

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**RAÍNE PIVA AMARAL**

**EFEITO ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA  
CONTENDO POLI (I:C) EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O DOMÍNIO  
III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *Zika virus***

Alfenas/MG

2022

**RAÍNE PIVA AMARAL**

**EFEITO ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA  
CONTENDO POLI (I:C) EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O DOMÍNIO  
III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *Zika virus***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho.

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Piva-Amaral, Raíne.

Efeito adjuvante de nanopartículas de albumina sérica bovina contendo Poli (I:C) em camundongos imunizados com o domínio III da proteína do envelope do *Zika virus* / Raíne Piva-Amaral. - Alfenas, MG, 2022.

79 f. : il. -

Orientador(a): Luiz Felipe Leomil Coelho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Vacinas. 2. Zika virus. 3. Anticorpos neutralizantes. 4. Nanopartículas miméticas. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil, orient. II. Título.

**EFEITO ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA CONTENDO POLI (I:C) EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO *ZIKA VIRUS***

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 9 de novembro de 2022.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Raissa Prado Rocha  
Instituição: University Of Surrey

Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 09/11/2022, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livia de Figueiredo Diniz Castro, Professor do Magistério Superior**, em 09/11/2022, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raissa Prado Rocha, Usuário Externo**, em 10/11/2022, às 10:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0859428** e o código CRC **F5660FC1**.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por ter me abençoado e ouvido minhas preces, além de ter me dado forças para continuar até aqui.

Aos meus pais, Luzia e Edgar, pelo amor, carinho, orgulho, apoio, ensinamentos, dedicação, motivação, mais até do que eu poderia imaginar e por terem me dado a oportunidade de estudar e nunca terem me questionado sobre isso. Ao meu irmão, Heraldo, por todo apoio e motivação. Eu amo muito vocês.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos e pelas experiências aqui vividas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pela paciência e por me transmitir o conhecimento científico: melhor presente que poderia receber. Muito obrigado por toda a confiança depositada em mim.

À Profa. Dra. Carine Ervolino de Oliveira por todo auxílio, apoio, disposição e ensinamentos com os processos relacionados à Histopatologia.

Aos meus companheiros do Laboratório de Vacinas (UNIFAL-MG) Willian, Sérgio, Mateus, Gabriela e Ana por estarem sempre à disposição para ajudar, seja nos finais de semana ou nos feriados e também pelos muitos momentos divertidos compartilhados.

Ao Renato Fróes (*in memoriam*) por ter me recebido tão bem e pela paciência em passar grande parte dos conhecimentos das técnicas laboratoriais.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios de Vacinas e do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL-MG.

