para avaliar a solubilidade em ureia.

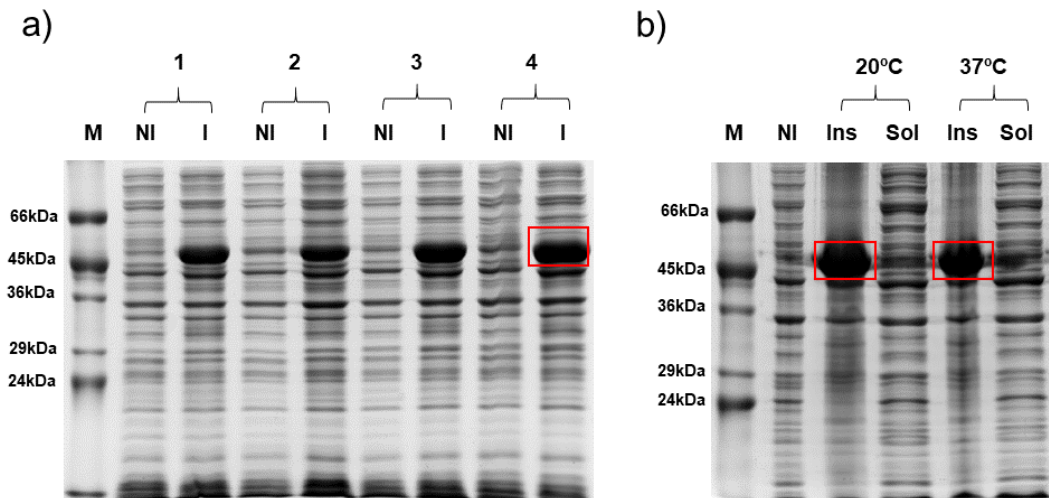


Figura 28. SDS-Page das etapas envolvidas na padronização da expressão proteica de ZIKV-E (50 kDa). a) Primeira etapa da padronização= triagem inicial de 4 clones (1-4) b) Segunda etapa da padronização= variação do tempo e temperatura de indução do clone selecionado na etapa anterior (20°C e 37°C), e avaliação da solubilidade de ZIKV-E após lise celular. Onde, M= Marcador de peso molecular, NI= Fração não induzida coletada no tempo inicial (após DO ideal), I = fração coletada no tempo final após indução com 1mM de IPTG, Ins = fração coletada no tempo final após indução com 1mM de IPTG.

Em sequência, foi realizado o teste de solubilidade em diferentes concentrações de ureia, variando-se as molaridades de 2, 4, 6 e 8 M. Como pode ser visto na figura 29, a partir de 4 M de ureia já foi possível obter uma quantidade significativa da proteína ZIKV-E em fração solúvel. Entretanto, em 8 M de ureia, uma quantidade ainda maior de proteína é obtida na fração solúvel.

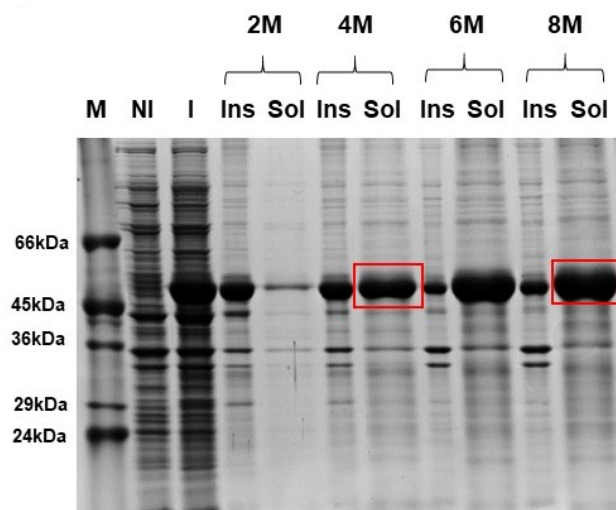


Figura 29. SDS-Page da avaliação da solubilidade da proteína ZIKV-E em ureia (2M, 4M, 6M e 8M). Onde, M= Marcador de peso molecular, NI= Fração não induzida coletada no tempo inicial (após DO ideal), I = fração coletada no tempo final após indução com 1mM de IPTG.

Para a realização deste trabalho, em primeiro momento foi escolhida a concentração de 4 M de ureia para prosseguir com os experimentos e produzir a proteína ZIKV-E em larga escala. Entretanto, o rendimento obtido não foi o suficiente para todos os ensaios, sendo necessária uma nova produção. Para esta segunda produção, foi escolhida a concentração de 8M de ureia, afim de obter um rendimento maior de ZIKV-E. As imagens que se seguem são referentes a produção do segundo lote de ZIKV-E.

Após a produção em larga escala, as culturas foram centrifugadas e o sedimento celular ressuspendido em tampão com ureia (4M e 8M). Estas amostras foram submetidas a purificação por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap no aparelho ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare Life Sciences). Na figura 30 observa-se o gráfico de purificação da proteína, onde a curva azul representa a leitura da absorção de luz UV da proteína ZIKV-E. Apenas as alíquotas de saída do pico das proteínas foram coletadas. Para examinar a qualidade da purificação, as frações purificadas foram submetidas a fracionamento em SDS-PAGE (figura 31).

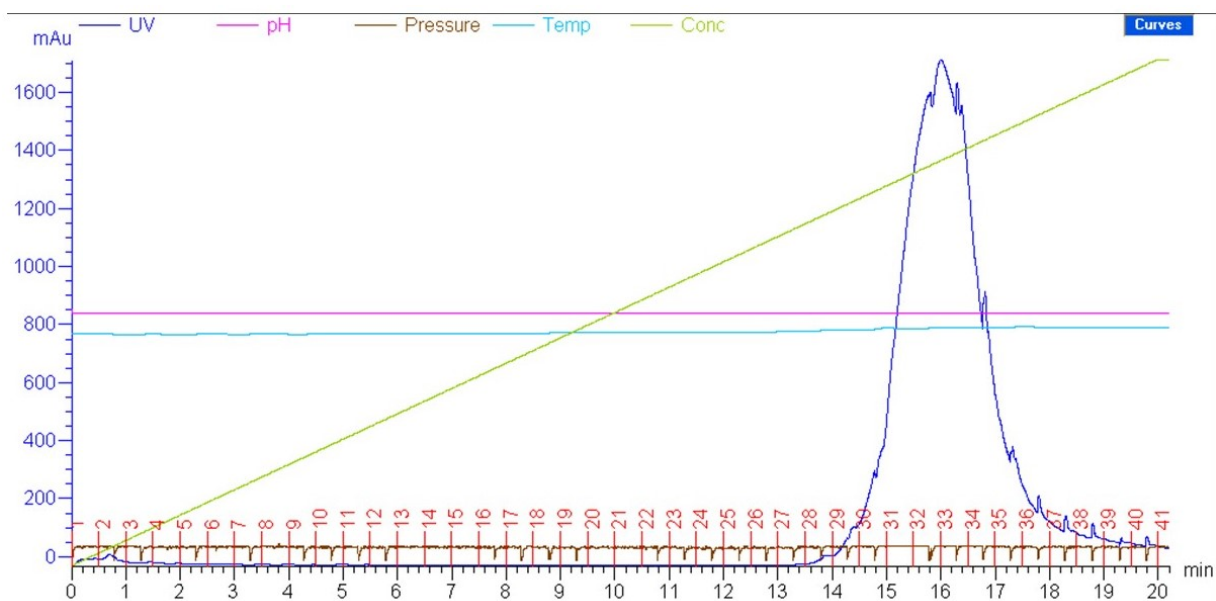


Figura 30. Processo de purificação da proteína recombinante ZIKV-E. O gráfico foi gerado pelo software Prime View 5.0. A curvas em azul representa a eluição da proteína recombinante ZIKV-E da coluna de purificação. As alíquotas de 15-21 representam as alíquotas nas quais a proteína foi eluída da coluna.

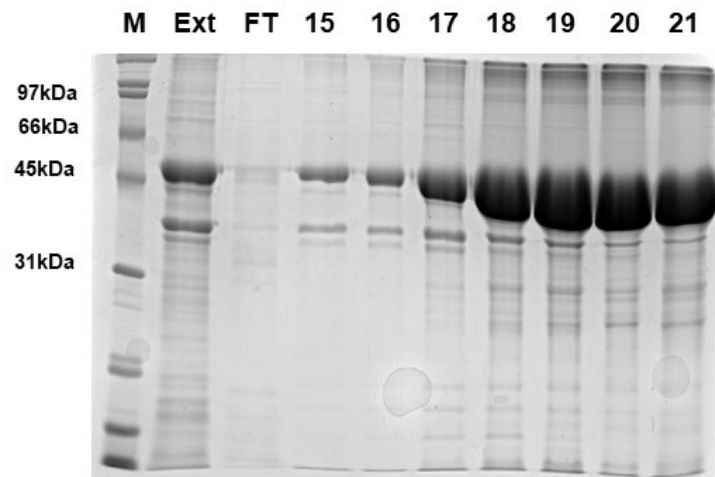


Figura 31. SDS-Page da Purificação de ZIKV-E. Onde, M= Marcador de peso molecular, Ext= Extrato após a lise celular, FT= Fração não adsorvida, 15-21= Frações coletadas correspondentes ao pico de eluição.

Após o processo de purificação, a concentração proteica de cada lote de ZIKV-E foi dosada pelo método de Bradford e pelo kit Randox. Os resultados obtidos foram 78 ng/ μ L para o primeiro lote, e 1400 ng/ μ L (figura 32) para o segundo lote de ZIKV-E produzido. O rendimento total de cada lote de proteína recombinante produzida foi de 3 mg (4M Ureia) e 21,5 mg (8M ureia).

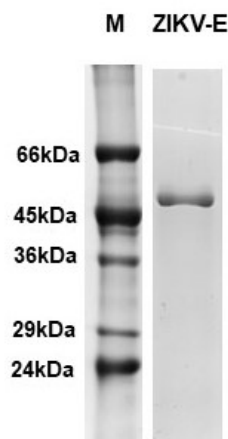


Figura 32. SDS-Page de ZIKV-E após quantificação. Onde, M= Marcador de peso molecular.

Por fim, após os métodos de purificação, foi necessária a troca do tampão de purificação, para realização da ligação com as nanopartículas. Assim, para continuação do trabalho, a proteína ZIKV-E foi dialisada e novamente quantificada. A proteína foi novamente quantificada, e a qualidade da proteína de trabalho foi novamente verificada por SDS-PAGE (figura 33).

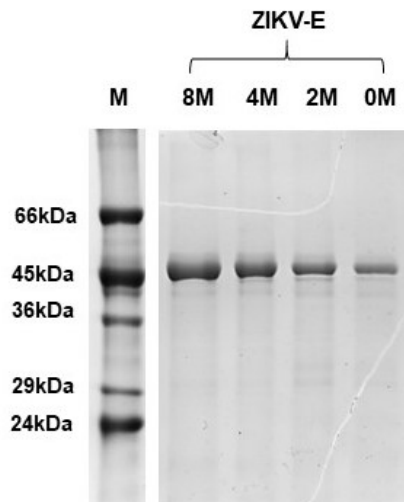


Figura 33. SDS-Page de ZIKV-E após o processo de dialise. Onde, M= Marcador de peso molecular, ZIKV-E= Fração de ZIKV-E coletada após a passagem da proteína ZIKV-E pelos tampões 8M, 4M, 2M e 0M de ureia.

5.3.1 Verificação da antigenicidade de ZIKV-E

Para verificação da antigenicidade de ZIKV-E, uma alíquota de cada lote produzido foi submetida a um ensaio de Western Blot, de forma a confirmar a antigenicidade da proteína recombinante produzida. Para tal, foram utilizados dois anticorpos: um anticorpo comercial específico para a região C-terminal que possui uma cadeia de histidina e um anticorpo monoclonal específico para o Flavivírus (4G2). ZIKV-E mostrou-se capaz de ser reconhecida pelo anticorpo comercial anti-histidina e pelo anticorpo monoclonal 4G2 (figura 34).

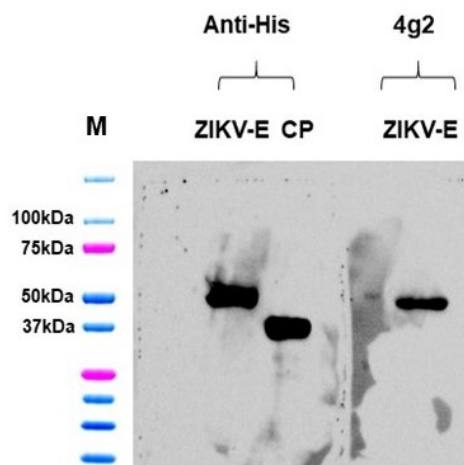


Figura 34. Western-blot mostrando a reação entre a proteína ZIKV-E e os anticorpos comerciais Anti-His e Panflavi 4G2. Onde M= Marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad) corado com Luminata (Millipore), CP = Proteína de CHIKV-E utilizada como controle positivo do experimento.

5.4 Nanobastões de ouro (GNR)

5.4.1 Funcionalização dos Nanobastões de ouro (GNR)

O primeiro passo no processo de funcionalização consiste na substituição do agente estabilizante (CTAB) pelo ácido lipóico (LA) à superfície dos nanobastões, para que dessa forma, seja adicionado um grupo carboxila ao qual a proteína irá se ligar. Para fins de padronização, foi realizada uma curva de saturação de LA, onde a concentração do mesmo variou de 6 a 14mM, para 250uL de GNR. A ligação do LA à superfície dos GNR ocorreu de forma eficiente e pode ser comprovada pela espectroscopia UV-Vis, devido a ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR). Na figura 35a é possível observar o deslocamento a direita (“*red shift*”) no pico longitudinal em todas as concentrações de LA.

Para o cálculo do deslocamento de plasmon correto, as curvas correspondentes foram derivadas e plotadas com o cálculo correspondente da derivada do pico gaussiano, onde a interceptação do eixo X corresponde ao pico longitudinal (figura 35b). Considerando o espectro do GNR puro como referência, na figura 35c temos os deslocamentos relativos das curvas no pico longitudinal do espectro calculados após a reação com cada concentração de LA. Conforme observado (figura 35c), quanto maior a concentração de LA, maior o deslocamento observado. Foi possível acrescentar até 14 mM de LA para preencher a superfície dos GNR, esse valor resultou em um deslocamento do pico longitudinal de 20 nm. Comparativamente maior que as concentrações de 10 e 12 mM de LA, que resultaram em um deslocamento de 15 e 16 nm respectivamente. Dessa forma, para os próximos passos da padronização, a concentração de trabalho de LA foi fixada em 14mM.

O próximo passo, envolve a ligação do agente acoplante 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e do agente estabilizante sulfo-N-hidroxissuccinimida (sulfo-NHS) a fim de favorecer a interação covalente requerida entre os grupos carboxilas presentes no LA e os radicais aminicos da proteína ZIKV-E. Após a ligação dos agentes intermediários EDC e NHS foi possível observar um deslocamento do pico longitudinal à esquerda (“*blue shift*”) do pico observado para o LA (figura 36b). Com um deslocamento de 10nm em relação ao pico do GNR puro (figura 36c).

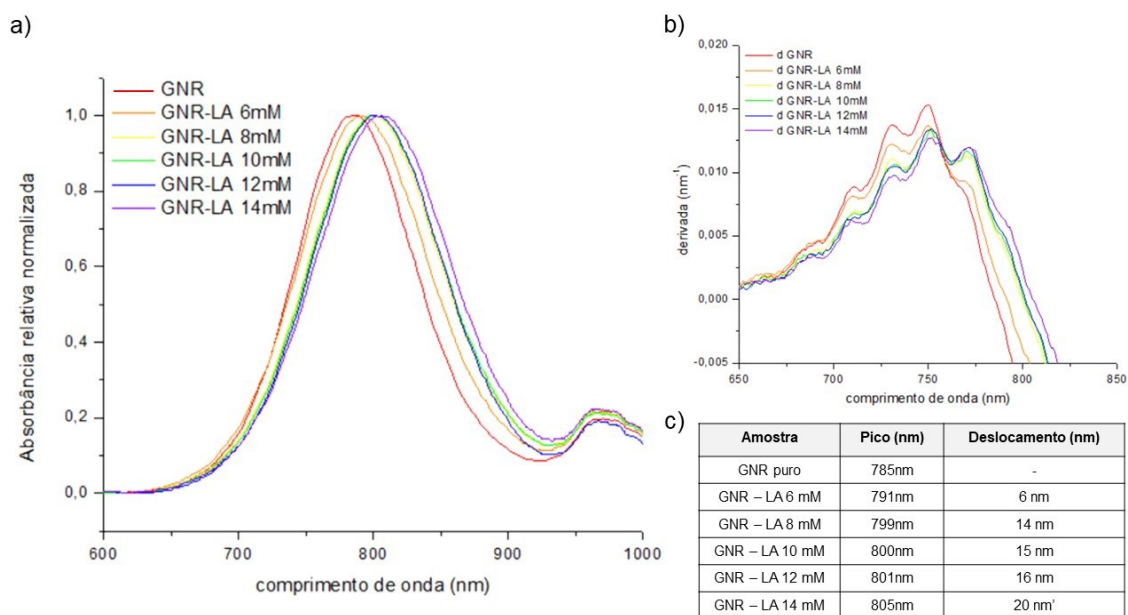


Figura 35. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas com LA. a) absorvância relativa normalizada b) Cálculo derivativo do sinal UV-Vis medido a partir das amostras, onde a região de zero (eixo derivativo) representa o pico do modo longitudinal c) deslocamentos relativos das curvas no pico longitudinal do espectro calculados após a reação com cada concentração de LA. Onde: GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, LA= ácido lipóico.

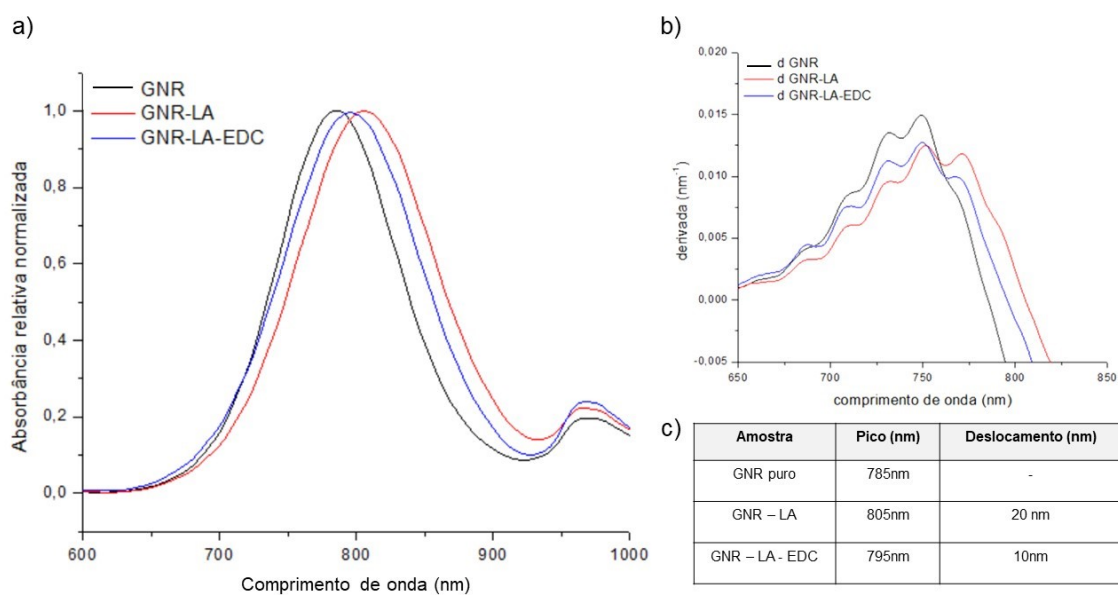


Figura 36. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas EDC-NHS. a) absorvância relativa normalizada b) Cálculo derivativo do sinal UV-Vis medido a partir das amostras, onde a região de zero (eixo derivativo) representa o pico longitudinal c) deslocamentos relativos das curvas no pico longitudinal do espectro calculados após a reação com LA e EDC. Onde: GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, LA= ácido lipóico. EDC= *N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida* e N-hidroxissuccinimida.

Por fim, a proteína ZIKV-E foi adicionada a solução de GNR-LA-EDC-NHS em concentrações de 0,125 μg a 12 μg (figura 37). Em todas as concentrações de ZIKV-E

adicionadas, houve um deslocamento significativo à direita do espectro. Como esperado, esse deslocamento se torna maior à medida que aumenta a concentração de ZIKV-E. Na figura 38 é possível observar a absorbância relativa, o cálculo derivativo e deslocamento para as concentrações de ZIKV-E de 8 μg , 10 μg e 12 μg . Para os quais obtivemos um deslocamento de 24, 27 e 32 nm respectivamente.