Aos amigos que são a família que escolhemos, por terem me incentivado nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado, Henrique Furtado, por todo amor e apoio em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e às demais agências de fomentos pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que, embora não tenham sido mencionados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV) é considerado um Flavivirus emergente associado a epidemias em ilhas na região do Oceano Pacífico e em vários países das Américas. Manifestações graves como a síndrome congênita do Zika e síndrome de Guillain-Barré tiveram a sua incidência aumentada durante estes surtos e contribuíram para o estabelecimento de um estado de emergência pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A partir de então, o desenvolvimento de uma vacina eficaz para prevenir infecções causadas pelo ZIKV tornou-se uma prioridade, uma vez existem poucas vacinas para o ZIKV em estágios avançados de desenvolvimento, fortalecendo a necessidade de testar plataformas alternativas. As nanopartículas (NPs) são materiais particulados que apresentam tamanhos variando entre 10 a 1000 nm. As NPs são sistemas coloidais formados por estruturas complexas, os quais têm o potencial de evitar a degradação enzimática do fármaco ou do antígeno de interesse e assim prolongar a exposição ao princípio ativo por meio da liberação controlada. As NPs poliméricas estão sendo amplamente exploradas como novas plataformas vacinais devido à capacidade dessas NPs em estimular o sistema imunológico, proporcionando desta forma, a liberação controlada do antígeno após a sua administração. A albumina é um polímero natural, biocompatível, biodegradável, não tóxico e, devido a essas características, as NPs feitas de albumina sérica bovina (NPs-BSA) são promissoras sistema de administração de medicamentos ou antígenos. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar se a formulação preparada de nanopartículas compostas de albumina sérica bovina e ácido poliinosínico-policitidílico (NPPI) quando adicionadas a uma solução contendo o domínio III da proteína do envelope do ZIKV (zEDIII) são capazes de induzir anticorpos neutralizantes. Para isso, camundongos fêmeas foram imunizados pela via subcutânea com nanopartículas contendo ácido poliinosínico-policitidílico (NPPI) com ou sem adição do domínio III da proteína do envelope do ZIKV (zEDIII) nos dias 0, 7 e 14. A produção de anticorpos IgG anti-zEDIII foram avaliados por ELISA. Os soros dos animais previamente imunizados foram transferidos passivamente a camundongos neonatos de um dia de idade após uma hora de infecção por ZIKV. Os neonatos foram acompanhados e avaliados quanto ao peso, sinais clínicos e neurológicos durante 28 dias ou até o dia de sua morte. Os cérebros desses animais foram coletados para ensaios de quantificação de carga viral. Os resultados mostraram que camundongos imunizados NPPI+zEDIII produziram títulos significativos de anticorpos IgG anti-zEDIII. Essa imunização também foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, capazes de neutralizar potencialmente a infecção pelos ZIKV *in vitro*. Além do mais, o soro dos animais imunizados com NPPI+zEDIII foi capaz de prevenir os sinais clínicos e neurológicos em um modelo de transferência passiva de anticorpos a animais neonatos, além de reduzir a carga viral, expressão de citocinas pró-inflamatórias e inflamação no cérebro desses animais. Portanto, nossos resultados mostram que NPPI+zEDIII é um candidato vacinal promissor para combater infecções causadas pelo ZIKV.

**Palavras Chave:** vacinas, *Zika virus*, anticorpos neutralizantes, nanopartículas miméticas.

## ABSTRACT

*Zika virus* (ZIKV) is considered an emerging Flavivirus associated with epidemics on islands in the Pacific Ocean region and in several countries in the Americas. Severe manifestations such as congenital Zika syndrome and Guillain-Barré syndrome had their incidence increased during these outbreaks and contributed to the establishment of a state of emergency by the World Health Organization (WHO). Since then, the development of an effective vaccine to prevent infections caused by ZIKV has become a priority, since there are few vaccines for ZIKV in advanced stages of development, increasing the need to test alternative platforms. Nanoparticles (NPs) are particulate materials that have sizes ranging from 10 to 1000 nm. NPs are colloidal systems formed by complex structures, which have the potential to prevent enzymatic degradation of the drug or antigen of interest and thus prolong exposure to the active ingredient through controlled release. Polymeric NPs are being widely explored as new vaccine platforms due to the ability of these NPs to stimulate the immune system, thus providing the controlled release of the antigen after its administration. Albumin is a natural, biocompatible, biodegradable, non-toxic polymer and, due to these characteristics, NPs made from bovine serum albumin (NPs-BSA) are promising drug or antigen delivery systems. Therefore, this work aimed to evaluate whether the formulation prepared from nanoparticles composed of bovine serum albumin and polyinosinic-polycytidyl acid (NPPI) when added to a solution containing domain III of the ZIKV envelope protein (zEDIII) are capable of inducing neutralizing antibodies. For this, female mice were immunized subcutaneously with nanoparticles containing polyinosinic-polycytidyl acid (NPPI) with or without addition of domain III of the ZIKV envelope protein (zEDIII) on days 0, 7 and 14. zEDIII were evaluated by ELISA. Sera from previously immunized animals were passively transferred to one-day-old neonate mice after one hour of ZIKV infection. The neonates were followed up and evaluated for weight, clinical and neurological signs for 28 days or until the day of their death. The brains of these animals were collected for viral load quantification assays. The results showed that NPPI+zEDIII immunized mice produced significant titers of anti-zEDIII IgG antibodies. This immunization was also able to induce the production of neutralizing antibodies, capable of potentially neutralizing ZIKV infection *in vitro*. Furthermore, the serum of animals immunized with NPPI+zEDIII was able to prevent clinical and neurological signs in a model of passive transfer of antibodies to neonatal animals, in addition to reducing viral load, expression of pro-inflammatory cytokines and inflammation in the brain of these animals. Therefore, our results show that NPPI+zEDIII is a promising vaccine candidate to fight infections caused by ZIKV.