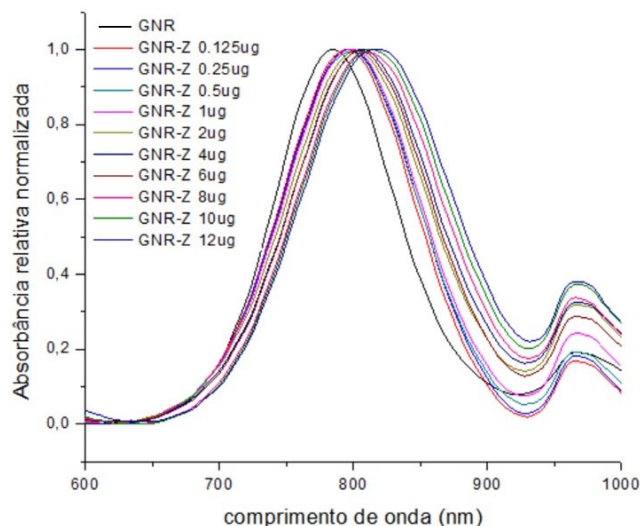


Figura 37. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas covalentemente com ZIKV-E. Absorvância relativa normalizada. Onde: GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, Z= proteína recombinante produzida.

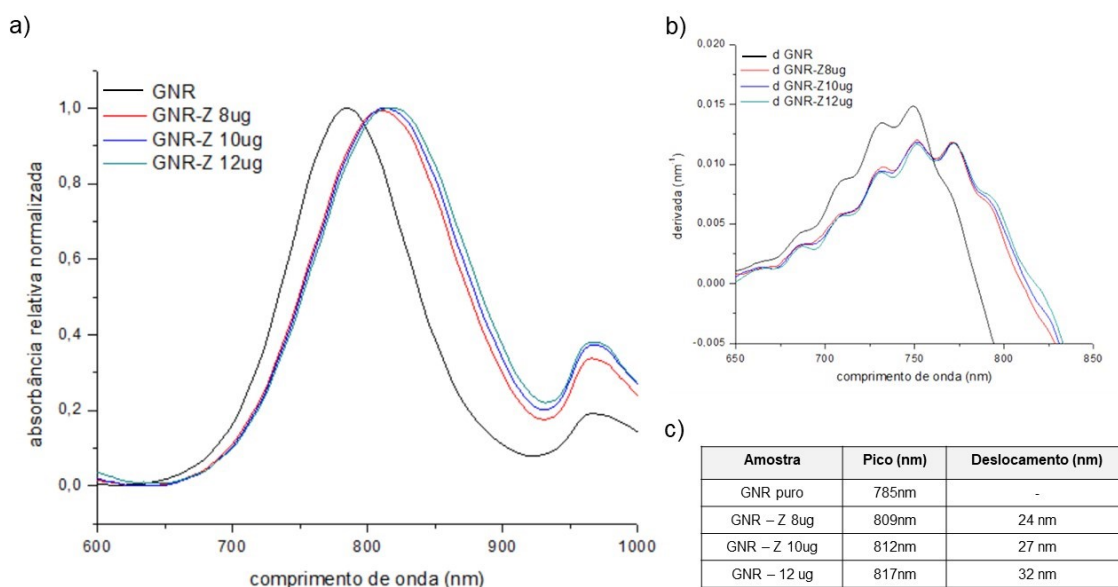


Figura 38. Espectro de absorvância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas covalentemente com ZIKV-E. a) absorvância relativa normalizada b) Cálculo derivativo do sinal UV-Vis medido a partir das amostras, onde a região de zero (eixo derivativo) representa o pico do modo longitudinal c) Deslocamentos relativos das curvas no pico longitudinal do espectro calculados após a reação com cada

concentração da proteína ZIKV-E. Onde: GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, Z= proteína recombinante produzida.

Como estratégia de imunização optamos por trabalhar com concentrações de 14mM de ácido lipoico e 10 µg de ZIKV-E para 250 µL de GNR. Na figura 39 é possível observar os espectros de absorbância, o cálculo derivativo e o deslocamento após a ligação com LA (linha vermelha), os intermediários EDC e NHS (linha azul), e ZIKV-E (linha verde).

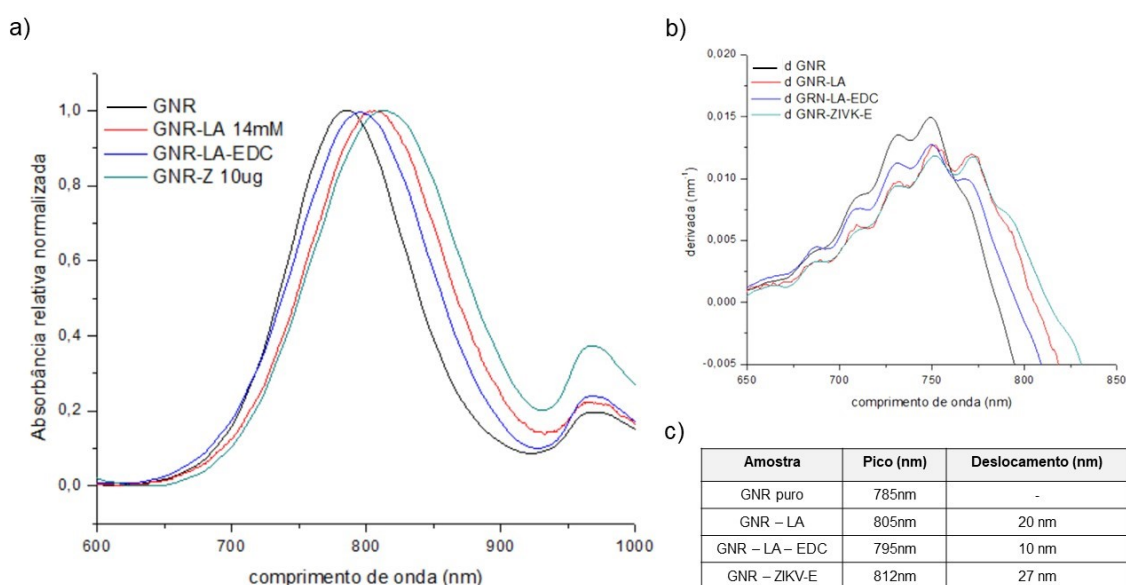


Figura 39. Espectro de absorbância na região de UV-Vis das amostras de GNR funcionalizadas covalentemente com LA, EDC-NHS e ZIKV-E a) Absorbância relativa normalizada b) Cálculo derivativo do sinal UV-Vis medido a partir das amostras, onde a região de zero (eixo derivativo) representa o pico do modo longitudinal c) Deslocamentos relativos das curvas no pico longitudinal do espectro calculados após a reação com LA, EDC e ZIKV-E. Onde: GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, EDC= *N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida* e N-hidroxisuccinimida, Z= proteína recombinante produzida.

5.4.2 Caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E

A ferramenta construída ainda foi analisada para verificação da ligação por análise de potencial Zeta, análise do raio hidrodinâmico e por fluorometria.

5.4.2.1 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 de zeta entre -10 e +10 mV são consideradas neutras, GNP com potencial de zeta superior a +30 mV são consideradas fortemente catiônicas ou menos de -30 mV fortemente aniônicas (Clogston & Patri, 2010).

Assim, foi realizada a medida do potencial zeta dos GNR sozinhos 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 ~50 mV (GNR-LA) para ~20 mV (GNR-ZIKV-) (figura 40), sendo essa diferença estatisticamente significativa. Essa mudança da carga total após a interação é um indicativo da interação de ZIKV-E na superfície dos GNR.

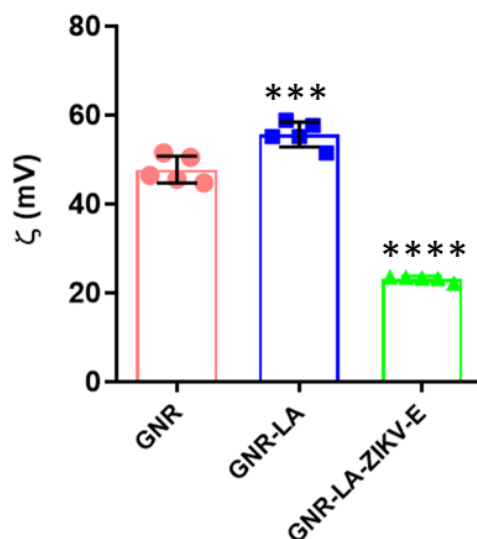


Figura 40. Medida do Potencial Zeta. Medida do Potencial Zeta da suspensão de GNR puro, GNR ligados ao ácido lipoico (GNR - LA) e por último da ferramenta completa (GNR-LA-ZIKV-E). Os resultados foram lidos em um analisador de tamanho de partículas Litesizer 500 tipo BM10 e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey, com uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a variável avaliada com *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.

5.4.2.2 Raio hidrodinâmico

Devido ao movimento browniano, é possível estimar o tamanho de um nanocomplexo por meio de medidas hidrodinâmicas do raio, estimado pela medida do espalhamento dinâmico de luz (DLS). A figura 41 mostra que o raio hidrodinâmico da amostra contendo GNR puro é 9 nm, o GNR ligado ao LA 61 nm, já raio hidrodinâmico do nanocomplexo contendo GNR, LA e ZIKV-E aumenta consideravelmente para 1467 nm, indicando a presença de moléculas adsorvidas na superfície dos nanobastões, e portanto, confirmando a ligação desejada.

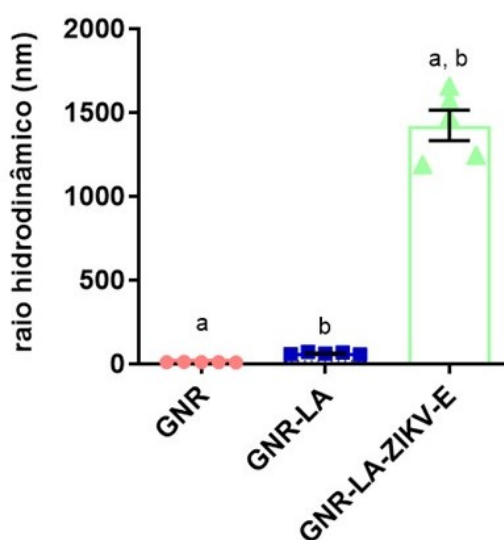


Figura 41. Medida do raio hidrodinâmico. Medida do Raio hidrodinâmico da ferramenta GNR-LA-ZIKV-E indicando a formação da ferramenta GNR-ZIKV-E. Os resultados foram lidos em um analisador de tamanho de partículas Litesizer 500 tipo BM10 e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Tukey, onde as letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a variável avaliada com $p < 0.0001$.

5.4.2.3 Marcação fluorométrica

Por fim, foi realizada a caracterização da ferramenta GNR-ZIKV-E por marcação fluorométrica, que também fornece uma ferramenta útil para caracterizar a funcionalização de GNPs (Andrade et al., 2020). Para tal, a solução contendo GNR-ZIKV-E foi ligada ao anticorpo monoclonal específico de Flavivirus (4G2). Após a ligação, a solução foi bloqueada com albumina de soro bovino (BSA). Em seguida, as moléculas não ligadas e livres disponíveis no meio foram removidas por centrifugação. Por fim, a ferramenta GNR-ZIKV-E foi marcada com anticorpo anti-mouse conjugado a Fitec, um anticorpo secundário fluorescente e medida por espectroscopia fluorométrica, indicando a formação eficiente da ferramenta GNR-ZIKV-E,

evidenciado pelo forte sinal emitido em contraste com a ferramenta não marcada com anticorpo secundário. Como os anticorpos primários não ligados foram bloqueados com BSA 1%, apenas GNR-ZIKV-E foi marcado com Fitc. Juntos, esses resultados mostram a funcionalização da proteína do envelope à superfície do GNR (figura 42).

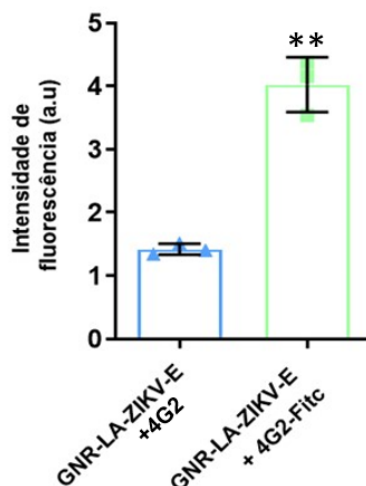


Figura 42. Medida da fluorescência da ferramenta GNR-ZIKV-E após marcação com FITC. Marcação fluorométrica da ferramenta GNR-LA-ZIKV-E ligada ao anticorpo 4g2, não marcada e marcada com o anticorpo secundário Fitc, indicando a formação da ferramenta GNR-ZIKV-E. Os resultados foram lidos em Varioskan Flash spectral scanning multimode reader e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste T, com diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a variável avaliada e $p < 0.05$.

5.5 Análise da resposta imune frente à imunização com a vacina experimental GNR-ZIKV-E

Os animais foram vacinados em regime dose/reforço/reforço, onde juntamente com as vacinas experimentais compostas pela proteína recombinante produzida (ZIKV-E) e pelos nanobastões funcionalizados com ZIKV-E (GNR-ZIKV-E) foram testadas duas combinações de adjuvantes: monofosforil A lipídio (análogo de LPS) acrescido de 7DW8-5 (análogo α -GalCer) e alúmen (30% v/v). A caracterização da resposta imune celular frente à imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante ZIKV-E, com os GNR comerciais e a vacina experimental ZIKV-E-GNR completa foi avaliada *ex vivo* pela 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.

5.5.1 Análise da resposta imune celular

As células provenientes do baço dos animais imunizados foram tratadas com tampão amônio-cloro-potássio e cultivadas em microplacas de 96 poços com estímulo de 10 µg/mL de ZIKV-E. Após estímulo de 18 horas, as células foram marcadas para receptores de superfície e citocinas intracitoplasmáticas e analisadas em citômetro de fluxo. Para avaliação da resposta celular, primeiramente foram selecionados linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que expressam o marcador precoce de ativação de linfócitos CD69.

Os esplenócitos dos animais imunizados com as vacinas experimentais compostas por: ZIKV-E + α (grupo 2) e ZIKV-E + GNR + α (grupo 6), apresentaram expressão positiva de CD69 pelas células T CD4⁺ e CD8⁺. Como pode ser observado pela razão geométrica apresentada na figura 43, onde as razões entre os esplenócitos de animais que foram estimulados com ZIKV-E e de esplenócitos de animais pertencentes ao grupo controle (PBS) estimulados com ZIKV-E possui valor superior à 1, indicando estado de ativação destas células após o estímulo realizado.

Nessa abordagem de avaliação, foi observado que o estado de ativação de células T CD8⁺ das células de animais imunizados com as vacinas experimentais associadas a combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5 (grupos 2, 4 e 6) é superior quando comparadas às células de animais imunizados com as respectivas vacinas experimentais associadas ao adjuvante alúmen (grupos 3, 5 e 7). E esse aumento é estatisticamente significativo.

As células do baço dos animais imunizados também foram avaliadas para a produção de IFN- γ . As células T CD4⁺ estimuladas apresentaram expressão de IFN- γ baixa ou ausente (figura 44), com um aumento discreto na média dos grupos 2, 4, 5 e 6. Aumento esse relacionado a produção de IFN- γ por um ou dois animais pertencentes a cada grupo vacinal. As células T CD8⁺ por sua vez apresentaram um aumento moderado na porcentagem de IFN- γ pelos animais dos grupos 2, 6 e 7. Esses grupos correspondem a animais imunizados com as vacinas experimentais: ZIKV-E + α (grupo 2), ZIKV-E + GNR + α (grupo 6), e por último ZIKV-E + GNR + al (grupo 7). Nos grupos citados, embora tenha sido observada uma tendência ao aumento da produção dessa citocina, esse aumento não foi estatisticamente significativo.

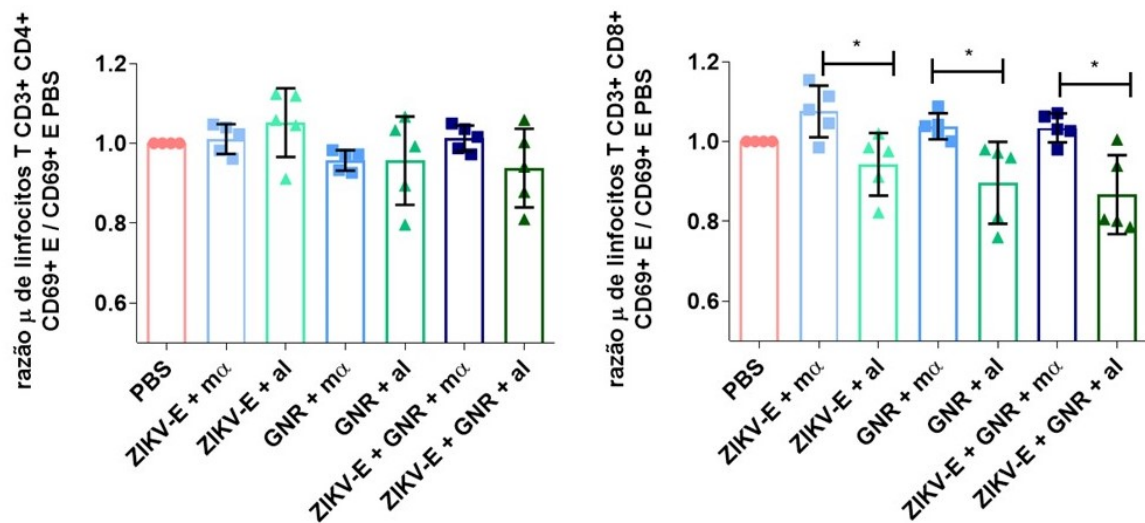


Figura 43. Ativação de linfócitos TCD4+ CD69+ e TCD8+ CD69+ de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. a) razão entre culturas estimuladas com ZIKV-E e média das culturas de animais PBS estimuladas de linfócitos TCD3+ CD4+ com expressão de CD69+ e b) razão entre culturas estimuladas com ZIKV-E e média das culturas de animais PBS estimuladas, de linfócitos TCD3+ CD8+ com fenótipo CD69+. Camundongos BALB/c foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a expressão de CD69 foi avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10 µg/mL de ZIKV-E e dosada por Citometria de fluxo. Os resultados foram lidos em Citometro de fluxo e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, para o qual (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a variável avaliada com $p < 0.05$. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, mα= combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alúmen.

As células do baço dos animais imunizados também foram avaliadas para a produção de IFN- γ . As células T CD4+ estimuladas apresentaram expressão de IFN- γ baixa ou ausente (figura 44), com um aumento discreto na média dos grupos 2, 4, 5 e 6. Aumento esse relacionado a produção de IFN- γ por um ou dois animais pertencentes a cada grupo vacinal. As células T CD8+ por sua vez apresentaram um aumento moderado na porcentagem de IFN- γ pelos animais dos grupos 2, 6 e 7. Esses grupos correspondem a animais imunizados com as vacinas experimentais: ZIKV-E + mα (grupo 2), ZIKV-E + GNR + mα (grupo 6), e por último ZIKV-E + GNR + al (grupo 7). Nos grupos citados, embora tenha sido observada uma tendência ao aumento da produção dessa citocina, esse aumento não foi estatisticamente significativo.

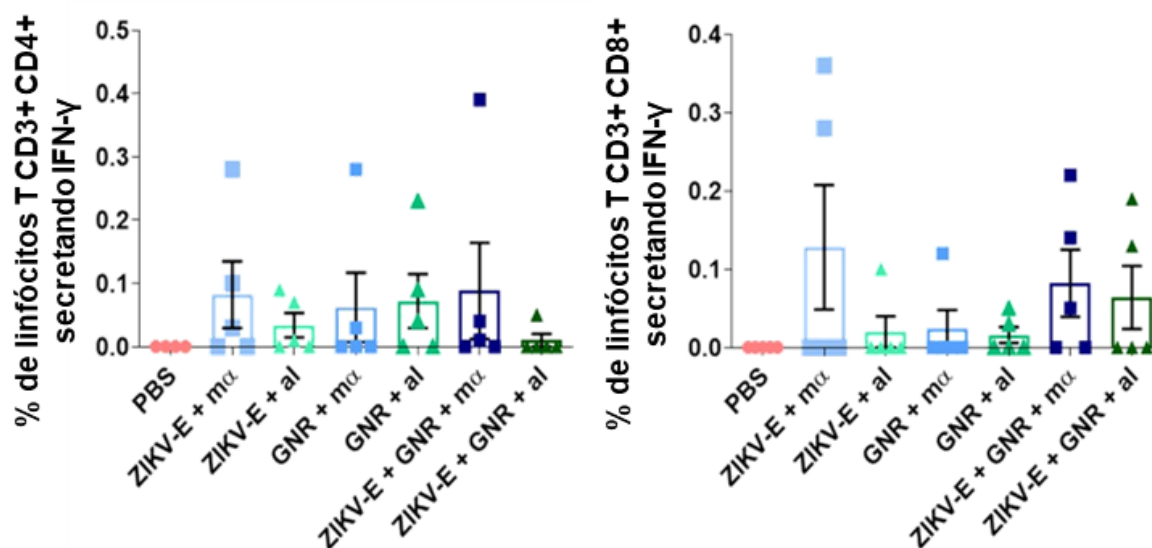


Figura 44. Dosagem de IFN- γ secretados por linfócitos TCD4+ e TCD8+ de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. a) % de linfócitos TCD3+ CD4+ com expressão de citocinas IFN- γ e b) % de linfócitos TCD8+ com expressão de citocinas IFN- γ . Camundongos BALB/c foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a produção de IFN- γ foi avaliada in vitro por cultura de esplenócitos estimulados com 10 μ g/mL de ZIKV-E e dosada por Citometria de fluxo. Os resultados foram lidos em Citometro de fluxo e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a citocina avaliada. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, m α = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alumínio

Posteriormente, foi dosada a produção de IFN- γ por linfócitos TCD8+ com marcador de superfície CD107a dos camundongos imunizados. Os animais imunizados com as vacinas 15 experimentais composta por ZIKV-E combinada com os adjuvantes m α (MPLA e 7DW8-5) (grupos 2 e 6) apresentaram a maior produção dessa citocina. Entretanto, apenas o grupo imunizado com a vacina experimental composta por ZIKV-E + GNR + m α (grupo 6) apresentou um aumento estatisticamente significativo da produção de IFN- γ dentre todos as vacinas experimentais avaliadas (figura 45).

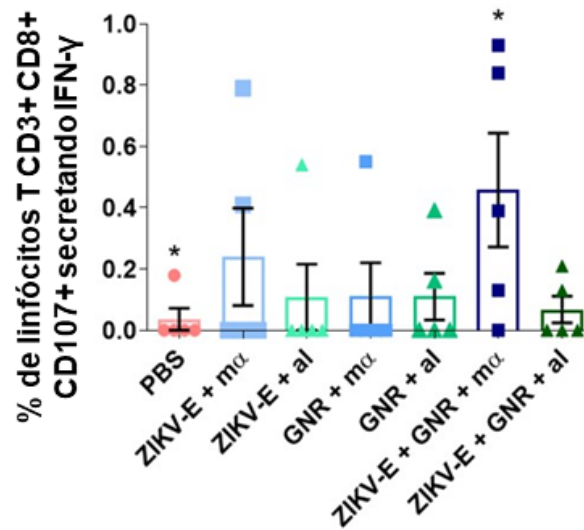


Figura 45. Dosagem de IFN- γ secretados por linfócitos TCD8+ com marcador de superfície CD107a de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. Porcentagem de linfócitos TCD3+ CD8+ com marcador de superfície CD107a com expressão de citocinas IFN- γ . Camundongos BALB/c foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a produção de IFN- γ foi avaliada in vitro por cultura de esplenócitos estimulados com 10 μ g / mL de ZIKV-E e dosada por Citometria de fluxo. Os resultados foram lidos em Citometro de fluxo e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, para o qual (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a variável avaliada com $p < 0.05$. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, m α = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alúmen.

5.5.2 Avaliação da resposta de memória de células T

Em seguida, avaliamos as porcentagens de subconjuntos de células T que expressam marcadores de memória (CD44 e CD62L). Os subconjuntos de células T CD44- CD62L-/+ , CD44+ CD62L+ e CD44+ CD62L- definidos como células de memória “naive”, células de memória central e células de memória efetora, respectivamente e são demonstrados na figura 46.

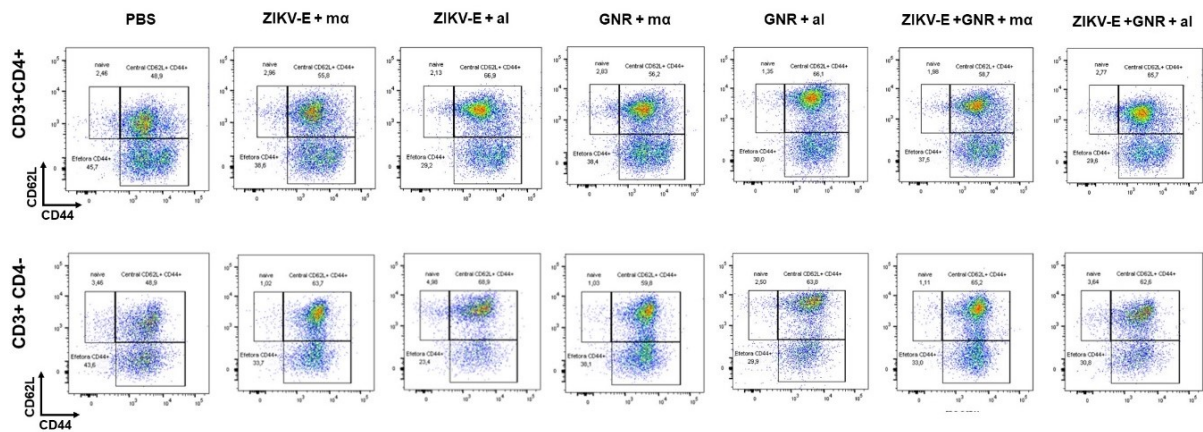


Figura 46. Fenótipo de memória representativos de células T de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. a) fenótipo de memória de células T CD4+, b) fenótipo de memória de células T CD4-. As células T (linfócitos) foram selecionadas por FSC versus SSC. Em seguida, as células T foram selecionadas por CD3 versus SSC, seguido por CD4 versus CD3. Células T CD4 + versus CD3 + foram avaliadas para expressão de CD62L versus CD44. Os subconjuntos CD44 - / +, CD44 + CD62L + e CD44 + CD62L- foram definidos como células T CD4 + e CD8 + *naives*, de memória central e memória efetora, respectivamente. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, mα= combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alumínio.

As porcentagens de cada um desses subconjuntos que expressam marcadores de memória (CD44 e CD62L) foram avaliadas por Citometria de fluxo e estão representadas na figura 47. A partir dos dados apresentados, é possível observar, em ambas populações uma predominância da população de células de memória central (CD62L+, CD44+), seguida da população de memória efetora (CD44+).

Em relação as subpopulações celulares, foi possível observar que nos camundongos imunizados com a combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5 (grupos 2, 4 e 6), as porcentagens de células T CD3+/CD4- “*naives*” diminui de maneira acentuada, com diferença estatisticamente significativa desses grupos, em relação ao grupo controle (grupo 1). Por sua vez, as subpopulações de memória central CD3+/CD4- aumenta, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Nos grupos 3 e 7 por sua vez, referentes aos animais imunizados com as vacinas experimentais compostas respectivamente por ZIKV-E + alumínio e ZIKV-E + GNR + alumínio, as porcentagens de células T, tanto CD3+/CD4+ quanto CD3+/CD4- de “memória efetora” tem uma redução com diferença estatisticamente significativa desses grupos, em relação ao grupo controle (grupo 1). Por sua vez, as células CD3+/CD4+ quanto CD3+/CD4- de “memória central” tem um aumento, também estatisticamente significativo, em relação ao grupo controle.

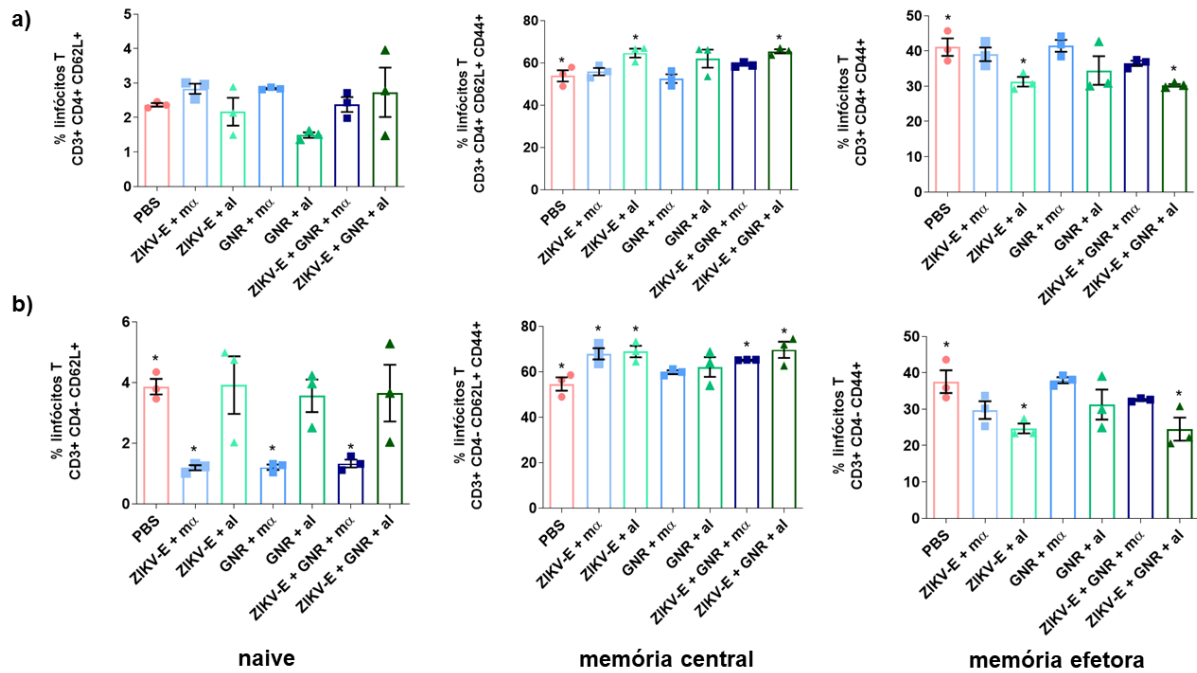


Figura 47. Fenótipos de memória de células T CD4+ e CD4- de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. a) fenótipo de memória de células T CD4+ e b) células T CD4- definidas como células *naive*, células de memória central e células de memória efetora. Camundongos BALB/c foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a produção de IFN- γ foi avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10 μ g / mL de ZIKV-E e dosada por Citometria de fluxo. Os subconjuntos CD4 - CD62L - / +, CD44 + CD62L + e CD44 + CD62L - foram definidos como células T CD4 + e CD4 - *naives*, de memória central e memória efetora, respectivamente. Os resultados foram lidos em Citometro de fluxo e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, para o qual (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a variável avaliada com $p < 0.05$. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, m α = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alumínio.

Na sequência, as subpopulações de células de memória central e memória efetora foram avaliadas pela capacidade de produção da citocina TNF- α . Na figura 48a é possível observar que todas as vacinas experimentais testadas com fenótipo T CD3+ CD4+ de memória central e efetora induziram a secreção de TNF- α após estimulação, em níveis variados nos grupos vacinais testados, indicando secreção não específica dessa citocina. Na figura 48b é possível observar que a secreção dessa citocina foi baixa ou ausente nas populações de células com fenótipo de memória central, em todos os grupos vacinais analisados. Entretanto, a secreção de TNF- α nas células com fenótipo de memória efetora, mostrou diferença estatisticamente significativa, entre o grupo imunizado com a vacina experimental composta por ZIKV-E + m α (grupo 6) e o grupo controle (grupo 1). A secreção dessa citocina também foi observada no grupo imunizado com a vacina experimental composta por ZIKV-E + GNR + alumínio (grupo 7), embora sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

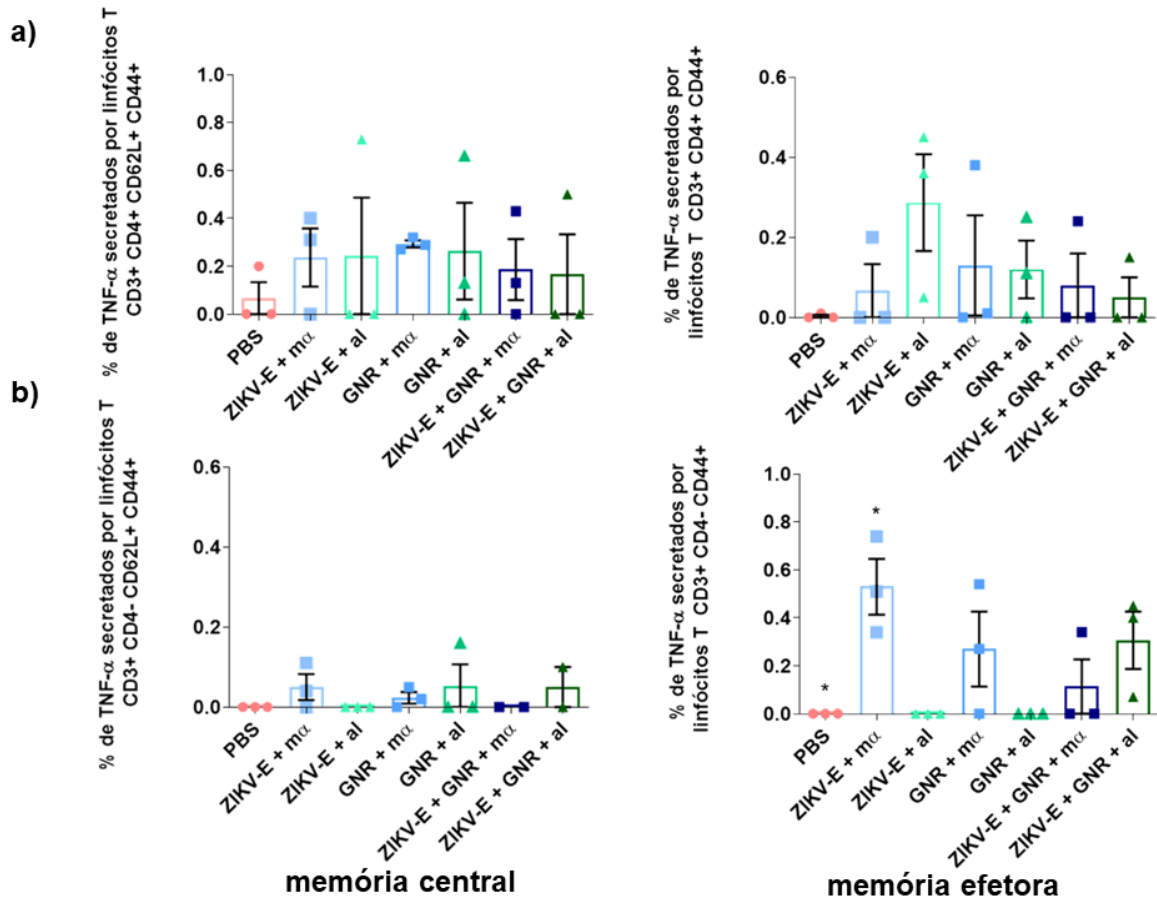


Figura 48. Análise de TNF- α secretados por células T CD3+ CD4+ e CD3+ CD4- com fenótipo de memória central e efetora de camundongos BALB/c imunizados após estimulação com ZIKV-E. a) porcentagem de células T CD4+ e b) células T CD4- definidas como células de memória central e células de memória efetora com marcador CD127. Camundongos BALB/c foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a produção de IFN- γ foi avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10 μ g/mL de ZIKV-E e dosada por Citometria de fluxo. Os subconjuntos CD44 + CD62L + e CD44 + CD62L- foram definidos como células T CD4 + e CD4 - de memória central e memória efetora, respectivamente. Os resultados foram lidos em Citometro de fluxo e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, para o qual (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a variável avaliada com $p < 0.05$. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, m α = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alúmen.

Por fim, as subpopulações de células de memória central e memória efetora foram avaliadas pela expressão do marcador de memória CD127 (figura 49). Para o marcador de memória CD127, é possível observar um aumento da expressão desse marcador nos grupos experimentais imunizados com as vacinas compostas por ZIKV-E + al, ZIKV-E + GNR + m α e ZIKV-E + GNR + al, embora em níveis variados (figura 48). Entretanto, um aumento estatisticamente significativo é observado apenas no grupo imunizado com a vacina experimental composta por ZIKV-E + al na população CD3+ CD4- com fenótipo de memória efetora, e no grupo imunizado com a vacina experimental composta por ZIKV-E + GNR + al, nas populações CD3+ CD4+ com fenótipo de memória efetora e CD3+ CD4- com fenótipo de memória central.

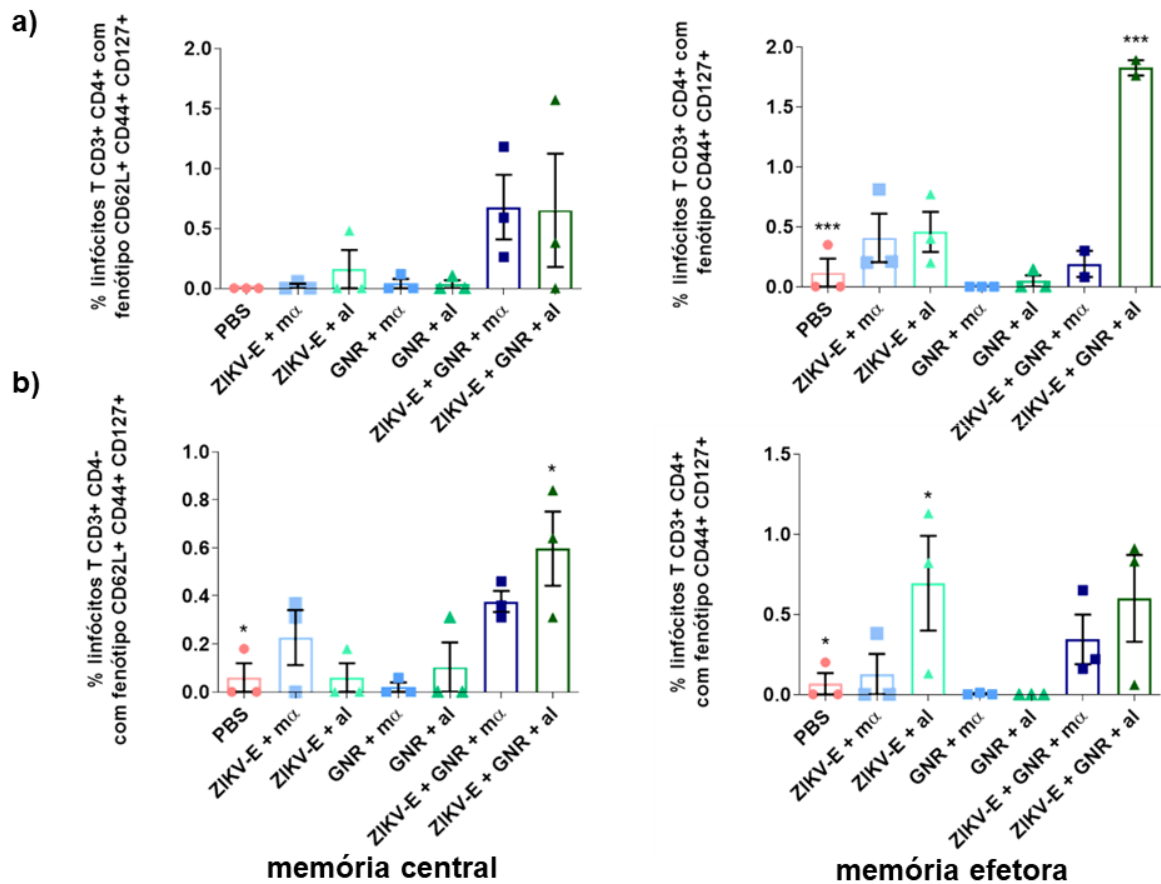


Figura 49. Avaliação de células T CD3+ CD4+ e CD3+ CD4- de camundongos BALB/c com fenótipo de memória central e efetora com marcador de memória CD127. a) porcentagem de células T CD4+ e b) células T CD4- definidas como células de memória central e células de memória efetora com marcador CD127. Camundongos BALB/c foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço a produção de IFN- γ foi avaliada *in vitro* por cultura de esplenócitos estimulados com 10 μ g / mL de ZIKV-E e dosada por Citometria de fluxo. Os subconjuntos CD44 + CD62L + e CD44 + CD62L- foram definidos como células T CD4 + e CD4 - de memória central e memoria efetora, respectivamente. Os resultados foram lidos em Citometro de fluxo e a análise estatística realizada no software GraphPad Prism, 7, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett, para o qual (*) e (***) indicam diferença estatisticamente significativa entre as amostras para a variável avaliada com $p < 0.05$ e $p < 0.0001$, respectivamente. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, m α = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alumínio.