**Keywords:** vaccines, *Zika virus*, neutralizers, mimetic nanoparticles.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Representação esquemática do protocolo de imunização dos animais .....	36
Figura 2	-	Efeito citopático causado pelo <i>Zika virus</i> em monocamada de células VERO .....	38
Figura 3	-	Representação esquemática da transferência passiva de anticorpos aos neonatos seguida da infecção.....	40
Figura 4	-	Perfil eletroforético da proteína zEDIII .....	44
Figura 5	-	Produção e titulação de anticorpos IgG anti-zEDIII e IgG anti-BSA em camundongos imunizados com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policitidílico na presença de zEDIII .....	46
Figura 6	-	A imunização passiva reverte a perda de peso e a paralisia dos membros causada pela infecção do ZIKV em neonatos de camundongos C57Bl/6 ....	49
Figura 7	-	Curva de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV .....	50
Figura 8	-	Evolução dos sinais clínicos da doença pelos camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV .....	51
Figura 9	-	Evolução dos sinais neurológicos da doença em camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV .....	52
Figura 10	-	Carga viral presente no cérebro de camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV .....	53
Figura 11	-	Produção de citocinas no cérebro de camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV .....	54
Figura 12	-	Análise histopatológica da região cerebelar de camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV .....	56
Figura 13	-	Análise histopatológica da região cortical de camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV .....	57

## LISTA DE TABELAS E QUADRO

Quadro 1 -	Pontuação utilizada para avaliação clínica dos animais infectados .....	41
Tabela 1 -	Títulos de anticorpos IgG anti-ZEDIII no soro de camundongos C57BL/6 após imunização com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policitidílico na presença de zEDIII .....	46
Tabela 2 -	Títulos de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos .....	47

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

$\mu\text{L}$	Microlitros
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
NPs-BSA	Nanopartículas de BSA
MEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DENV	<i>Dengue virus</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
g	Gramas
IFNAR1	Cadeia alfa do receptor interferon alfa/beta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons
L	Litros
Min	Minutos
mg	Miligrama
kg	Quilograma
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	Milivolts
N.I	Não infectado
nm	Nanômetros
NP(s)	Nanopartícula(s)