5.5.3 Análise da Resposta Imune Humoral por Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)

A técnica de ELISA foi utilizada para mensurar a produção de anticorpos contra a proteína ZIKV-E. Para tal, um protocolo de ELISA indireto foi previamente padronizado em nosso laboratório afim de determinar uma melhor concentração de ZIKV-E na etapa de sensibilização, bem como a diluição dos soros dos camundongos e a titulação do anticorpo secundário anti-IgG.

Na figura 50 é possível observar que, conforme esperado, os animais inoculados apenas com solução salina (PBS) e com as nanopartículas combinadas com os adjuvantes (GNR + $m\alpha$ e GNR + al), não apresentaram títulos de anticorpos detectáveis. Por sua vez, os grupos imunizados com as vacinas experimentais, compostas por ZIKV-E associada aos adjuvantes vacinais testados ZIKV-E- $m\alpha$ e ZIKV-E-al (grupos 2 e 3), produziram as maiores doses de anticorpos IgG anti-ZIKV. Os animais pertencentes aos grupos imunizados com as vacinas experimentais compostas pelos nanobastões funcionalizados com a ZIKV-E e associadas aos adjuvantes testados ZIKV-E-GNR- $m\alpha$ e ZIKV-E-GNR-al (grupos 6 e 7), também produziram anticorpos contra o ZIKV, embora os títulos de anticorpos detectados nesses testes tenham sido menores, quando comparados aos grupos 2 e 3.

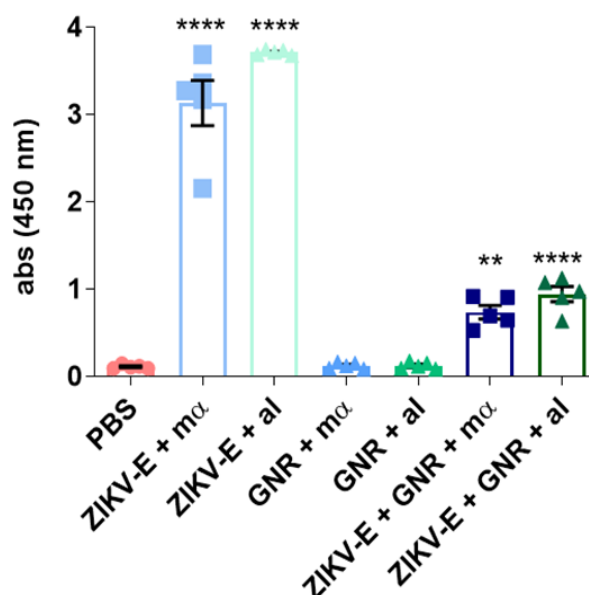


Figura 50. Resultados do ELISA anti-IgG ZIKV-E com soros dos animais imunizados. Camundongos BALB/c foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço o sangue dos animais foi testado por ELISA. Os soros dos animais imunizados com ZIKV-E apresentaram títulos de anticorpos detectáveis, e são significativos em relação aos animais dos grupos PBS e GNR + $m\alpha$ e GNR + al. Análise estatística feita no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett's, com diferença estatisticamente significativa na variável avaliada, onde (**) = $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, $m\alpha$ = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alumínio.

5.5.4 Análise da Resposta Imune Humoral por Teste de redução de placas por neutralização (PRNT)

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 fica neutralizada, deixando de ser infecciosa. Nessa 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 infectivo e o efeito citopático é observado nas células. Portanto, o 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 (Kroon et al., 2016).

Na figura 51 é possível observar que, conforme esperado, os soros dos animais inoculados apenas com solução salina (PBS) e com as nanopartículas combinadas com os adjuvantes (GNR + α e GNR + al), não foram capazes de neutralizar o vírus em nenhuma das diluições testadas. Por outro lado, os soros dos animais imunizados com ZIKV-E foram capazes de neutralizar o vírus em diluições séricas de até 1/80. Dentre os grupos vacinais, os soros dos animais imunizados com ZIKV-E-al e ZIKV-E-GNR-al foram os grupos com menor desempenho no teste, uma vez que os soros não foram capazes de neutralizar 70% do vírus inoculados, mesmo na menor diluição do soro testada (1/10) (figura 51). Em contrapartida, é notável a maior produção de anticorpos nos soros dos animais imunizados com a proteína recombinante combinada com os adjuvantes α (ZIKV-E- α e ZIKV-E-GNR- α). Em relação à este último imunizante, ainda é possível observar que mesmo na maior diluição do soro, este é capaz de neutralizar 70% das unidades de ZIKV presentes (figuras 51d).

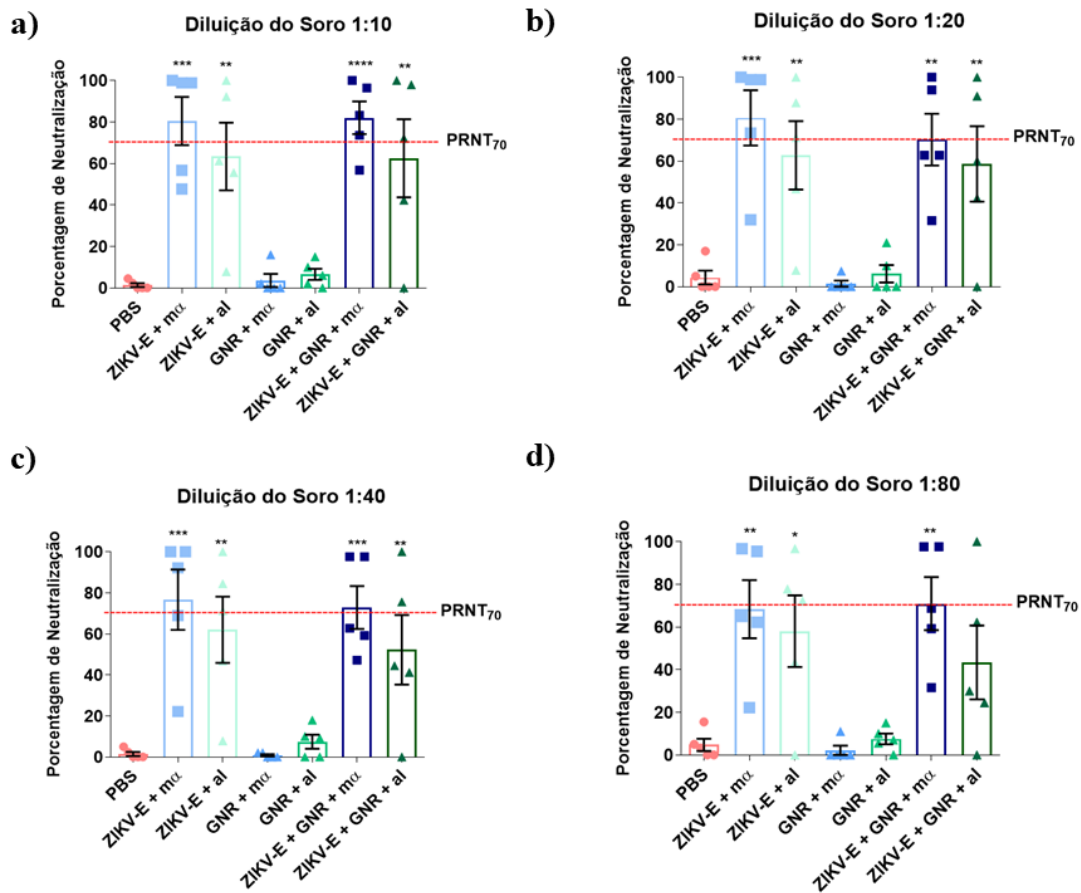




Figura 51. Resultados do Teste de Redução de Placas por Neutralização (PRNT) com soros dos animais imunizados. Camundongos BALB/c foram imunizados em regime de dose-reforço-reforço e 14 dias após o último reforço, o sangue dos animais foi testado por PRNT. Os soros dos animais imunizados com ZIKV-E apresentaram anticorpos capazes de neutralizar o ZIKV e são significativos em relação aos animais dos grupos PBS e GNR + mα e GNR + al. A análise estatística foi feita no software GraphPad Prism 8, utilizando o teste One-way ANOVA e pós-teste de Dunnett's, com diferença estatisticamente significativa na variável avaliada, onde (**) = $p < 0,01$ (***) = $p < 0,001$ e (****) = $p < 0,0001$. Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, mα= combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alumínio.

A tabela 7 apresenta o resumo da avaliação da resposta imune das vacinas experimentais contra o ZIKV avaliadas no presente trabalho, onde as respostas imunes celulares e humorais obtidas com diferença estatisticamente significativa são detalhadas. O símbolo + representa a diferença estatística encontrada, sendo (+) = $p < 0,05$ (++) = $p < 0,01$, (+++) = $p < 0,001$ e (++++) = $p < 0,0001$.

Tabela 7. Resumo da avaliação da resposta imune de camundongos Balb/c imunizados com ZIKV-E

	ZIKV-E + m α	ZIKV-E + al	ZIKV-E + GNR + m α	ZIKV-E + GNR + al	
	CD8+ CD69+	+		+	
	IFN- γ +			+	
	CD44+ CD62L+	+	+	+	+
	TNF- α +	+			
	CD127+		+		+++
	Ig anti-ZIKV-E Elisa	++++	++++	++	++++
	Ig anti-ZIKV PRNT	+++	++	+++	++

Onde: ZIKV-E= proteína recombinante produzida, GNR= nanobastão de ouro comerciais Nanopartz, m α = combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5, al= alúmen. O símbolo + representa a diferença estatística no ensaio realizado, onde (+) = p< 0,05, (++) = p< 0,01, (+++) p<0.001 e (++++) p<0.0001.

6. Discussão

Os vírus transmitidos por artrópodes (arbovirus) contribuem significativamente para a mortalidade global e a morbidade em humanos e animais e por isso tornaram-se uma ameaça séria e significativa à saúde humana e animal devido à aglomeração urbana, mobilidade internacional e falta de programas eficientes de controle de vetores (Round et al., 2017). Possuindo grande carga sanitária e socioeconômica para países localizados principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Dentre os arbovírus que contribuem significativamente para surtos de doenças e epidemias em populações humanas e animais estão os flavivírus, como o vírus da dengue (DENV), o vírus zika (ZIKV) e o vírus da febre amarela (YFV) (Araujo et al., 2020, Gomez et al., 2022).

Atualmente, o DENV infecta cerca de 390 milhões de pessoas anualmente. O surto de ZIKV na última década alarmou o mundo devido à síndrome congênita do Zika. Apesar da existência de uma vacina potente, o YFV reemergiu como uma ameaça à saúde pública nos últimos anos. Fatores como mudanças climáticas, aumento da migração humana e disseminação de vetores de mosquitos levantaram preocupações sobre a introdução desses vírus em novos ambientes (Araujo et al., 2020, Gomez et al., 2022).

Além disso, os recentes surtos de diversas doenças infecciosas enfatizaram a necessidade social para o rápido desenvolvimento das vacinas. Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde selecionou nove doenças prioritárias que são projetadas para causar o maior risco à saúde pública e anunciou que a pesquisa e o desenvolvimento devem ser acompanhados intensamente para estarem preparados para futuros surtos, dentre as quais está a febre causada pelo ZIKV (Kim et al., 2021). Portanto, é urgente o desenvolvimento de novas vacinas e/ou novas técnicas de fabricação para produzir rapidamente grandes quantidades de antígenos desse vírus.

Alguns dos aspectos importantes de qualquer vacina ideal incluem segurança, estabilidade e a capacidade de obter resposta imune durável e adequada com um número mínimo de doses (Pati et al., 2018). Os recentes avanços na vacinação levaram ao desenvolvimento de vacinas de subunidades, em substituição às vacinas tradicionais atenuadas ou inativadas, afim de facilitar e acelerar a fabricação e maximizar a segurança (Laliberté-Gagné et al., 2019).

Entretanto, como citado anteriormente, uma desvantagem dessa estratégia é que normalmente as vacinas de subunidades apresentam uma menor imunogenicidade, necessitando de múltiplas doses necessárias para atingir uma resposta imune protetora (Laliberté-Gagné et

al., 2019). Com a finalidade de minimizar esse problema, a combinação de adjuvantes e novos sistemas de entrega que impulsionam a imunogenicidade são cada vez mais necessários à medida que avançamos para a era das vacinas modernas, de forma a aumentar tanto a imunogenicidade do antígeno quanto a sua estabilidade (Zhao et al., 2014).

Nesse contexto, o potencial uso de nanopartículas (NPs) como carreadores vacinais tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas. As NPs, devido à sua semelhança de tamanho com os componentes celulares, podem entrar em células vivas usando o mecanismo de endocitose celular (Zhao et al., 2014). A inclusão de NPs nas formulações vacinais tem sido relatada para aumentar a estabilidade do antígeno, promover sua entrega direcionada, e ajudar na liberação lenta do antígeno, buscando eliminar a necessidade de doses adicionais (Versiani et al., 2016, Khalaj-Hedayati et al., 2019). Para melhorar a eficácia da vacina, essas NPs devem proteger os antígenos da degradação proteolítica prematura, facilitar a absorção e o processamento de antígenos por células, além de serem seguros para o uso humano (Pati et al., 2018).

O uso de NPs como base terapêutica é aplicada principalmente para o tratamento do câncer, e é cada vez mais explorada para tratar outras doenças como Alzheimer, hipertensão e doenças hepáticas. Por outro lado, de forma profilática, as NPs têm sido aplicadas em vacinas para a prevenção de diferentes doenças como câncer e a covid-19, onde uma série de nanoplataformas vem aprovadas para uso humano e/ou estão em ensaios clínicos ou pré-clínicos (Mitchell et al., 2020).

Nosso grupo de pesquisa vem acumulando resultados importantes envolvendo NPs funcionalizadas com proteínas recombinantes, em candidatos vacinais e novas plataformas diagnósticas para DENV, ZIKV e SARS-CoV-2. No presente manuscrito, nossa proposta de associação da proteína do envelope de ZIKV a nanobastões de ouro comerciais, se apresentou como uma estratégia importante na geração dos dados aqui apresentados.

O presente trabalho se iniciou com a construção *in silico* da proteína recombinante, etapa esta realizada em colaboração com Flávia Fonseca Bagno, em sua dissertação de mestrado. Entretanto, por se tratar de uma etapa consideravelmente importante para o desenvolvimento subsequente deste trabalho, os resultados obtidos na construção *in silico* de ZIKV-E foram brevemente apresentados. Assim, foram apresentadas a construção e modelagem do gene correspondente a ZIKV-E. Além disso, foram realizadas análises de hidrofobicidade, remoção da porção transmembrana da proteína, otimização de códon e ensaios adicionais de predição de

epítomos e verificação do potencial antigênico, os quais indicaram a possibilidade da utilização da proteína recombinante construída como vacina experimental para ZIKV.

As etapas descritas envolvidas na padronização da produção de ZIKV-E foram realizadas no Centro de Tecnologias de Vacinas da UFMG, localizado no Parque Tecnológico de Belo Horizonte (BH-Tec). Para obtenção da proteína ZIKV-E foi utilizado sistema de expressão procarioto, onde o gene sintético foi clonado em vetor de expressão pET-21a e expresso em *E. coli* BL21. Nas últimas décadas, a *E. coli* provou ser um hospedeiro atraente para expressão e purificação de um vasto conjunto de proteínas recombinantes, por uma série de razões. Em primeiro lugar, décadas de trabalho levaram a obtenção de células bem caracterizadas e de rápido crescimento, as quais foram otimizadas para a expressão proteica, incluindo cepas específicas para produzir proteínas de membrana. Além disso, *E. coli* pode ser facilmente cultivada em uma gama de escalas permitindo que a fermentação produza grandes quantidades de proteína, embora deva ser observado que nem sempre há uma relação linear entre o volume da cultura e o rendimento do produto. Entretanto, a falta de modificações pós-traducionais, é um limitante desse sistema de expressão (Wisemam et al., 2020).

Para induzir a expressão de ZIKV-E pelo clone bacteriano foi utilizado um ativador de transcrição do operon lac, o Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um tiogalactosídeo que inibe a ação do repressor de lactose, um dos indutores mais usados em biologia molecular e biotecnologia. Primeiramente, foi realizado um processo de indução, adicionando-se 1 mM de IPTG e as bactérias foram incubadas a 37°C por 3 horas, de forma a apresentar alta taxa metabólica e expressão dos genes lac. A análise por SDS-PAGE (figura 27a) mostrou um aumento pronunciado da expressão da proteína recombinante ao se comparar o perfil de clones antes e após a indução com IPTG, indicando a eficiência do promotor utilizado.

Na sequência, foram avaliados o melhor tempo e temperatura de indução. Para tal, foram realizados dois processos de indução, sendo o primeiro realizado a 37°C por 3 horas e o segundo a 20°C *overnight* (figura 27b). Como a proteína de interesse se encontrava insolúvel em corpos de inclusão, foi ainda avaliada a menor concentração de ureia na qual ZIKV-E estaria presente na fração solúvel (figura 28). Assim, após os ensaios de padronização das condições ideais, optou-se por realizar um cultivo em maior escala com indução a 37°C por 3 horas e utilizando-se 4M de ureia para solubilizar os corpos de inclusão.

Após o cultivo em maior escala, os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão contendo ureia e a proteína recombinante foi purificada por afinidade em coluna *HisTrap*. Estas colunas são pré-empacotadas com resina de sefarose carregada com níquel, que se liga de forma

eficiente aos resíduos de histidina em condições adequadas providas pelo tampão. Para realização do presente trabalho foram necessários a produção de dois lotes de ZIKV-E, dentre os quais, a única alteração no protocolo incluiu a solubilização dos corpos de inclusão em tampão contendo 4 mol/L de ureia e 8 mol/L de ureia. Para cada lote de proteína purificada o rendimento final foi de 1,5 mg de ZIKV-E /litro de cultivo e 7,5 mg de ZIKV-E /litro de cultivo, respectivamente. Observando conforme esperado pelo teste de solubilidade (figura 28), um maior rendimento, quanto maior a concentração de ureia utilizada.

A proteína foi purificada com sucesso com tamanho de 50 kDa, correspondente ao tamanho previsto, onde o pico de purificação (figura 29) foi confirmado por SDS-Page (figura 30). Após o processo de purificação, a proteína recombinante foi submetida ao ensaio de *western blot* apresentando reatividade contra o anticorpo comercial anti-His e anti-flavivirus (figura 33), inferindo que os passos anteriores foram bem-sucedidos.

Os próximos passos no desenvolvimento deste trabalho envolveram a padronização do processo de funcionalização de Nanobastões de ouro com a proteína produzida, e a caracterização da funcionalidade desejada. Para tal, Nanobastões de ouro comerciais foram adquiridos da empresa Nanopartz™ (USA). A estratégia de funcionalização dos Nanobastões com a proteína recombinante realizada nesse trabalho se baseia na indução de uma interação covalente entre as moléculas envolvidas, para que dessa forma ao penetrar as células no organismo a ligação não se dissociasse.

Para tal, um protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório foi seguido, onde primeiramente, foi realizada a troca do surfactante (CTAB) presente na superfície dos nanobastões pelo ácido lipoico, através do aumento seguido da queda de temperatura do banho ultrassônico. Na sequência foi realizada a adição dos agentes acoplante (EDC) e estabilizante (NHS), seguida da adição da proteína recombinante (ZIKV-E). Após a adição de cada reagente foi realizada a leitura do espectro UV-Vis, onde foi possível inferir se houve ou não a ligação na superfície dos nanobastões através do deslocamento (“shift”) no espectro UV-Vis da amostra (Rodriguez-Quijada et al., 2018). Como é possível observar na figura 37 mesmo as menores concentrações de proteína apresentaram um deslocamento do espectro UV-Vis. Após o processo de padronização da ligação o sistema foi avaliado por UV-Vis, que quantificou o deslocamento (“shift”) no espectro, obtendo ao final do processo um deslocamento de 27 nm (figura 38).

Para realização dos ensaios em modelo animal foi utilizada a dose de 10 µg de GNR purificados funcionalizados com 10 µg de proteína recombinante por animal (totalizando um

volume máximo de 50 μ L). Este valor foi determinado seguindo experimentos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, onde uma vacina experimental para DENV-3 utilizando nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína do Envelope viral de DENV3 recombinante mostrou resultados promissores. Além da análise do espectro UV-Vis das amostras, foram realizados ensaios de avaliação do potencial zeta (figura 39), análise do raio hidrodinâmico (figura 40) e por fim um ensaio de fluorometria (figura 41), que confirmaram a ligação da proteína à superfície dos nanobastões.