NP-BSA	Nanopartículas de Albumina sérica bovina
NPPI	Nanopartícula de BSA associadas ao ácido poliinosínico-policitidílico
NPPI+zEDIII	Nanopartícula de BSA contendo ácido poliinosínico-policitidílico em associação com o domínio III da proteína do envelope do <i>Zika vírus</i>
zEDIII	domínio III da proteína do envelope do <i>Zika vírus</i>
O.D	Densidade óptica
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	PBS contendo 0,05% de Tween 20
pH	Potencial hidrogeniônico
PFU	Unidades formadoras de placa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PND	Dia pós-natal
qPCR	PCR em tempo real quantitativa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
rpm	Rotações por minuto
kb	quilobases
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
OMS	Organização Mundial da Saúde
TNF	Fator de necrose tumoral
TLR	Receptor semelhante ao Toll
WT	Wild Type
ZIKV	<i>Zika virus</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1	<i>Zika virus</i> .....	15
<b>2.1.1</b>	<b>Histórico e epidemiologia.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Transmissão.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Ciclo de replicação e patogênese.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Manifestações Clínicas.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Diagnóstico, tratamento e prevenção.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.6</b>	<b>Vacinas para <i>Zika vírus</i>.....</b>	<b>23</b>
2.2	NANOPARTÍCULAS.....	24
<b>2.2.1</b>	<b>Nanopartículas de albumina sérica.....</b>	<b>26</b>
2.3	MODELOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PARA ESTUDO DO <i>Zika vírus</i> .....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1	OBTENÇÃO DO DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKV.....	33
4.2	PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	33
4.3	ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO ANIMAL.....	33
4.4	ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO E TITULAÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-zEDIII.....	34
4.5	PRODUÇÃO E TITULAÇÃO DO ZIKV.....	35
4.6	SORONEUTRALIZAÇÃO.....	36
4.7	ANÁLISE DO POTENCIAL PROTETOR DAS NANOPARTÍCULAS EM MODELO DE CAMUNDONGOS NEONATOS.....	37
4.8	ANÁLISE CLÍNICA.....	38
4.9	ANÁLISE NEUROLÓGICA.....	39
4.10	ANÁLISE DA CARGA VIRAL PRESENTE NAS AMOSTRAS DE CÉREBRO.....	40
4.11	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO CÉREBRO DOS ANIMAIS QUE RECEBERAM IMUNIZAÇÃO PASSIVA.....	40
4.12	HISTOPATOLOGIA.....	41
4.13	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41

<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO zEDIII	42
5.2	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-zEDIII EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA ASSOCIADAS AO ÁCIDO POLIINOSÍNICO-POLICITIDÍLICO COM OU SEM A PRESENÇA DA PROTEÍNA zEDIII.....	42
5.3	NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA ASSOCIADAS AO ÁCIDO POLIINOSÍNICO-POLICITIDÍLICO COM PRESENÇA DO ANTÍGENO zEDIII INDUZIRAM PROTEÇÃO PASSIVA EM CAMUNDONGOS NEONATOS INFECTADOS COM <i>Zika vírus</i> .....	45
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus* e é considerado um flavivirus emergente que foi associado às epidemias em ilhas na região do Oceano Pacífico e em vários países das Américas (LINDENBACH, 2007; SONG et al., 2017; WEAVER et al., 2016). Desde que o ZIKV passou a ser considerado um risco para o desenvolvimento da síndrome congênita do ZIKV e síndrome de Guillain-Barré, o desenvolvimento de uma vacina que seja segura e eficaz se tornou alta prioridade da Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL et al., 2016; CAO-LORMEAU et al., 2016)

A partir de então, inúmeras estratégias para o desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV foram adotadas e, dentre as estratégias mais promissoras, estão as vacinas de subunidades compostas pelo domínio III da proteína do envelope do ZIKV. Esse domínio está associado à ligação do vírus ao receptor celular, além de possuir epítomos específicos capazes induzir fortes respostas de anticorpos neutralizantes do hospedeiro e/ou imunidade protetora (YANG et al., 2017; TAI et al., 2018; LEE et al., 2021; GEORGIEV et al., 2022; CABRAL-MIRANDA et al., 2019; LIN et al., 2019; WANG et al., 2019; KIM et al., 2021; CIBULSKI et al., 2021; VAN ROMPAY et al., 2020; CHEN et al., 2020).

Além disso, o uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de vacinas tem se tornado cada vez mais promissor, incluindo as nanopartículas (NPs). Estas são materiais particulados que apresentam tamanhos variando entre 10 a 1000 nm e estão sendo amplamente exploradas como novas plataformas vacinais devido a capacidade em estimular o sistema imunológico proporcionando a liberação controlada do antígeno após a sua administração. As NPs são sistemas coloidais formados por estruturas complexas, os quais têm o potencial de evitar a degradação enzimática do fármaco ou do antígeno de interesse e assim prolongar a exposição ao princípio ativo por meio da liberação controlada (AKAGI; BABA; AKASHI, 2011; MARCATO; DURÁN, 2008; NITTA; NUMATA, 2013).