Após a construção e caracterização da ligação desejada entre os GNR e a proteína recombinante ZIKV-E (GNR-ZIKV-E), a imunogenicidade da vacina experimental foi avaliada em modelo animal, utilizando camundongos da linhagem BALB/c. Nosso protocolo de imunização dose – reforço – reforço com um intervalo de 14 dias entre os reforços, foi estabelecido através de estudos previamente realizados em nosso laboratório, no qual o regime de imunização foi suficiente para gerar resposta celulares e humorais.

Os animais foram separados em grupo controle PBS (grupo 1: solução salina, PBS), ZIKV-E- α (grupo 2: proteína recombinante produzida associada a combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5), ZIKV-E-al (grupo 3: proteína recombinante produzida associada ao adjuvante alúmen), GNR- α (grupo 4: Nanobastões de ouro comerciais Nanopartz associados a combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5), GNR-al (grupo 5: Nanobastões de ouro comerciais Nanopartz associados ao adjuvante alúmen), ZIKV-E-GNR- α (grupo 6: Nanobastões de ouro comerciais Nanopartz funcionalizados com a proteína recombinante produzida, associados a combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5), ZIKV-E-GNR-al (grupo 7: Nanobastões de ouro comerciais Nanopartz funcionalizados com a proteína recombinante produzida, associados ao adjuvante alúmen).

A análise de resposta celular foi realizada por Citometria de fluxo. Este teste foi realizado com esplenócitos estimulados com a proteína ZIKV-E, por 18 horas. Este trabalho utilizou como controle positivo o mitógeno concanavalina A (ConA), uma lectina com poderosa atividade mitogênica para células T, que tem sido usada em diferentes modelos experimentais de pesquisa devido à sua capacidade de modular a resposta imune contra diversas infecções (Zanluqui et al., 2020).

No contexto das infecções virais as respostas das células T representam um aspecto crucial da resposta imune. As células T auxiliares CD4⁺ são de grande importância para o sistema imunológico. Após o contato com células apresentadoras de antígeno (APC) e vinculação a moléculas do complexo histocompatibilidade celular, as células T CD4⁺ se

transformam de um estado de repouso para expansão clonal e são diferenciadas em diferentes subtipos celulares após estimulação (Trinchieri, 2003, Trinchieri et al., 2003). As células T CD8 (chamadas também de células T citotóxicas) 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 reininfecção e proporcionar maior proteção (Pardy & Richer, 2019).

Um dos importantes reguladores de respostas imunológicas é o CD69. O CD69 é um marcador clássico precoce de ativação de linfócitos devido a seu rápido surgimento na superfície da membrana plasmática após a estimulação, possuindo valor intrínseco como marcador de ativação celular. O CD69 é expresso por vários subconjuntos de células imunes residentes em tecidos. Especificamente, o CD69 regula a diferenciação das células T (Treg) regulatórias, bem como a secreção de IFN- γ , IL-17 e IL-22 (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017).

Neste trabalho, foi observado que o estado de ativação de células T CD8⁺ das células de animais imunizados com as vacinas experimentais associadas aos adjuvantes α (combinação de adjuvantes MPLA e 7DW8-5) é superior quando comparadas às células de animais imunizados com as respectivas vacinas experimentais associadas ao adjuvante alumínio, indicando um maior estado de ativação das células dos animais dos grupos 2 (ZIKV-E- α), 4 (GNR- α) e 6 (ZIKV-E-GNR- α) após o estímulo realizado.

Uma das principais citocinas pró-inflamatórias que inicia sinais e ativa a diferenciação das células T é o interferon gama (IFN- γ). Os interferons (IFN) desempenham um papel crucial na promoção da ativação das células T CD4 e T CD8 e são particularmente importantes para 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 importância dos IFN na resposta imune não se deve apenas à sua atividade antiviral, mas também à sua capacidade de regular as funções das células da imunidade inata e adaptativa. Em particular, o IFN- γ é um potente ativador das funções antimicrobianas dos fagócitos, e tem um papel essencial na resistência a muitas bactérias patogênicas, fungos e parasitas intracelulares. Embora o IFN- γ tenha sido considerado originalmente um produto de células T específicas de antígenos, durante as respostas inatas, é produzido principalmente por células natural killer NK e pela ativação de subconjuntos específicos de células T, incluindo células NKT, células T CD8 e células expressando receptores de células T (TCR). Macrófagos, células

dendríticas (DC) e células B também podem produzir grandes quantidades de IFN- γ (Trinchieri, 2003).

No presente trabalho, as vacinas experimentais compostas por ZIKV-E- $m\alpha$ (grupo 2) e ZIKV-E-GNR- $m\alpha$ (grupo 6) foram capazes de gerar a ativação de células T CD4+ e T CD8+ de camundongos BALB/c, com capacidade produzir IFN- γ (figura 43). Além disso, as mesmas vacinas experimentais citadas se mostraram capazes de ativar células T CD8+ CD107+. Entretanto, apenas as esplenócitos dos animais imunizados com a vacina experimental composta por ZIKV-E-GNR- $m\alpha$ (grupo 6) teve um aumento dessa citocina de forma estatisticamente significativa (figura 44).

A expressão de CD107 na superfície celular é um importante marcador de ativação de células imunes. Este foi descrito como um marcador de degranulação de células T citotóxicas (CD8+) e mostrou-se fortemente regulada na superfície celular após a estimulação. O marcador CD107 se correlaciona fortemente com a secreção de citocinas, significativamente associada à IFN- γ , e a lise mediada por células NK das células-alvo, demonstrando que este marcador é uma ferramenta útil para avaliar o nível de atividade celular (Alter et al., 2004).

Em seguida, avaliamos o fenótipo de memória apresentado pelas células T através das porcentagens de subconjuntos de células que expressam marcadores de memória (CD44 e CD62L). Os subconjuntos de células T foram chamados de células de memória “*naïves*” (CD44- CD62L-/+) , células de memória central (CD44+ CD62L+) e células de memória efetora (CD44+ CD62L-). Foi observado uma grande variação de fenótipo nas células T CD4- dos animais imunizados com as vacinas experimentais associadas a combinação de adjuvantes $m\alpha$ (MPLA e 7DW8-5) (figura 46). Os resultados demonstram que o MPLA combinado com 7DW8-5 potencializa a resposta de memória central, aumentando os níveis de respostas específicas de células T CD4 -, confirmando o potencial efeito dessa combinação de adjuvantes. A mesma modulação de resposta de memória foi observada por Coelho-dos-Reis e colaboradores (2016), em uma vacina experimental contra malária e câncer baseada em peptídeos associados a MPLA e 7DW8-5.

Na sequência avaliamos a secreção de fator de necrose tumoral (TNF- α) pelas subpopulações de células de memória após o estímulo realizado. TNF- α é uma citocina inflamatória produzida por macrófagos/monócitos durante a inflamação aguda e é responsável por uma variedade diversificada de eventos de sinalização dentro das células, levando à necrose ou apoptose (Idriss et al, 2000). A proteína também é importante para a resistência a infecções,

regulando o desenvolvimento do tecido linfóide e coordenando a diferenciação celular para se defender contra patógenos intracelulares (Smyth & Johnstone, 2000).

A secreção de TNF- α foi observada nas populações celulares com fenótipo de memória efetoras e centrais (nas células CD3+ CD4+) e na população com fenótipo de memória efetora (CD3+ CD4-) das vacinas experimentais testadas. Essa citocina foi secretada com diferença estatisticamente significativa apenas nas populações celulares dos animais imunizados com a vacina experimental composta por ZIKV-E + α (grupo 2) (figura 47).

Ainda, avaliamos a expressão de CD127 nas populações celulares de memória efetora e memória central. CD127 é receptor de IL-7, uma citocina-chave para manter a memória de células T CD8 a longo prazo de forma independente de antígenos. Embora o CD127 seja altamente expresso em células T CD8 “*naïves*”, sua expressão é uniformemente desregulada após a ativação durante a fase inicial de infecções bacterianas virais e intracelulares. No entanto, células T CD8 efetoras, recuperam a expressão CD127 no auge das respostas e se diferenciam em células de memória de longa duração, se tornando um marcador útil para identificar células T de memória e efetoras (Hashimoto et al., 2019).

Os resultados associados à expressão de CD127 demonstraram um aumento estatisticamente significativo nos grupos imunizados com a vacina experimental composta por ZIKV-E + α (grupo 3) na população CD3+ CD4- com fenótipo de memória efetora, e no grupo imunizado com a vacina experimental composta por ZIKV-E + GNR + α (grupo 7), nas populações CD3+ CD4+ com fenótipo de memória efetora e CD3+ CD4- com fenótipo de memória central. A expressão aumentada de CD127 mostrou-se modulada principalmente pela presença do adjuvante α nas vacinas experimentais citadas, além disso, a presença de GNR na vacina experimental aumenta ainda mais essa expressão (figura 48).

Por fim, foram realizadas as análises de resposta humoral divididas em duas técnicas: Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) e Teste de Redução de Placas por Neutralização (PRNT). O Elisa é 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. Os maiores títulos de anticorpos IgG anti ZIKV-E foram apresentados pelos animais imunizados com ZIKV-E associada apenas aos adjuvantes (grupos 2 e 3).

Na análise de anticorpos neutralizantes, o PRNT é o padrão-ouro para medição da neutralização de flavivírus, a recomendação da OMS para a análise de PRNT sugere que em áreas endêmicas de diferentes flavivírus, um PRNT₇₀ ou PRNT₉₀ é preferível ao PRNT₅₀, assim,

vários estudos recentes têm usado uma redução de 70 à 90% no título de vírus como critério para análise de anticorpos neutralizantes para o ZIKV (Hepburn et al., 2006, Johnson et al., 2009, Richner et al., 2017, Lee et al., 2018, Koishi et al., 2018, Sornjai et al., 2018, Tebas et al., 2021).

Observamos que os anticorpos presentes nos soros dos animais imunizados com ZIKV-E são capazes de neutralizar o ZIKV em todas as diluições dos soros testadas (figura 50). A neutralização observada é inversamente proporcional a diluição do soro, ou seja, quanto maior a diluição do soro, menor a neutralização das partículas virais. Os soros dos animais imunizados com as vacinas experimentais compostas por ZIKV-E- α (grupo 3) e ZIKV-E-GNR- α (grupo 6) foram os soros com a maior resposta de anticorpos neutralizantes, conferindo uma neutralização de até 70% das partículas de ZIKV na maior diluição sérica testada (1:80). Em conjunto, os ensaios com os soros dos animais imunizados com ZIKV-E-GNR- α (grupo 6) mostram que embora os títulos de anticorpos detectados no Elisa tenham sido menores, estes anticorpos são potencialmente neutralizantes.

No estudo conduzido por Versiani e colaboradores (2014), a vacina experimental composta por nanobastões de ouro funcionalizados com a proteína do envelope de DENV-3 (DENV-3E) apresentou títulos de anticorpos IgG anti-DENV e anticorpos neutralizantes significativamente superiores aos resultados do grupo contendo a proteína sem o carreador, fato não observado no presente estudo. A mesma proteína recombinante DENV-3E foi utilizada em uma vacina experimental utilizando nanotubos de carbono como carreador vacinal. Foi visto, que a imunização de camundongos induziu respostas de IgG anti-DENV3E igualmente altas para os animais imunizados com a proteína de DENV-3E e para os animais imunizados com a vacina experimental composta por nanotubos de carbono funcionalizados com DENV-3E, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos imunizados. Entretanto, a mesma vacina experimental composta por nanotubos de carbono e DENV-3E induziu um maior título de anticorpos neutralizantes quando avaliados por PRNT quando comparadas a vacina experimental sem o nanocarreador vacinal (Versiani et al., 2017).

Vale ressaltar que, a vacina experimental para DENV-3 utilizando nanobastões de ouro como carreador vacinal foi testada em camundongos C57BL/6, e em nosso trabalho, avaliamos a resposta imune em camundongos BALB/c, o uso do modelo murino é um importante viés nas características apresentadas no desenvolvimento da resposta imune. Além disso, embora se trate de proteínas do envelope de flavivírus relacionados, as proteínas virais podem apresentar potenciais imunogênicos diferentes. Não obstante, é importante notar que quando anticorpos

totais foram aferidos, as vacinas nanocarreadas em GNRs mostraram indução de títulos muito inferiores às proteínas isoladas (não-carreadas). No entanto, a adição de GNRs fez com que os títulos de anticorpos neutralizantes aumentassem e se equiparassem aos respectivos pares não carreados. Este resultado salienta o potencial dos nanocarreadores em aumentar a eficácia de produtos vacinais.

No estudo de Han e colaboradores (2017) a imunização de camundongos BALB/c com 50 µg de proteína do envelope de ZIKV recombinante produzida em *E. coli* associada a alúmen foi capaz de induzir resposta humoral específica contra ZIKV, além disso a vacina experimental conferiu proteção total contra o desafio letal em um modelo de camundongos neonatais. Indicando o potencial promissor da proteína E de ZIKV como vacina de subunidades. Vale destacar que em nossos experimentos foi utilizada 10 µg de proteína recombinante do envelope de ZIKV, e que a mesma gerou uma resposta imune mensurável. A utilização de uma menor quantidade de antígenos em formulações vacinais é uma variável de grande importância em um contexto epidêmico, onde a vacinação em massa da população é necessária.

Nos estudos realizados até o momento com plataformas vacinais de subunidade contra ZIKV, foi comprovado que vacinas de subunidade recombinante são uma opção segura e eficaz para a prevenção da infecção por ZIKV. No entanto, sua natureza menos imunogênica é a maior desvantagem, exigindo mais doses e adjuvantes apropriados (Zhou et al., 2021).

De maneira particular, neste trabalho, destaca-se a relevância do conjunto de adjuvantes testados, e sua capacidade de modular a resposta imune. Os resultados das vacinas experimentais aqui avaliadas aliadas aos adjuvantes vacinais foram consistentes com os resultados descritos em outros trabalhos. Os adjuvantes MPLA e 7DW8-5 quando coadministrados exibem um potente efeito adjuvante, capaz de promover os níveis de respostas de células T CD8⁺ específicas e imunidade humoral (Coelho-dos-Reis et al., 2016). Por outro lado, sabe-se que os adjuvantes a base de alumínio são potentes indutores de resposta humoral mediadas principalmente por anticorpos específicos para o antígeno (He et al., 2015, Danielsson & Eriksson, 2021).

Em conjunto, resultados importantes foram obtidos, os quais indicam que as vacinas experimentais compostas pela proteína recombinante ZIKV-E associadas aos adjuvantes ZIKV-E- α e ZIKV-E- α se mostraram capazes de induzir uma resposta humoral robusta e significativa. Nesse estudo, a vacina experimental para ZIKV composta por ZIKV-GNR- α se mostrou a vacina experimental com maior potencial de aplicação, demonstrando a

capacidade de abordagens vacinais alternativas que sejam capazes de gerar respostas imunes celulares e humorais significativas.

No que se refere às diferentes respostas obtidas com as vacinas experimentais aqui testadas, também pode se sugerir a utilização de um regime de imunização dose-reforço heterólogo que vem sendo utilizado por diferentes grupos de pesquisa e tem contribuído fortemente para a obtenção de respostas imunes mais robustas e eficazes contra diferentes patógenos (Reyes Sandoval et al., 2010).

Embora tenha sido isolado pela primeira vez em 1947, pesquisas significativas sobre o ZIKV só começaram recentemente, devido a uma série de surtos nas duas últimas décadas que demonstraram a capacidade epidêmica de ZIKV (Pardy & Richer, 2019). Entretanto, ainda há muito o que ser feito. Em particular, como se pode ver com a atual pandemia do COVID-19, a maior crise sanitária vivenciada pela humanidade nos 100 últimos anos, e mais recentemente, com a emergência e ameaça potencial da Nova Variola, prevenir a disseminação repentina de doenças infecciosas e a intervenção através do desenvolvimento de vacinas adequadas é essencial para a saúde humana avançar (Kim et al., 2021, Bunge et al., 2022).

A despeito da pandemia de COVID-19, as arboviroses continuam fazendo vítimas. Destaca-se aqui, a importância epidemiológica de tais infecções, devido a sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação em áreas urbanas. Entretanto, grande parte dos recursos de pesquisa se encontram mobilizados para COVID-19, dificultando a viabilização de projetos relacionados a outras doenças infecto-contagiosas. A busca pelo desenvolvimento de estratégias não clássicas de vacinação contra o SARS-CoV-2 mostra a necessidade do desenvolvimento de diferentes estratégias vacinais contra outras viroses, empregando por exemplo a estratégia abordada no presente trabalho. Dessa forma, destaca-se a importância desse estudo e de outros voltados a novas abordagens vacinais, visando aumentar a eficácia das estratégias vacinais já existentes, bem como a segurança e a produção em larga escala das mesmas.

7. Conclusões

A proteína do envelope de ZIKV, objeto de estudo deste trabalho foi expressa em sistema procarioto, eficientemente purificada e caracterizada por western blot. Além disso, foi possível a funcionalização de nanobastões de ouro com a proteína recombinante produzida, e a caracterização da vacina experimental construída em ensaios comparativos aos realizados para os nanobastões puros.

As vacinas experimentais se mostraram capazes de induzir a ativação de células do sistema imune dos animais imunizados com atividade polifuncional de secreção de importantes citocinas em um contexto de infecção viral e ativação de células de memória, além de desenvolverem uma resposta humoral com altos níveis de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV.

Embora seja necessário testar o comportamento da resposta imune dessas vacinas contra um desafio viral, foi demonstrado que os estudos mostraram bons resultados de imunogenicidade e novos experimentos podem ser levados adiante no intuito de obter uma nova vacina para ZIKV.

8. Perspectivas

- Avaliar a resposta imune celular e humoral em modelo murino C57BL/6;
- Avaliar a resposta imune protetora dessa vacina experimental frente à um desafio de camundongas grávidas previamente imunizadas, afim de identificar possíveis alterações do neurodesenvolvimento pré-natal de fetos advindos de mães infectadas com ZIKV.

O potencial imunogênico da vacina experimental produzida (GNR-ZIKV-E) e a proteção frente à um desafio com o ZIKV será avaliado em camundongos C57BL/6 fêmeas. Os procedimentos experimentais serão realizados em colaboração com a Professora Dra. Danielle da Glória de Souza. Para tal, os animais experimentais serão devidamente manipulados e eutanaziados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA), sob protocolo aprovado 168/2022.

9. Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SHIV. *Imunologia Celular E Molecular*. 8. Ed. Rio De Janeiro: *Elsevier*, 2015.

Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, Bricault CA, Moseley ET, Boyd M, Kirilova M, Li Z, Ng'ang'a D, Nanayakkara O, Nityanandam R, Mercado NB, Borducchi EM, Agarwal UM, Brinkman AL, Cabral C, Chandrashekar A, Giglio PB, Jetton D, Jimenez J, Lee BC, Mojta S, Molloy K, Shetty M, Neubauer GH, Stephenson KE, Peron JP, Zanutto PM, Misamore J, Finneyfrock B, Lewis MG, Alter L, Modjarrad K, Eckels KH, Michael NL, Thomas SJ, Barouch DH. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*, 353: 1129-1132, 2016.

Abbink P, Stephenson KE & Barouch DH. Zika virus vaccines. *Nat Rev Microbiol* 16, 594–600, 2018.

Aguirre YR, Castrejón KA, Méndez IG. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? Universidad Nac Aut de México, Facultad de Química, *Educación Química* 27, 286-291, 2016.

Ali A, Wahid B, Rafique S, Idrees M. Advances in research on Zika virus, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Volume 10, Issue 4, Pages 321-331, 2017.

Almeida LT, Ferraz AC, Caetano CCS, Menegatto MBS, Andrade ACSP, Lima RLS, Camini FC, Pereira SH, Pereira KYS, Silva BM, Perucci LO, Talvani A, De Magalhães JC, De Brito Magalhães CL, Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo, *Virus Research*, Volume 286, 2020.

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity, *Journal of Immunological Methods*, Volume 294, Issues 1–2, Pages 15-22, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>.

Akbari M, Morad R & Maaza M. First principle study of silver nanoparticle interactions with antimalarial drugs extracted from *Artemisia annua* plant. *Journal of Nanoparticle Research*, 22, 331, 2020.

Alkilany AM, Murphy CJ. Gold nanoparticles with a polymerizable surfactant bilayer: Synthesis, polymerization, and stability evaluation, *Langmuir* 25: 13874-13879, 2009.

Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research*, 2313-2333, 2010.

Andrade LM, Martins EMN, Versiani AF, Reis DS, da Fonseca FG, Souza IP, Paniago RM, Pereira-Maia E, Ladeira LO. The physicochemical and biological characterization of a 24-month-stored nanocomplex based on gold nanoparticles conjugated with cetuximab demonstrated long-term stability, EGFR affinity and cancer cell death due to apoptosis. *Materials Science and Engineering*, volume 107, 2020.

Araujo SC, Pereira LR, Alves RPS, Andreato-Santos R, Kanno AI, Ferreira LCS, Gonçalves VM. Anti-Flavivirus Vaccines: Review of the Present Situation and Perspectives of Subunit Vaccines Produced in *Escherichia coli*. *Vaccines (Basel)*. 8(3):492, 2020.

Astruc D, Daniel MC, Ruiz J. Dendrimers and gold nanoparticles as exo-receptors sensing biologically important anions. *Chemical Communications (Camb)*. Dec 7(23):2637- 49, 2004.

Aubry F, Jacobs S, Darmuzey M, Lequime S, Delang L, Fontaine A, Jupatanakul N, Miot EF, Dabo S, Manet C, Montagutelli X, Baidaliuk A, Gámbaro F, Simon-Lorière E, Gilsoul M, Romero-Vivas CM, Cao-Lormeau V, Jarman RG, Diagne CT, Faye O, Sall AA, Neyts J, Nguyen L, Kaptein SJF, Lambrechts L. Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nat Commun* 12:916, 2021.

Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, Alves de Souza TM, Santos Barbosa L, Conrado Guerra Nunes P, da Rocha Queiroz Lima M, Gandini M, Bispo de Filippis AM, Venâncio da Cunha R, Leal de Azeredo E, de-Oliveira-Pinto LM. Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection. *Immun Inflamm Dis.*, Jun; 6(2): 194-206, 2018.

Bagno FF. Produção heteróloga, em sistema procarioto, de proteínas estruturais dos vírus Zika e Chikungunya e avaliação de seu potencial para o uso em ferramentas diagnósticas, Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

Bagno FF, Godói LC, Figueiredo MM, Sérgio SAR, Moraes TdFS, Salazar NdC, Kim YC, Reyes-Sandoval A, da Fonseca FG. Chikungunya E2 Protein Produced in *E. coli* and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA. *Viruses*. 2020; 12(9):939.

Bakkar MR, Faraag AHI, Soliman ERS, Fouda MS, Sarguos AMM, McLean GR, Hebshy AMS, Elkhoully GE, Raya NR, Abo-zeid Y. Rhamnolipids Nano-Micelles as a Potential Hand Sanitizer. *Antibiotics*, 10, 751, 2021.

Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet*. 390:2099–2109, 2017

Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao--Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February, *Euro Surveill*. 19(13), 2014.

Belmusto-Worn VE, Sanchez JL, McCarthy K, Nichols R, Bautista CT, Magill AJ, et al. Randomized, double-blind, phase III. Pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX™ and YF-VAX) in healthy infants and children in Peru. *J Trop Med Hyg* 72:189–97, 2005.

Bhaskar S, Lim S. Engineering protein nanocages as carriers for biomedical applications, *NPG Asia Materials* volume 9, page 371, 2017.

Bostick CD, Mukhopadhyay S, Pecht I, Sheves M, Cahen D, Lederman D. Protein bioelectronics: a review of what we do and do not know, *Reports on Progress in Physics*, Volume 81, Number 2, 2018.

Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, Heinz FX, Rey FA. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 23:1–11, 2004.

Bunge EM, Hoet B, Chen L, Lienert F, Weidenthaler H, Baer LR, Steffen R. The changing epidemiology of human monkeypox-A potential threat? A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 11;16(2):e0010141, 2022.

Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnology Science and Applications*, 1: 17–32, 2008.

Campos TL, Durães-Carvalho R, Rezende AM, Carvalho OV, Kohl A, Wallau GL, José Pena LJ. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. *International Journal of Genomics*, 2018.

Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, Luong CQ, Rusmil K, Wirawan DN, Nallusamy R, Pitisuttithum P, Thisyakorn U, Yoon IK, van der Vliet D, Langevin E, Laot T, Hutagalung Y, Frago C, Boaz M, Wartel TA, Tornieporth NG, Saville M, Bouckennooghe A; CYD14 Study Group. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet.* Oct 11;384(9951):1358-65, 2014.

Castro DL, Cavalcante MP, Pedrosa MCG. Nanotecnologia e polímeros: revisão dos temas visando a abordagem em aulas de Química, *Revista Thema*, v.16 n.2, 2019.

Chambers TJ, Rice CM, Hahn CS. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews Microbiology*, v. 44, p. 649 - 688, 1990.

Chattopadhyay A, Aguilar PV, Bopp NE, Yarovinsky TO, Weaver SC, Rose JK. A recombinant virus vaccine that protects against both Chikungunya and Zika virus infections, *Vaccine*, v. 36, Issue 27, p. 3894-3900, June, 2018.

Chan JFW, Choi GKY, Yip CCY, Cheng VCC, Yuen KY. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection*, 72(5), 507–524, 2016.

Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwi ME. The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity*, 68, 1–13. 2016.

Chau C-F, Wu S-H, Yen G-C. The development of regulations for food nanotechnology, *Trends in Food Science & Technology*, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

Chaves MRO, Bernardo AS, Bernardo CD, Filho JFD, Paula HSC, Passos XS. Dengue, Chikungunya e Zika: a nova realidade brasileira. Instituto de ciências da saúde, Universidade Paulista, Aparecida de Goiânia- GO, 2015.

- Chen C, Zhang C, Li R, Wang Z, Yuan Y, Li H, Fu Z, Zhou M, Zhao L. Monophosphoryl-Lipid A (MPLA) is an Efficacious Adjuvant for Inactivated Rabies Vaccines. *Viruses* 11, 1118, 2019.
- Chung T, Lee S-Y, Song EY, Chun H, Lee B. *Plasmonic Nanostructures for Nano-Scale Bio-Sensing*. *Sensors*, 11(11), 10907–10929, 2011.
- Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 47(6):946-953, 2017.
- ClinicalTrials.gov – disponível em: <<https://beta.clinicaltrials.gov/>> . Acesso em 22 agosto de 2022.
- Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement. In: McNeil S. (eds) *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 697. *Humana Press*, 2011.
- Colavita F, Bordoni V, Caglioti C, Biava M, Castilletti C, Bordi L, Quartu S, Iannetta M, Ippolito G, Agrati C, Capobianchi MR, Lalle E. ZIKV Infection Induces an Inflammatory Response but Fails to Activate Types I, II, and III IFN Response in Human PBMC. *Mediators Inflamm*. 3, 2450540, 2018.
- Conde J, Dias JT, Grazú V, Moros M, Baptista PV, de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine, vol. 2, *Frontiers in Chemistry*, 2014.
- Coelho-dos-Reis JG, Huang J, Tsao T, Pereira FV, Funakoshi R, Nakajima H, Sugiyama H, Tsuji M. Co-administration of α -GalCer analog and TLR4 agonist induces robust CD8 + T-cell responses to PyCS protein and WT-1 antigen and activates memory-like effector NKT cells. *Clinical Immunology*, 168, 6–15, 2016.
- Costa CF, Silva AV, Nascimento VA, Souza VC, Monteiro DCS, Terrazas WCM, Passos RA, Nascimento S, Lima JBP, Naveca FG. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12(7), 2018.
- Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The Immunopathology Of Dengue And Zika Virus Infections. *Current Opinion In Immunology*, v. 48, p. 1-6, 2017.
- Daniel MC & Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.
- Dai L, Wang Q, Qi J, Shi Y, Gao GF. Molecular Basis Of Antibody-Mediated Neutralization And Protection Against Flavivirus. *IUBMB Life*, V. 68, N. 10, P. 738-791, 2016.
- Danielsson R & Eriksson H, Aluminium adjuvants in vaccines – A way to modulate the immune response, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 115, p. 3-9, 2021.

Danko JR, Beckett CG, Porter KR. Development of dengue DNA vaccines, *Vaccine*, 23;29(42):7261-6, Sep, 2011.

De Oliveira-Filho EF, Oliveira RAS, Ferreira DRA, et al. Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*. 65(4):1094-1097, 2018.

Deng S-Q, Yang X, Wei Y, Chen J-T, Wang X-J, Peng H-J, A Review on Dengue Vaccine Development, *Vaccine (Basel)*, 8(1): 63, 2020.

Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvantes: de 1920 a 2015. *Vaccine (Basel)*. 3(2):320-43, 2015.

Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46: 509-520, 1952.

Dobrovolskaia MA, Hall JB, Mcneil SE. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*, v. 5, n. 4, p. 487-495, 2008.

Dowd KA, Demaso CR, Pelc RS, Speer SD, Smith AR, Goo L, Platt DJ, Mascola JR, Graham BS, Mulligan MJ, Diamante MS, Ledgerwood JE, Pierson TC. Broadly Neutralizing Activity Of Zika Virus-Immune Sera Identifies A Single Viral Serotype. *Cell Reports*, V. 16, P. 1485–1491, 2016.

Dreaden EC, Mackey MA, Huang X, Kang B, El-Sayed MA. Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chem. Soc. Rev.* 40(7): 3391–3404, 2011.

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360: 2536-2543, 2009.

Dulbecco, R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc Natl Acad.* 38, 747-752, 1952.

Dykman L & Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2256-2282, 2012.

Dykman LA, Khlebtsov NG. Immunological properties of gold nanoparticles. *Chem Sci.*, 8:1719-35, 2017.

El Fezzazi, Hanna Frago C, et al. Resource Use and Costs of Dengue: Analysis of Data from Phase III Efficacy Studies of a Tetravalent Dengue Vaccine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97, n. 6, p. 1898–1903, 2017.

Elia U, Rotem S, Bar-Haim E, Ramishetti S, Naidu GS, Gur D, Aftalion M, Israeli M, Bercovich-Kinori A, Alcalay R, Makdasi E, Chitlaru T, Rosenfeld R, Israely T, Melamed S, Ionita IA, Danino D, Peer S, Cohen O. Lipid Nanoparticle RBD-hFc mRNA Vaccine Protects

hACE2 Transgenic Mice against a Lethal SARS-CoV-2 Infection, *Nano Lett.* 21, 11, 4774–4779, 2021.

Ellis E, Zhang K, Lin Q, Ye E, Poma A, Battaglia G, Loh X J, Lee T-C. Biocompatible pH-responsive nanoparticles with a core-anchored multilayer shell of triblock copolymers for enhanced cancer therapy, *Journal of Materials Chemistry B*, 4421-4425, 2017.

Fan X, Zheng W, Singh DJ. Light scattering and surface plasmons on small spherical particles. *Light: Science & Applications*, v. 3, n. 6, p. e179, 2014.

Fadeel B & Garcia-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3), 362–374, 2010.

Feng, H.P.; Nakajima, N.; Wu, L.; Yamashita, M.; Lopes, T.J.S.; Tsuji, M.; Hasegawa, H.; Watanabe, T.; Kawaoka, Y. A Glycolipid Adjuvant, 7DW8-5, Enhances the Protective Immune Response to the Current Split Influenza Vaccine in Mice. *Front. Microbiol.*, 10, 2157, 2019.

Feng H, Sun R, Song G, Zhu S, Nie Z, Lin L, Yi R, Wu S, Wang G, He Y, Wang S, Wang P, Wu L, Shu J. A Glycolipid α -GalCer Derivative, 7DW8-5 as a Novel Mucosal Adjuvant for the Split Inactivated Influenza Vaccine. *Viruses*. 28;14(6):1174, 2022.

Ferraris P, Yssel H, Missé D. Zika Virus Infection: An Update. *Microbes and Infection*, 2019.

French AR, Sjölin H, Kim S, Koka R, Yang L, Young DA, Cerboni C, Tomasello E, Ma A, Vivier E, Kärre K, Yokoyama WM. DAP12 Signaling Directly Augments Proliferative Cytokine Stimulation Of NK Cells During Viral Infections, *J Immunol* October 15, 177 (8) 4981-4990, 2006.

Gao J, Huang X, Liu H, Zan F, Ren J. Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging. *Langmuir*, 28(9), 4464–4471, 2012.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, *Humana Press*, 571-607, 2005.

Gaudinski MR, Houser KV, Morabito KM, Hu Z, Yamshchikov G, Rothwell RS, Berkowitz N, Mendoza F, Saunders JG, Novik L, Hendel CS, Holman LA, Gordon IJ, Cox JH, Edupuganti S, McArthur MA, Roupheal NG, Lyke KE, Cummings GE, Sitar S, Bailer RT, Foreman BM, Burgomaster K, Pelc RS, Gordon DN, DeMaso CR, Dowd KA, Laurencot C, Schwartz RM, Mascola JR, Graham BS, Pierson TC, Ledgerwood JE, Chen GL; VRC 319; VRC 320 study teams. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet*. 10;391(10120):552-562, 2018.

Geessien Kroon E, Santos Abrahão J, de Souza Trindade G, Pereira Oliveira G, Moreira Franco Luiz AP, Barbosa Costa G, Teixeira Lima M, Silva Calixto R, de Oliveira DB,

Drumond BP. Natural *Vaccinia virus* infection: Diagnosis, isolation, and characterization. *Curr. Protoc. Microbiol.* 42:14A.5.1-14A.5.43, 2016.

Gebhard LG, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses*, v. 3, n. 9, p. 1739-1756, 2011.

Glasner A, Oiknine-Djian E, Weisblum Y, Diab M, Panet U, Lobo DG, Mandelboim O. Zika Virus Escapes NK Cell Detection By Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules, *Journal Of Virology.*, JVI.00785-17, 2017.

Glenny AT, Papa CG, Waddington H, U W. Diphtheria toxin-antitoxin and toxoid: a comparison, *Am. J. Public Health Nations Health*, 22 (1), p. 7-16, 1932.

Gómez M, Martínez D, Muñoz M, Ramírez JD. *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* microbiome/virome: new strategies for controlling arboviral transmission?. *Parasites Vectors.* 15, p. 287, 2022

Gorchakov R, Berry RM, Patel SM, El Sahly HM, Ronca SE, Murray KO. Otimizando a detecção de PCR do Zika Virus a partir de vários fluidos corporais. *Sou J Trop Med Hyg.* 100(2):427-433, 2019. doi:10.4269/ajtmh.18-0755.

Gullo G, Scaglione M, Cucinella G, Riva A, Coldebella D, Cavaliere AF, Signore F, Buzzaccarini G, Spagnol G, Laganà AS, Noventa M, Zaami S. Congenital Zika Syndrome: Genetic Avenues for Diagnosis and Therapy, Possible Management and Long-Term Outcomes. *J Clin Med.* 1;11(5):1351, 2022.

Hadinegoro SR, Arredondo-García JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, Ismail HM, Reynales H, Limkittikul K, Rivera-Medina DM, Tran HN, Bouckennooghe A, et al. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 13, p. 1195–1206, 2015.

Han HH, Diaz C, Acosta CJ, Liu M, Borkowski A. Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate in healthy adults: an observer-blind, randomised, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis.* 18:S1473-3099(20)30733-7, 2021.

Han JF, Qiu Y, Yu J-Y, Wang H-J, Deng Y-Q, Li X-D, Zhao H, Sun H-X, Quin C-F. Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective immune response in mice, *Scientific Reports*, 7: 10047, 2017.

Hashimoto M, Im SJ, Araki K, Ahmed R. Cytokine-Mediated Regulation of CD8 T-Cell Responses During Acute and Chronic Viral Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Jan; 11(1), 2019.

He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 11:2, 477-488, 2015.

Heinz FX, Holzmann H, Essl A, Kundi M. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*, 25:7559–67, 2007.

Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses And Their Antigenic Structure. *Journal Of Clinical Virology*, v. 55, p. 289–295, 2012.

Hepburn MJ, Kortepeter MG, Pittman PR, Boudreau EF, Mangiafico JA, Buck PA, Norris SL, Anderson EL. Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17d yellow fever vaccine. *Vaccine*. 5;24(15):2843-2849, 2006.

Hernandez R, Brown DT, Paredes A, Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera, *Advances in Virology*, 2014.

Huabin L, Ruoheng Y, Zhihua L, Min L, Haitao L, Xia J. Recombinant Zika virus envelope protein elicited protective immunity against Zika virus in immunocompetent mice, *PLoS ONE*, Vol. 13 Issue 3, p1-18. mar, 2018.

Huang X & El-Sayed MA, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *Journal of Advanced Research* 1, 13–28, 2010.

Huang X, Neretina S, El-Sayed MA. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications, *Adv Mater.*; 21(48):4880-4910, 2009.

Hypescience. 5 tecnologias avançadas que foram criadas por povos antigos. 2014. Disponível em: <<http://hypescience.com/5-tecnologias-avancadas-que-foram-criadas-por-povos-antigos/>>. Acesso em: 14 de julho de 2021.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy Release. disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em 18 de agosto de 2022.

Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 1;50(3):184-195, 2000.

Jeong H-H, Choi E, Ellis E, Lee T-C. Recent advances in gold nanoparticles for biomedical applications: from hybrid structures to multi-functionality. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019.

Johnson BW, Kosoy O, Hunsperger E, Beltran M, Delorey M, Guirakhoo F, Monath T. Evaluation of chimeric Japanese encephalitis and dengue viruses for use in diagnostic plaque reduction neutralization tests. *Clin Vaccine Immunol*. 16(7):1052-1059, 2009.

Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts*. 30;9(1):64-79, 2018.

Kasprzykowski JI, Fukutani KF, Fabio H, Fukutani ER, Costa LC, Andrade BB, Queiroz ATL. A recursive sub-typing surveillance system detects the arising of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there risk of a new epidemic? *Intern J Infec Dis*. 96:579-581, 2020.

Kaufmann B & Rossmann MG. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes and Infection*, 13(1), 1-9, 2011.

- Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther*. 2008 Nov;16(11):1833-40, 2008.
- Kerkhof K, Falconi-Agapito F, Esbroeck MV, Talledo M, Ariën KK. Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia? *Trends in Microbiology*, 2019.
- Khalaj-Hedayati A, Chua CLL, Smooker P, Lee KW. Nanoparticles in influenza subunit vaccine development: Immunogenicity enhancement. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 00:1–10, 2019. doi:10.1111/irv.12697
- Khoruts A, Mondino A, Pape KA, Reiner SL, Jenkins MK. A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin (IL)-2-independent mechanism. *J. Exp. Med.* 187, 225–236, 1998.
- Kim D, Wu Y, Kim YB, Oh Y-K. Advances in vaccine delivery systems against viral infectious diseases. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 11, 1401–1419, 2021.
- Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K, Hayes C. Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 15:547, 1997.
- Kohane DS & Langer R. Biocompatibility and drug delivery systems. *Chem. Sci.* 1, 441–446, 2010.
- Koishi AC, Suzukawa AA, Zanluca C, Camacho DE, Comach G, Duarte Dos Santos CN. Development and evaluation of a novel high-throughput image-based fluorescent neutralization test for detection of Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 15;12(3), 2018.
- Kopecky-Bromberg, S.A.; Fraser, K.A.; Pica, N.; Carnero, E.; Moran, T.M.; Franck, R.W.; Tsuji, M.; Palese, P. Alpha-C-galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine. *Vaccine* 2009, 27, 3766–3774.
- Kumar CSSR, UV-VIS and Photoluminescence Spectroscopy for Nanomaterials Characterization, Springer, 2013.
- Kuno G, Chang G-JJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of Virology*, 152(4), 687–696, 2007.
- Kurane I, Meager A, Ennis FA. 1989. Dengue virus-specific human T cell clones. Serotype crossreactive proliferation, interferon gamma production, and cytotoxic activity. *J Exp Med* 170(3):763–775, 1989.
- Kwissa M, Kasturi SP, Pulendran B. The science of adjuvants, *Expert Review of Vaccines*, 6:5, 673-684, 2007.
- Laliberté-Gagné MÈ, Bolduc M, Thérien A, Garneau C, Casault P, Savard P, Estaquier J, Leclerc D. Increased Immunogenicity of Full-Length Protein Antigens through Sortase-Mediated Coupling on the PapMV Vaccine Platform. *Vaccines*. 7(2), 2019.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 14(8):1232-1239, 2008.

Lee WT, Wong SJ, Kulas KE, Dupuis AP, Payne AF, Kramer LD, Dean AB, St George K, White JL, Sommer JN, Ledizet M, Limberger RJ. Development of Zika Virus Serological Testing Strategies in New York State. *J Clin Microbiol.* Feb 22;56, 2018.

Li J, Zhang J, Wang X, Kawazoe N, Chen G. Gold nanoparticle size and shape influence on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Nanoscale*, 8(15), 7992–8007, 2016.