A albumina é um polímero natural, biocompatível, biodegradável, não tóxico e, estudos mostram o potencial das NPs feitas de albumina como promissores sistema de administração de medicamentos ou antígenos (DE SILVA et al., 2017; TSABOURI; DOUROS; PRIFTIS, 2014; ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; KOUCHAKZADEH; SAFAVI; SHOJAOSADATI, 2015).

Evidências experimentais obtidas pelo nosso grupo mostraram que as NPs de albumina de soro bovino (NPs-BSA) induzem um efeito pró-inflamatório *in vivo* e *in vitro*,

que indicam um potencial adjuvante e imunoestimulante destas NPs. Essa plataforma também foi identificada como um sistema promissor para a administração *in vivo* de antígenos microbianos (DA SILVA *et al.*, 2018; MARIA DE SOUZA MORAIS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012; SOUZA, 2019).

O ácido Poliinosínico-Policitidílico - poli (I: C) é estruturalmente semelhante ao RNA de fita dupla, podendo ser considerado um análogo sintético do RNA de fita dupla. Essa molécula é uma ferramenta comum para pesquisas científicas sobre o sistema imunológico, pois é considerado um imunoestimulante usado para simular infecções virais (FORTIER *et al.*, 2004). As NPs-BSA adjuvadas com o Poli (I:C) (NPPI) foram capazes de induzir um aumento da expressão de IFN- $\beta$  e CD40 e de aumentar o infiltrado inflamatório na derme de animais inoculados com essa formulação (VIEIRA-JUNIOR, 2021), indicando que essa formulação pode ser um bom candidato para vacinas, uma vez que podemos ter um efeito adjuvante e imunoestimulante (PALCHETTI *et al.*, 2015;; ZHAO *et al.*, 2014; AMARAL *et al.*, 2020).

Dessa forma, este trabalho buscou caracterizar e avaliar potencial adjuvante de uma formulação preparada de nanopartículas de albumina sérica bovina contendo ácido poliinosínico-policitidílico (NPPI) quando adicionadas a uma solução contendo o domínio III da proteína do envelope do ZIKV (zEDIII), verificando se essa formulação é capaz de induzir anticorpos neutralizantes e proteção imunológica a infecção por ZIKV em modelos neonatos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Zika virus*

O *Zika virus* (ZIKV) é um vírus do gênero *Flavivirus* pertencente à família Flaviviridae que foi descoberto em 1947 na floresta de Uganda. Esse vírus ganhou destaque após causar surtos em países do Oceano Pacífico e nas Américas (HEINZ; STIASNY, 2017). O ZIKV está intimamente relacionado a outros arbovírus pertencentes à família Flaviviridae e relevantes para a saúde humana, tais como os vírus causadores da dengue, febre amarela, encefalite japonesa, febre do Nilo Ocidental e vírus que causa a encefalite transmitida por carrapatos (GOULD; SOLOMON, 2008).

O ZIKV é um vírus envelopado com genoma de RNA fita simples sentido positivo com tamanho de genoma de aproximadamente 10,8 quilobases (kb). O RNA é traduzido em uma única poliproteína (3.423 aminoácidos) que codifica 3 proteínas estruturais, sendo elas a proteína do capsídeo (C), proteína de membrana (M), que é gerada a partir de sua pré-membrana precursora (prM), e a proteína do envelope (E). Além disso, o genoma do ZIKV também codifica sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (JAMALI MOGHADAM *et al.*, 2016; SIROHI *et al.*, 2016; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016). As proteínas não estruturais auxiliam na replicação e empacotamento do genoma, bem como na subversão das vias do hospedeiro em favor do vírus (SIROHI; KUHN, 2017).

A proteína do capsídeo do ZIKV possui 122 aminoácidos e é a primeira proteína traduzida na poliproteína viral. Essa proteína possui papel central no processo de montagem da partícula viral, uma vez que interage com o RNA viral e com as regiões transmembranares das proteínas de superfície (SAUMYA *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2020).