Lin MY, Wang YL, Wu WL, Wolseley V, Tsai MT, Radic V, Thornton ME, Grubbs BH, Chow RH, Huang IC. Zika Virus Infects Intermediate Progenitor Cells and Post-mitotic Committed Neurons in Human Fetal Brain Tissues. *Sci Rep.* 1;7(1):14883, 2017.

Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. v. 59, p. 23–61, 2003. doi:

Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM, Flaviviridae, p 712-746, Fields virology/editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley. – 6th ed, 2007.

Loh XJ, Lee TC., Dou Q, Deen GR. Utilising inorganic nanocarriers for gene delivery. *Biomaterials Science*, 4(1), 70–86, 2016.

Lohse S, Murphy CJ. The Quest for Shape Control: A History of Gold Nanorod Synthesis, *Chem. Mater.*, 25 (8), p. 1250–1261, 2013.

Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, de Bakker PIW, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC. Structure validation by Calpha geometry: C α geometry: ϕ, ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics.* 50: 437-450, 2002.

Luz KG, Santos GIV, Vieira RM. Zika Virus Fever, *Epidemiol. Serv. Saúde* vol.24 no.4 Brasília Oct./Dec., 2015.

Lycke N. Is the choice of vaccine adjuvant critical for long-term memory development? *Expert Review of Vaccines*, 9:12, 1357-1361, 2010.

Ma J, Qiu J, Wang S. Nanozymes for Catalytic Cancer Immunotherapy, *ACS Applied Nano Materials*, 3 (6), 4925-4943, 2020.

Machado PRL, Araujo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos De Resposta Imune as Infecções, *An. Bras. Dermatol.* vol.79 No.6 Rio De Janeiro Nov./Dec., 2004.

Martins OR, Rodrigues PLA, Santos ACM, Ribeiro EZ, Nery AF, Lima JB, Moreno CC, Silveira ARO, Achados otológicos em pacientes pós-infecção pelo zika vírus: estudos de caso, *Audiology - Communication Research*, vol.22, 2017.

Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), 411–416, 2010.

McCarthy A, Saldana L, Ackerman DN, Su Y, John JV, Chen S, Weihs S, Reid SP, Santarpia JL, Carlson MA, Xie J. Ultra-absorptive Nanofiber Swabs for Improved Collection and Test Sensitivity of SARS-CoV-2 and other Biological Specimens, *Nano Lett.* 21, 3, 1508–1516, 2021.

McKeage K, Romanowski B. AS04-adjuvanted human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 vaccine (Cervarix®): a review of its use in the prevention of premalignant cervical lesions and cervical cancer causally related to certain oncogenic HPV types. *Drugs*, 5;71 (4):465-88, 2011.

Medhi R, Srinoi P, Ngo N, Tran H-V, Lee T R. Nanoparticle-Based Strategies to Combat COVID-19. *ACS Applied Nano Materials* 3 (9), 8557-8580, 2020.

Men Rh, Bray M, Lai CJ. Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. *Journal of Virology*, v. 65, n. 3, p. 1400-1407, 1991.

Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Volume 53, nº 40, Outubro, 2022.

Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanopartículas para entrega de drogas. *Nat Rev Drug Discov.* 20(2):101-124, 2021.

Modjarrad K, Lin L, George SL, Stephenson KE, Eckels KH, De La Barrera RA, Jarman RG, Sondergaard E, Tennant J, Ansel JL, Mills K, Koren M, Robb ML, Barrett J, Thompson J, Kosel AE, Dawson P, Hale A, Tan CS, Walsh SR, Meyer KE, Brien J, Crowell TA, Blazevic A, Mosby K, Larocca RA, Abbink P, Boyd M, Bricault CA, Seaman MS, Basil A, Walsh M, Tonwe V, Hoft DF, Thomas SJ, Barouch DH, Michael NL. Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Lancet.* 2018 Feb 10;391(10120):563-571;395(10241):1906, 2020.

Moraes TFS, Ferraz AC, Nizer WSC, Santos M, Tótola AH, Soares DBS, Duarte LP, Vieira-Filho AS, Magalhães CLB, Magalhães JC. Methanol extract and N,N-dimethyltryptamine from *Psychotria viridis* Ruiz & Pav. inhibit in vitro the Zika virus infection. *Arch Virol* 166, 3275–3287, 2021.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG, A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology.* v.3, p.13-22., 2005.

Murray CB, Kagan CR, Bawendi MG. Synthesis and Characterization of Monodisperse Nanocrystals and Close-Packed Nanocrystal Assemblies. *Annual Review of Materials Science*, 30(1), 545–610, 2000. doi:10.1146/annurev.matsci.30.1.545.

Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Broult J, Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014, *Euro Surveill*, 10;19(14), 2014.

Musso D, Cao-Lormeau VM, Guble DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet*. 2015 Jul;386(990):243-4, 2015.

Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-lormeau VM, Potential sexual transmission of Zika virus, *Emerg Infect Diseases*, 21(2): 359-361, 2015.

Muthumani K, Griffin B, Agarwal S, Kudchodkar S, Reuschel E, Choi H, Kraynyak K, Duperret EK, Keaton A, Chung CW, Kim YK, Booth S, Racine T, Yan J, Morrow M, Jiang J, Lee BK, Ramos S, Broderick K, Reed CC, Khan A, Humeau L, Ugen K, Park YK, Maslow J, Sardesai N, Kim JJ, Kobinger G, Weiner D. In vivo protection against ZIKV infection and pathogenesis through passive antibody transfer and active immunisation with a prMEnv DNA vaccine. *NPJ Vaccines*, 1, 2016.

Naahidi, S., Jafari, M., Edalat, F., Raymond, K., Khademhosseini, A. and Chen, P. Biocompatibility of Engineered Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, 166, 182-194, 2013.

Nanjappa SG, Walent JH, Morre M, Suresh M. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *J Clin Invest*. 118(3):1027-1039, 2008.

Neufeldt C, Cortese M, Acosta E, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the *Flaviviridae* family. *Nat Rev Microbiol* 16, 125–142, 2018.

Ngono AE, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, Gorman MJ, Diamond MS, Shresta S. Mapping And Role Of The CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection In Mice. *Cell Host & Microbe*, v. 21, n.1. p.35-46, 2017.

Nunes ML, Carlini CR, Marinowic D, Neto FK, Fiori HH, Scotta MC, Zanella PLA, Soder RB, Costa JC, Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil, Ed. Elsevier, *Sociedade Brasileira de Pediatria*, 2016.

Oleszycka E, Lavelle EC. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Curr Opin Immunol*. 28:1-5, 2014.

Oliveira CB, Vasconcelos PFC. Microcephaly and Zika virus, *J Pediat*, vol. 92, Issue 2, 103-105, 2016.

Padte NN, Boente-Carrera M, Andrews CD, McManus J, Grasperge BF, Gettie A, Coelhos-Reis JG, Li X, Wu D, Bruder JT, Sedegah M, Patterson N, Richie TL, Wong CH, Ho DD, Vasan S, Tsuji M. A glycolipid adjuvant, 7DW8-5, enhances CD8+ T cell responses induced by an adenovirus-vectored malaria vaccine in non-human primates. *PLoS ONE* 25, 8, 2013.

Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov*. 17, 261-279, 2018.

Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, DeMaso CR, Dowd KA, Sutherland LL, Scarce RM, Parks R, Wagner W, Granados A, Greenhouse J, Walker M, Willis E, Yu JS, McGee CE, Sempowski GD, Mui BL, Tam YK, Huang YJ, Vanlandingham D, Holmes VM, Balachandran H, Sahu S, Lifton M, Higgs S, Hensley SE, Madden TD, Hope MJ, Karikó

K, Santra S, Graham BS, Lewis MG, Pierson TC, Haynes BF, Weissman D. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* 543, 248–251, 2017.

Pardy RD, Richer MJ. Protective to a T: The Role of T Cells during Zika Virus Infection, *Cells*, 8(8), 820, 2019.

Pati R, Shevtsov M, Sonawane A. Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2224, 2018.

Patil HP, Murugappan S, ter Veer W, Meijerhof T, de Haan A, Frijlink HW, Wilschut J, Hinrichs WL, Huckriede A. Evaluation of monophosphoryl lipid A as adjuvant for pulmonary delivered influenza vaccine. *J Control Release.* 28;174:51-62, 2014.

Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MdP, Acosta-Torres LS, Diaz-Torres LA, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S, Shin HS. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *J. Nanobiotechnol.* 16, 71, 2018.

Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research.* 80:11–22, 2008.

Pierson TC & Diamond MS, Flaviviruses, p 747-794, Fieldvirology/editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley. 6th ed, 2007.

Pierson TC & Diamond MS. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10, 2008.

Pierson TC & Diamond MS. Vaccine development as a means to control dengue virus pathogenesis: do we know enough?, *Annual Review of Virology*; 1: 375-398, 2014.

Pierson TC & Graham BS. Zika Virus: Immunity And Vaccine Development. *Cell*, v. 167, n. 3, 2016.

Pierson TC & Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* 560, 573–581, 2018.

Pinals RL, Ledesma F, Yang D, Navarro N, Jeong S, Pak JE, Kuo L, Chuang Y-C, Cheng Y-W, Sun H-Y, Landry MP. Rapid SARS-CoV-2 Spike Protein Detection by Carbon Nanotube-Based Near-Infrared Nanosensors, *Nano Lett.* 21, 5, 2272–2280, 2021.

Pissuwan D, Cortie CH, Valenzuela SM, Cortie MB. Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria, *Trends in Biotechnology*, vol. 28, issue 4, p. 207-213, 2010.

Polonio CM, Freitas CL, Zanluqui NG, Peron JPS. Zika virus congenital syndrome: experimental models and clinical aspects, *J. Venom. Anim. Toxinas incl. Trop. Dis* vol.23 São Paulo, 2017.

Pouliot K, Buglione-Corbett R, Marty-Roix R, Montminy-Paquette S, West K, Wang S, Lu S, Lien E. Contribution of TLR4 and MyD88 for adjuvant monophosphoryl lipid A (MPLA) activity in a DNA prime-protein boost HIV-1 vaccine. *Vaccine*, 32, 5049–5056, 2014.

Prow NA, Liu L, Nakayama E, Cooper TH, Yan K, Preethi Eldi, Hazlewood JE, Tang B, Le TT, Setoh YX, Khromykh AA, Hobson-Peters J, Diener KR, Howley PM, Hayball JD, Suhrbier A. A vaccinia-based single vector construct multi-pathogen vaccine protects against both Zika and chikungunya viruses. *Nat Commun*, 9, 1230, 2018.

Qu P, Zhang W, Dapeng L, Zhang C, Liu Q, Zhang X, Wan X, Dai W, Xu Y, Leng Q, Zhong J, Jin W, Huang Z. Insect cell-produced recombinant protein subunit vaccines protect against Zika virus infection, *Antiviral Research*, vol. 154, pag. 97-103, 2018.

Raha S, Mallick R, Basak S, Duttaroy AK. Is copper beneficial for COVID-19 patients? *Medical Hypotheses*, 142, 109814, 2020.

Raphael I, Nalawade S, Eagar NT, Forsthuber TG. T Cell Subsets And Their Signature Cytokines In Autoimmune And Inflammatory Diseases. *Cytokine*, v. 74, p. 5-17, 2015.

Reichmuth AM, Oberli MA, Jaklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vacinação usando nanopartículas lipídicas. *Ther. O Deliv*. 7, 319-334, 2016.

Reyes-Sandoval A, Berthoud T, Alder N, Siani L, Gilbert SC, Nicosia A, Colloca S, Cortese R, Hill AV. Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8⁺ T-cell responses. *Infect Immun*. 78(1):145-153, 2011.

Richner JM, Diamond MS. Zika virus vaccines: immune response, current status, and future challenges, *Current Opinion in Immunology*, vol. 53, pag. 130-136, 2018.

Richner JM, Jagger BW, Shan C, Fontes CR, Dowd KA, Cao B, Himansu S, Caine EA, Nunes BTD, Medeiros DBA, Muruato AE, Foreman BM, Luo H, Wang T, Barrett AD, Weaver SC, Vasconcelos PFC, Rossi SL, Ciaramella G, Mysorekar IU, Pierson TC, Shi PY, Diamond MS. Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell*. 13;170(2):273-283.e12, 2017.

Rivino L. T cell immunity to dengue virus and implications for vaccine design. *Expert Rev. Vaccines* 15:443–453, 2016.

Rivino L, Tan AT, Chia A, Kumaran EAP, Grotenbreg GM, MacAry PA, Bertoletti A. Defining CD8⁺ T cell determinants during human viral infection in populations of Asian ethnicity. *J. Immunol. Baltim. Md. 1950* 191:4010–4019, 2013.

Rodriguez-Quijada C, Sánchez-Purrà M, de Puig H, Hamad-Schifferli K., Physical Properties of Biomolecules at the Nanomaterial Interface, *The Journal of Physical Chemistry B*, 122 (11), 2827-2840, 2018.

Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Weaver SC, Vasilakis N. Insect-Specific Viruses: A Historical Overview and Recent Developments, *Elsevier Inc.:* Amsterdam, The Netherlands, ed. 1, vol. 98, 2017.

- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 725-738. 2010.
- Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 20–31, 2007.
- Sani A, Cao C, Cui D. Toxicity of gold nanoparticles (GNPs): A review, *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 26, 2021.
- Sanz Cortes M, Rivera AM, Yopez M, Guimaraes CV, Diaz Yunes I, Zarutskie A, Davila L, Shetty A, Mahadev A, Serrano SM, Castillo N, Lee W, Valentine G, Belfort M, Parra G, Mohila C, Aagaard K, Parra Saavedra M. Clinical assessment and brain findings in a cohort of mothers, fetuses and infants infected with ZIKA virus, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 440.e1-440.e36, 2018.
- Schmid G, & Corain B. (2003). Nanoparticulated Gold: Syntheses, Structures, Electronics, and Reactivities. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 17, 3081–3098, 2003.
- Shan C, Muruato AE, Jagger BW, Richner J, Nunes BT, Medeiros DBA, Xie X, Nunes JGC, Morabito KM, Kong W-P, Pierson TC, Barrett AD, Weaver SC, Rossi SL, Vasconcelos PFC, Graham BS, Diamond MS, Shi P-Y. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis Damage. *Nature Communications*, v. 6, n. 676, 2017.
- Shirley D, Nataro JP. Zika virus infection. *Pediatric Clinics of North America*. v. 64, n. 2017, p. 937-951, 2017.
- Singh R, Patil S, Singh N, Gupta S. Dual functionality nanobioconjugates targeting intracellular bacteria in cancer cells with enhanced antimicrobial activity, *Scientific Reports*, vol. 7, article number: 5792, 2017.
- Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, Kuhn RJ. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352(6284), 467–470, 2016.
- Smyth MJ & Johnstone RW. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microscopy Research and Technique*, 50(3), 196–208, 2000.
- Sornjai W, Jaratsittisin J, Auewarakul P, Wikan N, Smith DR. Analysis of Zika virus neutralizing antibodies in normal healthy Thais. *Sci Rep* 8(1):17193, 2018.
- Speer SD, Pierson TD. Diagnostics for Zika virus on the horizon, *Science*. 19, vol. 353, issue 6301, p. 750-751, 2016.
- Stiasny K, Kiermayr S, Bernhart A, Heinz FX, The membrane-proximal "stem" region increases the stability of the flavivirus E protein postfusion trimer and modulates its structure, *Journal of virology*, vol.87(17), p.9933-9938, 2013.
- Stone J, Jackson S, Wright D. Biological applications of gold nanorods, Wiley Interdisciplinary Reviews: *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Volume 3, Issue 1, 2010.

Sun XM, Liu Z, Welsher K, Robinson JT, Goodwin A, Zaric S, Dai HJ. Nanographene oxide for cellular imaging and drug delivery, *Nano Research*, Volume 1, Issue 3, p. 203–212, 2008.

Sztandera K, Gorzkiewicz M, Klajnert-Maculewicz B. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment, *Mol. Pharmaceutics* 16, 1, 1–23, 2019.

Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, Harris E, Pereira L, Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell Host Microbe*, 20: 155-166, 2016.

Tallury P, Malhotra A, Byrne LM, Santra S. Nanobioimaging and sensing of infectious diseases, *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, (4–5), 424- 437, 2010.

Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch, Gómez-Medina S, Günther S, Bartoloni A, Muñoz-Fontela C, Schmidt-Chanasit J. Cytokine Kinetics Of Zika Virus-Infected Patients From Acute To Convalescent Phase. *Medical Microbiology And Immunology*, v. 205, p. 269-273, 2016.

Tebas P, Roberts CC, Muthumani K, Reuschel EL, Kudchodkar SB, Zaidi FI, White S, Khan AS, Racine T, Choi H, Boyer J, Park YK, Trottier S, Remigio C, Krieger D, Spruill SE, Bagarazzi M, Kobinger GP, Weiner DB, Maslow JN. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine, *N Engl J Med*;385:e35, 2021.

Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. Drug delivery systems: An updated review, *International Journal Pharmaceutical Investigation*, 2(1): 2–11, 2012.

Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133–146, 2003.

Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. “The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses,” *Immunity*, vol. 19, no. 5, pp. 641–644, 2003.

Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines. *Frontiers in Immunology*, 9, 2018.

Uncini A, Shahrizaila N, Kuwabara S. Zika virus infection and Guillain-Barré syndrome: a review focused on clinical and electrophysiological subtypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 88(3):266-271, 2017.

Van Leur SW, Heunis T, Munnur D, Sanyal S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*;12(1):2814-2838, 2021.

Ventura CV, Maia M, Ventura BV, Linden VVD, Araújo EB, Ramos RC, Rocha MAW, Carvalho MDCG, Belfort R, Ventura L.O, Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq Bras Oftalmol.*; 79(1):1-3, 2016.

Versiani AF, Andrade LM, Martins EMN, Scalzo S, Geraldo JM, Chaves CR, Ferreira DC, Ladeira M, Guatimosim S, Ladeira LO, da Fonseca FG. Gold nanoparticles and their applications in biomedicine, *Future Virology*, v.. 11, n. 4, 2016.

Versiani AF. Utilização da tecnologia de nanobastões de ouro para geração de um protótipo vacinal contra Dengue virus 3. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

Versiani AF, Astigarraga RG, Rocha ES, Barboza AP, Kroon EG, Rachid MA, Souza DG, Ladeira LO, Barbosa-Stancioli EF, Jorio A, Da Fonseca FG. Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant Dengue virus 3 envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice, *J Nanobiotechnology*; 15(1):26, 2017.

Versiani AF, Martins EMN, Andrade LM, Cox L, Pereira GC, Barbosa-Stancioli EF, Nogueira ML, Ladeira LO, da Fonseca FG. Nanosensors based on LSPR are able to serologically differentiate dengue from Zika infections. *Sci Rep* 10, 11302, 2020.

Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know, *Annals of Medicine*, 50:2, 110-120, 2018.

Victora CG, Schuler-Faccini L, Matijasevich A, Ribeiro E, Pessoa A, Barros FC. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? *The Lancet*, 387(10019), 621–624, 2016.

Viral zone - ExpASy (Bioinformatics Resource Portal). Flavivirus; Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/24.html>. Acesso em 06 de julho de 2021.

Wang W, Singh M. "Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency". *World Journal of Vaccines*, vol. 1 n. 2, pp. 33-78, 2011.

Weaver S, Barrett A. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* 2, 789–801, 2004.

Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GX, Saade G, Shi P-Y, Vasilakis N. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research*. v. 130, p. 69-80, 2016.

Weaver SC, Forrester NL, Liu J, Vasilakis N. Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. *Nat Rev Microbiol* 19, 184–195, 2021.

Wen J, Shresta S. T Cell Immunity to Zika and Dengue Viral Infections. *J Interferon Cytokine Res*. 37(11):475-479, 2017.

Wiederstein M, Sippl, MJ. *ProSA-web*: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35, 407-410. 2007.

Wiseman DN, Otchere A, Patel JH, Uddin R, Pollock NL, Routledge SJ, Rothnie AJ, Slack C, Poyner DR, Bill RM, Goddard AD. Expression and purification of recombinant G protein-coupled receptors: A review. *Protein Expr Purif*. 167:105524, 2020.

Willetts KA, Duyne RPV. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing, *The annual review of physical chemistry*, v. 58, p. 267-297, 2007.

WHO - World Health Organization. Zika epidemiology update, atualizado em 5 de junho de 2019 Disponível em: <[Zika epidemiology update - July 2019 \(who.int\)](#)> data de acesso: 7 de julho de 2021.

WHO - World Health Organization. Zika virus vaccine target product profile: Vaccine to protect congenital Zika syndrome for use during an emergence, 2017 Disponível em: <[WHO_UNICEF_Zikavac_TPP_Feb2017.pdf](#)> data de acesso: 27 de julho de 2021.

Xie X, Yang Y, Muruato AE, Zou J, Shan C, Nunes BT, Medeiros DB, Vasconcelos PF, Weaver SC, Rossi SL, Shi PY. Understanding Zika Virus Stability and Developing a Chimeric Vaccine through Functional Analysis. *mBio*. 8(1):e02134-16, 2017.

Xie X, Liao J, Shao X, Li Q, Lin Y. The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. *Sci Rep* 7, 3827, 2017.

Yang M, Dent M, Lai H, Sun H, Chen Q. Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus, *Vaccine*, vol. 35, issue 33, 24, p. 4287-4294, 2017.

Ye Q, Liu ZY, Han JF, Jiang T, Li XF, Qin CF. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infect Genet Evol*. Sep;43:43-9, 2016.

Yeasmin M, Molla MMA, Masud HMAA, Saif-Ur-Rahman KM. Safety and immunogenicity of Zika virus vaccine: A systematic review of clinical trials. *Rev Med Virol*. 20, 2022.

Zanluca C, De Melo VCA, Moismann ALP, Dos Santos GIV, Dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brasil. *Memories of Instituto Oswaldo Cruz*, 110: 569-572, 2018.

Zanluqui NG, Lovo-Martins MI, Malvezi AD, Panis C, da Silva RV, Tatakihara VLH, Felipe I, Martins-Pinge MC, Wowk PF, Pinge-Filho P. Concanavalin-A stimulates IL-17 and nitric oxide production and induces macrophage polarization and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Life Sci*. 1;258:118137, 2020.

Zharov VP, Mercer KE, Galitovskaya EN, Smeltzer MS. Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnosics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophysical Journal*; 90(2):619-27, 2006.

Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, Middelberg APJ, Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 32(3):327-337, 2014.

Zhou K, Li C, Shi W, Hu X, Nandakumar KS, Jiang S, Zhang N. Current Progress in the Development of Zika Virus Vaccines. *Vaccines*. Set, 9 (9), 2021.

Zlatkovic J, Stiasny K, Heinz FX. Immunodominance and Functional Activities of Antibody Responses to Inactivated West Nile Virus and Recombinant Subunit Vaccines in Mice, *The Journal of Virology*, Vol. 85(5), p.1994, 2011.

ANEXOS.

ANEXOS I. Certificados CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de um protótipo vacinal contra o Zika virus utilizando a proteína do envelope viral, recombinante, funcionalizada em Nanobastões de ouro", protocolo do CEUA: 23/2022 sob a responsabilidade de Flavio Guimaraes da Fonseca que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 28/03/2022.

Vigência da Autorização	28/03/2022 a 27/03/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	7
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de um protótipo vacinal contra o Zika virus utilizando a proteína do envelope viral, recombinante, funcionalizada em Nanobastões de ouro - Desafio", protocolo do CEUA: 168/2022 sob a responsabilidade de Flavio Guimaraes da Fonseca que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/08/2022.

Vigência da Autorização	29/08/2022 a 28/08/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	21
Peso/Idade	1g / 15(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério do Departamento de Microbiologia da UFMG

ANEXOS II. Produção Científica durante o período de Doutorado (2019- 2022)

Artigos publicados durante o doutorado

(a) Artigo original publicado em 2021 (autora)

Archives of Virology
<https://doi.org/10.1007/s00705-021-05230-8>

ORIGINAL ARTICLE



A methanol extract and N,N-dimethyltryptamine from *Psychotria viridis* Ruiz & Pav. inhibit *Zika virus* infection *in vitro*

Thaís F. S. Moraes^{1,2} · Ariane C. Ferraz^{1,3} · Waleska S. da Cruz Nizer^{1,4} · Antônio H. Tótola¹ · Débora B. S. Soares⁵ · Lucienir P. Duarte⁵ · Sidney A. Vieira-Filho⁶ · Cintia L. B. Magalhães³ · José C. de Magalhães¹

Received: 30 April 2021 / Accepted: 19 July 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2021

(b) *Short communication* aceito para publicação em 2021 (co-autora)

NATURAL PRODUCT RESEARCH
<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2023865>



SHORT COMMUNICATION




Netzahualcoyonal from *Salacia multiflora* (Lam.) DC. (Celastraceae) roots as a bioactive compound against gram-positive pathogens

Waleska Stephanie da Cruz Nizer^{a,b}, Ariane Coelho Ferraz^c, Thaís de Fátima Silva Moraes^d, William Gustavo Lima^e, Josana Pereira dos Santos^f, Lucienir Pains Duarte^f, Cintia Lopes de Brito Magalhães^c, Sidney Augusto Vieira-Filho^g and José Carlos de Magalhães^a

^aDepartment of Chemistry, Biotechnology, and Bioprocess Engineering, Universidade Federal de São João del-Rei, Ouro Branco, MG, Brazil; ^bCarleton University, Ottawa, ON, Canada; ^cInstitute of Exact and Biological Sciences, Biological Science Research Nucleus, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil; ^dDepartment of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ^eLaboratory of Medical Microbiology, Campus Centro Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis, MG, Brazil; ^fDepartment of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ^gDepartment of Pharmacy, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

(c) Artigo de revisão publicado em 2021 (co-autora)


Immunology Letters 235 (2021) 9–14



Contents lists available at [ScienceDirect](#)


Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immllet



Review

Will a little change do you good? A putative role of polymorphisms in COVID-19



Adriana Alves Oliveira Paim^a, Ágata Lopes-Ribeiro^{a,b}, Daniele S.O. Daian e Silva^a,
Luis Adan F. Andrade^{a,c}, Thais F.S. Moraes^{a,c}, Edel F. Barbosa-Stancioli^a,
Flávio Guimarães da Fonseca^{a,c,*}, Jordana G. Coelho-dos-Reis^{a,b,*}

^a Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Campus Pampulha, CEP, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil
^b Biomarkers Research Group, Instituto René Rachou, Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ-MINAS, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
^c CT Vacinas, BH-TEC Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Rua Professor José Vieira de Mendonça, 770 - Engenho Nogueira, CEP 31310-260, Belo Horizonte, MG, Brazil

(d) Artigo original publicado em 2021 (co-autora)


Journal of Ethnopharmacology 266 (2021) 113423




Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



Pristimerin isolated from *Salacia crassifolia* (Mart. Ex. Schult.) G. Don. (Celastraceae) roots as a potential antibacterial agent against *Staphylococcus aureus*



Waleska Stephanie da Cruz Nizer^{a,b}, Ariane Coelho Ferraz^c, Thaís de Fátima Silva Moraes^d,
William Gustavo Lima^e, Josana Pereira dos Santos^f, Lucienir Pains Duarte^f,
Jaqueline Maria Siqueira Ferreira^e, Cintia Lopes de Brito Magalhães^e,
Sidney Augusto Vieira-Filho^g, Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade^d,
Rodrigo Araújo Lima Rodrigues^{c,d}, Jonatas Santos Abrahão^d, José Carlos de Magalhães^{a,*}

^a Department of Chemistry, Biotechnology, and Bioprocess Engineering, Universidade Federal de São João del-Rei, Ouro Branco, MG, Brazil
^b Carleton University, Ottawa, ON, Canada
^c Institute of Exact and Biological Sciences, Biological Science Research Nucleus, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil
^d Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
^e Laboratory of Medical Microbiology, Campus Centro Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João del-Rei, Divinópolis, MG, Brazil
^f Department of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
^g Department of Pharmacy, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil

(e) Artigo original publicado em 2020 (co-autora)



viruses



Article

Chikungunya E2 Protein Produced in *E. coli* and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA

Flávia Fonseca Bagno ^{1,2}, Lara Carvalho Godói ^{1,3}, Maria Marta Figueiredo ¹, Sarah Aparecida Rodrigues Sérgio ¹, Thaís de Fátima Silva Moraes ^{1,2}, Natália de Castro Salazar ¹, Young Chan Kim ⁴, Arturo Reyes-Sandoval ⁴ and Flávio Guimarães da Fonseca ^{1,2,*}

¹ Centro de Tecnologia em Vacinas (CT-Vacinas), Parque Tecnológico da UFMG (BH-Tec), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG 31320-000, Brazil; flavia.bagno@gmail.com (F.F.B.); lcarvalhogodoi@gmail.com (L.C.G.); mariamartafigueiredo@gmail.com (M.M.F.); sarsergio36@gmail.com (S.A.R.S.); thais.moraes00@hotmail.com (T.d.F.S.M.); natsalazar@gmail.com (N.d.C.S.)

² Laboratório de Virologia Molecular e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG), Belo Horizonte-MG 31270-901, Brazil

³ Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC), Belo Horizonte-MG 31270-901, Brazil

⁴ The Jenner Institute, Nuffield Department of Medicine, The Henry Wellcome Building for Molecular Physiology, Roosevelt Drive, University of Oxford, Oxford OX3 7DQ, UK; young.kim@some.ox.ac.uk (Y.C.K.); arturo.reyes@ndm.ox.ac.uk (A.R.-S.)

* Correspondence: dafonsecaflavio@gmail.com; Tel.: +55-(31)3409-2746

Received: 23 July 2020; Accepted: 19 August 2020; Published: 26 August 2020



(f) Artigo original publicado em 2020 (co-autora)

[Downloaded free from <http://www.pnrjournal.com> on Monday, July 20, 2020, IP: 189.83.26.186]

Original Article

Lack of Activity of Rutin Isolated from *Tontelea micrantha* Leaves against Vero and BHK, Fungi, Bacteria and *Mayaro virus* and its *in silico* Activity


Waleska Stephanie Da Cruz Nizer, Ariane Coelho Ferraz¹, Thaís De Fátima Silva Moraes², Fernanda Lopes Ferreira³, Cintia Lopes De Brito Magalhães⁴, Sidney Augusto Vieira-Filho⁵, Lucenir Pains Duarte⁶, José Carlos De Magalhães

Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei,

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, ²Departamento de Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, ³Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, ⁴Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

(g) *Short communication* publicado em 2019 (co-autora)

Antiviral Research 168 (2019) 76–81




Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/antiviral



Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus 

Ariane Coelho Ferraz^{a,b}, Thaís de Fátima Silva Moraes^a, Waleska Stephanie da Cruz Nizer^{a,b},
 Michelli dos Santos^b, Antônio Helvécio Tótola^a, Jaqueline Maria Siqueira Ferreira^b,
 Sidney Augusto Vieira-Filho^{c,1}, Vanessa Gonçalves Rodrigues^d, Lucienir Pains Duarte^{d,1},
 Cintia Lopes de Brito Magalhães^e, José Carlos de Magalhães^{a,*,1}

^a Department of Chemistry, Biotechnology and Bioprocess Engineering, Federal University of São João del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Ouro Branco, Minas Gerais, Brazil
^b Federal University of São João del-Rei, Campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil
^c Department of Pharmacy, Pharmacy's School, Federal University of Ouro Preto, Campus Marro do Cruzeiro, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil
^d Department of Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
^e Department of Biological Sciences, Nucleus of Biological Sciences Research, Federal University of Ouro Preto, Campus Marro do Cruzeiro, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

Trabalhos apresentados em congressos durante o doutorado (2019-2022)

(a) XXXII Congresso Brasileiro de Virologia (2021)

31/10/2021 20:26 Certificado

XXXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
VIROLOGIA

19 a 23 de outubro de 2021 – ON-LINE



CERTIFICADO

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Construction and evaluation of the immune response of a subunit vaccine for Zika virus composed of gold nanorods functionalized with recombinant viral envelope protein** de autoria de Thaís De Fátima Silva Moraes, Raissa Prado Rocha, Alice Freitas Versiani, Flavia Fonseca Bagno, Samille Henriques, LIDIA MARIA DE ANDRADE, Maria Marta Figueiredo, Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis e Flávio Guimarães da Fonseca, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.

Realização





Flávio Guimarães da Fonseca
Presidente



Helena Lage Ferreira
Primeira Secretária

Organização



https://www.even3.com.br/documentos/imprimir/?i=1974939.8398286.265051.8.37839369365645412106&cc=05F6A0D5-7FEB-46BF-BFA2-A3F4477BEF2F

31/10/2021 20:22

Certificado

XXXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
VIROLOGIA
19 a 23 de outubro de 2021 – ON-LINE

CERTIFICADO

CERTIFICADO
Certificamos que o trabalho intitulado **Production of Zika virus heterologous chimeric proteins for use in serological diagnostic platforms** de autoria de Samille Henriques, Flavia Fonseca Bagno, Thais De Fátima Silva Moraes, Ágata Lopes Ribeiro e Flávio Guimarães da Fonseca, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.

Realização  SBV SOCIEDADE BRASILEIRA DE VIROLOGIA


Flávio Guimarães da Fonseca
Presidente


Helena Lage Ferreira
Primeira Secretária

Organização  Siga Eventos

<https://www.even3.com.br/documentos/imprimir?i=1974939.8398286.232036.8.37839369365645952946&cc=05F6A0D5-7FEB-46BF-BFA2-A3F4477BEF2F>

(b) VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG (2021)

Verifique o código de autenticidade 1913227.838286.265135.8.3095576936564510916 em <https://www.even3.com.br/documentos>

 **conecta**
Sim

VIII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG –
CONECTA SIM 2021

Certificado de Submissão

Certificamos que o trabalho **CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE PARA O Zika virus COMPOSTA POR NANOBASTÕES DE OURO FUNCIONALIZADOS COM A PROTEÍNA DO ENVELOPE VIRAL** com autoria de Thais De Fátima Silva Moraes, Raissa Prado Rocha, Alice Freitas Versiani, Flavia Fonseca Bagno, Samille Henriques Pereira, LIDIA MARIA DE ANDRADE, Maria Marta Figueiredo, Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis e Flávio Guimarães da Fonseca foi submetido e aprovado na modalidade de Resumo no “VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2021


Dr. Daniel de Assis Santos
Coordenador do Conecta SIM 2021


Dra. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - UFMG

Verifique o código de autenticidade 1913227.8398286.286755.8.30955769365645647116 em <https://www.event3.com.br/documentos>

conecta
sim

VIII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG –
CONECTA SIM 2021

Certificado de Submissão

Certificamos que o trabalho AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE Zika virus PARA USO EM TESTES SOROLÓGICO com autoria de Samille Henriques, Flavia Fonseca Bagno, Thais De Fátima Silva Moraes, Ágata Lopes Ribeiro e Flavio Guimarães da Fonseca foi submetido e aprovado na modalidade de Resumo no "VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2021


Dr. Daniel de Assis Santos
Coordenador do Conecta SIM 2021


Dra. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - UFMG

(c) XXXI Congresso Brasileiro de Virologia (2021)

Verifique o código de autenticidade 4506781.2557562.637713.5.89673528878823177518 em <https://www.event3.com.br/documentos>

SBV

XXXI BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY

VIR  **LOGY**

& XV MERCOSUR VIROLOGY MEETING
NOVEMBER 23 to 28, 2020

Certificate of Resumo presentation

This certifies that the work entitled PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS FROM CHIKUNGUNYA, DENGUE AND ZIKA IN BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM FOR IN VITRO DIAGNOSTIC APPLICATION, authored by Sarah Aparecida Rodrigues Sérgio, Flávia Fonseca Bagno, Thais Fátima Silva Moraes, Flavio Guimarães da Fonseca and Lara Carvalho Godoi was presented by during the Resumo session of the XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul held online, between 11-23-2020 - 11-28-2020.

November 29, 2020.


Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
President of SBV


Prof. Dr. Prof. Jônatas Santos Abrahão
First Secretary of SBV

(d) IV FAMERP-UTMB (2019)

**CERTIFICATE**

We certificate that the work entitled **EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF EXTRACT AND ISOLATES OF PSYCHOTRIA SP AGAINST MAYARO VIRUS**, authored by Moraes, T. F. S.; Ferraz, A. C.; Cruz, W. S.; Vieira Filho, S. A.; de Brito Magalhães, C.L.; Magalhães, J. C., was presented in the **Poster Session** during the **IV FAMERP-UTMB by Thais de Fátima Silva Moraes**, held from December 4th to 7th, 2019, in São José do Rio Preto, SP, Brazil.

São José do Rio Preto/SP, December 10th, 2019



Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira
Event Coordinator

**CERTIFICATE**

We certificate that the work entitled **PRODUCTION OF ZIKA VIRUS RECOMBINANT PROTEIN E, USING E. COLI EXPRESSION SYSTEM AND EVALUATION OF ITS ANTIGENICITY**, authored by Moraes, T. F. S.; Bagno, F. F.; Sergio, S. A. R.; Salazar, N.; Figueiredo, M. M.; Fonseca, M. S. P.; Versiani, A. F.; Fonseca, F. G., was presented in the **Poster Session** during the **IV FAMERP-UTMB by Thais de Fátima Silva Moraes**, held from December 4th to 7th, 2019, in São José do Rio Preto, SP, Brazil.

São José do Rio Preto/SP, December 10th, 2019



Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira
Event Coordinator

**CERTIFICATE**

We certificate that the work entitled **PRODUCTION OF A RECOMBINANT PROTEIN OF ZIKA VIRUS IN BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM**, authored by SÉRGIO, S.A.R.; BAGNO, F. F.; MORAES, T. F. S.; FONSECA, M.S.P.; DA, FONSECA, F. G.; GODOI, L. C., was presented in the **Poster Session** during the **IV FAMERP-UTMB by Sarah Aparecida Rodrigues Sergio**, held from December 4th to 7th, 2019, in São José do Rio Preto, SP, Brazil.

São José do Rio Preto/SP, December 10th, 2019



Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira
Event Coordinator

(e) VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG (2019)



CERTIFICADO

Certificamos que **MORAES, T. F. S.; BAGNO, F. F.; SERGIO, S. A. R.; SALAZAR, N.; FIGUEIREDO, M. M.; FONSECA, M. S. P.; VERSIANI, A. F.; FONSECA, F. G.**; teve o seu trabalho **“PRODUÇÃO DA PROTEÍNA E RECOMBINANTE DE ZIKA VIRUS, USANDO SISTEMA DE EXPRESSÃO EM E. COLI E AVALIAÇÃO DE SUA ANTIGENICIDADE”**, apresentado no formato de pôster no “VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM: Microbiologia Interligada”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019.

Betânia Paiva Drummond

Profa. Dra. Betânia Paiva Drummond
Coordenadora do Conecta SIM

Flávio

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



CERTIFICADO

Certificamos que **BAGNO, F.F.; SÉRGIO, S.A.R.; FIGUEIREDO, M.M.; MORAES, T.F.S.; FONSECA, M.S.P.; GODOI, L.C.; DA FONSECA, F.G.**; teve o seu trabalho **“DO PROTÓTIPO AO PRODUTO: DESENVOLVIMENTO DE UM KIT DE ELISA PARA DETECÇÃO E SOROVIGILÂNCIA DE INFECÇÕES PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA”**, apresentado no formato de pôster no “VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM: Microbiologia Interligada”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019.

Betânia Paiva Drummond

Profa. Dra. Betânia Paiva Drummond
Coordenadora do Conecta SIM

Flávio

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



CERTIFICADO

Certificamos que **SÉRGIO, S.A.R.; BAGNO, F.F.; MORAES, T.F.S.; FONSECA, M.S.P.; DA FONSECA, F.G.; GODOI, L.C.**; teve o seu trabalho "**GERAÇÃO DE UM BACÍDEO RECOMBINANTE CONTENDO O GENE DA PROTEÍNA E DO ZIKA VÍRUS PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA BACULOVÍRUS**", apresentado no formato de pôster no "VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM: Microbiologia Interligada", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019.

Betânia Paiva Drummond

Profa. Dra. Betânia Paiva Drummond
Coordenadora do Conecta SIM

Flávio

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Comissão Organizadora do Simpósio de Microbiologia da UFMG durante o doutorado (2019-2022)



CERTIFICADO

Certificamos que **Thais Fátima Silva Morais** participou da **comissão organizadora** do “VI Simpósio de Microbiologia da UFMG – **CONECTA SIM: Microbiologia Interligada**”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 03 e 04 de setembro de 2019 com duração total de 16h.

Betânia Paiva Drumond

Profa. Dra. Betânia Paiva Drumond
Coordenadora do Conecta SIM

Flávio

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia



Certificado de Organização de Evento

Certificamos que **Thais de Fátima Silva Moraes** participou da comissão organizadora do “VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – **CONECTA SIM 2021**”, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

Belo Horizonte – MG, 19 de novembro de 2021.

Daniel de Assis Santos

Dr. Daniel de Assis Santos
Coordenador do Conecta SIM 2021

Danielle da Glória de Souza

Dra. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - UFMG