A proteína precursora de membrana (prM) protege a proteína do envelope (proteína E) da fusão prematura nas condições de baixo pH durante o transporte viral na rede trans-Golgi. Antes da liberação do virion da célula, a clivagem da proteína prM em proteína de membrana (M) resulta na liberação do peptídeo pr, permitindo o rearranjo de proteínas E em homodímeros e facilitando a maturação do vírion. Foi sugerido que o ZIKV possui uma estrutura semelhante a outros flavivírus conhecidos (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2016; SIROHI *et al.*, 2016).

O envelope do ZIKV é uma glicoproteína de 495 aminoácidos e possui estrutura dimérica em que cada monômero é composto por três domínios: o domínio I (EDI), o II (EDII) e o III (EDIII) (HEINZ; STIASNY, 2017). O EDI está localizado na região central do

monômero e é responsável pela ligação entre o EDII e EDIII, além de estar envolvido na estabilização da orientação do envelope e nas alterações conformacionais durante a infecção da célula (VALENTE; MORAES, 2019). Além disso, a proteína do envelope possui um sítio de glicosilação (Asn154) exposto na superfície do EDI, cuja presença é associada a um aumento da virulência do ZIKV (CARBAUGH; BARIC; LAZEAR, 2019; FONTES-GARFIAS *et al.*, 2017). O EDII encontra-se ligado ao EDI, em que o baixo pH durante a endocitose do vírus expõe a região da alça de fusão, necessária para a fusão entre o vírus e a membrana endossomal (SEVVANA *et al.*, 2020). Essa região é conservada entre as proteínas do envelope dos flavivirus, sendo responsável por uma ampla reatividade cruzada de anticorpos (BERNECK *et al.*, 2020). A proteína E medeia a entrada do vírus na célula por meio do DIII que é o alvo primário dos anticorpos neutralizantes (LEE *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021). As vacinas candidatas atualmente em ensaios pré-clínicos e clínicos utilizam principalmente a proteína E (SHAN; XIE; SHI, 2018), pois anticorpos neutralizantes para a proteína E mostram grande potência na prevenção da infecção por ZIKV em modelos animais (WANG; YAN; GAO, 2017; YANG *et al.*, 2017).

As cepas de ZIKV são divididas em duas linhagens principais, a linhagem africana, que inclui cepas isoladas na África Central e Ocidental, e a linhagem asiática, que inclui cepas isoladas no sudeste da Ásia e na região do Pacífico e as cepas contemporâneas de ZIKV isoladas recentemente das Américas. Existem 59 variações de aminoácidos localizadas ao longo da sequência de poliproteína viral compartilhadas entre as linhagens (WANG *et al.*, 2016).

### **2.1.1 Histórico e epidemiologia**

O ZIKV tem esse nome pois foi isolado pela primeira vez em abril de 1947 na floresta Zika em Uganda durante uma pesquisa apoiada pela Fundação Rockefeller que tinha como objetivo estudar o ciclo do vírus da febre amarela e identificar arbovírus adicionais. Essa pesquisa possibilitou que o ZIKV fosse isolado do sangue de um macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) que apresentava estado febril. Cerca de um ano depois, em janeiro de 1948, ZIKV foi isolado do mosquito *Aedes africanus* que vivia no dossel da mesma floresta, o que demonstrou indícios de que poderia ser uma arbovirose (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; JAMALI MOGHADAM *et al.*, 2016). O primeiro caso de infecção humana caracterizada por ZIKV e o isolamento a partir de humanos ocorreu na Nigéria em 1954 (MACNAMARA, 1954; ZHANG *et al.*, 2016).

Desde a descoberta do ZIKV, foram iniciados inúmeros estudos sorológicos os quais revelaram ampla distribuição geográfica da infecção desse vírus em humanos, em uma região equatorial relativamente estreita, o cinturão que vai da África à Ásia: Senegal, Serra Leoa, Nigéria, Gabão, República Centro-Africana, Egito, Uganda, Tanzânia, Quênia, Paquistão, Índia, Tailândia, Malásia, Vietnã, Indonésia e Filipinas. Em 1966, a primeira cepa não africana de ZIKV, designada P6-740, foi isolada de um pool de mosquitos *A. aegypti* coletados na Malásia (SONG *et al.*, 2017; YUN; LEE, 2017).

Em abril de 2007, depois de sessenta anos, o ZIKV causou o primeiro grande surto fora da África e da Ásia. Esse surto ocorrera na Ilha de Yap, no noroeste do Oceano Pacífico, com manifestação de uma doença relativamente leve caracterizada por febre, erupção cutânea, artralgia e conjuntivite. Entretanto, estudos sorológicos demonstraram que aproximadamente 73% dos 7391 residentes de Yap foram infectados com o ZIKV, mas cerca de 20% apresentaram esses sintomas clínicos (DUFFY *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2017; WEAVER *et al.*, 2016; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

Após o surto de Yap, alguns casos esporádicos foram registrados no Sudeste Asiático, como na Tailândia, Camboja, Malásia, Indonésia e Filipinas (SONG *et al.*, 2017). Até que em 2013 um surto, caracterizado como epidemia de ZIKV, ocorreu em ilhas do Oceano Pacífico, mais especificamente na Polinésia Francesa (BESNARD *et al.*, 2014). Durante este surto, estima-se que cerca de 11% da população total procurou tratamento médico para suspeita de infecção por ZIKV. A magnitude do surto foi provavelmente o resultado de uma combinação do baixo nível de imunidade pré-existente ao vírus e a alta densidade de mosquitos vetores competentes naquela área, tais como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que são comumente encontrados nessa região (AUBRY *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2017). Durante este surto, a síndrome de Guillain-Barré foi pela primeira vez associada ao ZIKV (WEAVER *et al.*, 2016).

No início de 2015, casos de ZIKV foram confirmados em países da América Latina, como Brasil, Colômbia, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Paraguai, Suriname e Venezuela (RASMUSSEN *et al.*, 2016; YUN; LEE, 2017).

No Brasil, principalmente no Nordeste, o número de casos aumentou durante os primeiros meses de 2015, e a doença se espalhou rapidamente por toda a região. No final desse mesmo ano eram entre 440 mil e 1,3 milhões de casos de suspeita de infecção por ZIKV em 14 dos 26 estados brasileiros (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016; WEAVER *et al.*, 2016).

Acredita-se que o ZIKV foi introduzido no Brasil durante os jogos da Copa do Mundo de futebol, realizados no país entre junho e julho de 2014 (ZANLUCA *et al.*, 2015). No

entanto, como nenhum país do Pacífico endêmico do ZIKV participou do torneio, uma segunda hipótese foi levantada, sugerindo que o vírus tenha entrado no Brasil durante o Campeonato Mundial de Sprint de 2014, torneio de canoagem realizado no Rio de Janeiro em agosto de 2014 com a participação de atletas de quatro países do Pacífico onde o ZIKV circulou em 2014 (Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa) (BESNARD *et al.*, 2014).

Durante o surto de ZIKV, o número de recém-nascidos com microcefalia aumentou de forma significativa no Nordeste brasileiro até o final de 2015 e mais de 4000 casos de suspeita de microcefalia foram notificados até fevereiro de 2016 (VICTORA *et al.*, 2016). E até 2022 foram notificados ao Ministério da Saúde 20.874 casos suspeitos de SCZ, sendo que 49,9% desses casos foram confirmados (BRASIL, 2022a).

O ZIKV é uma ameaça factual de pandemia, atualmente circulando não apenas nas ilhas do Pacífico, mas também nas Américas. Além disso, desde o início de 2015, um número crescente de casos de ZIKV foi constatado em países não endêmicos, como Austrália, Bélgica, Canadá, China, França, EUA (Havaí), Itália, Portugal, Espanha, Suíça e Holanda (MUSSO; KO; BAUD, 2019; SONG *et al.*, 2017). E, segundo o Ministério da Saúde, no Brasil foram registrados 6020 casos de Zika em 2021 e, até a vigésima sétima semana epidemiológica de 2022, 9380 casos da doença foram confirmados, sendo 4,4 casos por 100 mil habitantes no país (BRASIL, 2021, 2022b).

Outro fator alarmante é que surto de coronavírus (SARS-CoV-2) ofuscou a ameaça do ZIKV, pois grande parte das pesquisas se voltaram para o combate e prevenção da COVID-19. Como não há vacinas e tratamento para ZIKV e, embora os casos estejam diminuindo, há grande preocupação, principalmente com as mulheres grávidas infectadas pelo ZIKV que podem transmitir o vírus para o feto, causando malformações congênitas (PERGOLIZZI *et al.*, 2021)

Além de que estudos apontam para um novo surto de Zika, em que mutações poderiam desencadear uma disseminação explosiva, pois o ZIKV pode facilmente sofrer alterações genéticas de modo a criar uma nova variante que poderia ser eficaz na transmissão do vírus, mesmo em países que acumularam imunidade de surtos de ZIKV anteriores (REGLA-NAVA *et al.*, 2022).

### 2.1.2 Transmissão

A principal forma de transmissão do ZIKV é a transmissão vetorial e o principal vetor, assim como para o vírus da Dengue, é o mosquito *Aedes aegypti*, que é um mosquito hematófago normalmente ativo durante o dia e com ampla distribuição nas zonas tropicais e subtropicais do globo (SONG *et al.*, 2017). Contudo, muitos outros mosquitos do gênero *Aedes* são considerados vetores em potencial: *A. furcifer*, *A. vittatus*, *A. dalzieli*, *A. metallicus*, *A. hirsutus*, *A. unilinaetus*, *A. africanus*, *A. taylori*, *A. hensillican* e *A. luteocephalus*. Além dos mosquitos do gênero *Aedes*, o ZIKV já foi isolado ou detectado ocasionalmente de espécies de 15 mosquitos de outros gêneros, tais como: *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus*, e *Mansonia uniformis* (ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

A circulação do ZIKV foi documentada em dois ciclos de transmissão ecologicamente e evolutivamente distintos: o ciclo selvagem e o urbano. O primeiro refere-se a um ciclo silvestre, envolvido na manutenção do ZIKV entre primatas não humanos e mosquitos arbóreos nas florestas. Já o ciclo urbano é um ciclo envolvido na transmissão do ZIKV entre humanos e mosquitos urbanos nas cidades (SONG *et al.*, 2017; WEAVER *et al.*, 2016).

Também existem as formas de transmissão não vetorial, como a possibilidade de o ZIKV ser transmitido de mãe para filho durante a gravidez, como evidenciado não apenas pela detecção de RNA viral no líquido amniótico, urina ou soro de mães cujos fetos apresentavam anormalidades cerebrais (MINER *et al.*, 2016). Além de que existe a possibilidade de transmissão pela amamentação, em que RNA/partículas de ZIKV foram detectados no leite materno, sugerindo um risco potencial de transmissão viral através da amamentação (BESNARD *et al.*, 2014). E também há a transmissão por contato sexual, sendo que o ZIKV foi detectado no sêmen de pacientes, e por transfusão sanguínea (ATKINSON *et al.*, 2016; BARZON *et al.*, 2016; AUBRY *et al.*, 2015).

### 2.1.3 Ciclo de replicação e patogênese

O ZIKV é transmitido para humanos no ciclo urbano através da picada de fêmeas de *Aedes spp.* A pele humana é o primeiro contato do vírus com o hospedeiro, sendo o primeiro local da replicação viral. Depois desse primeiro contato, o vírus se espalha para o linfonodo de drenagem, onde é amplificado, resultando em viremia e disseminação hematogênica para tecidos periféricos e órgãos viscerais (BARZON *et al.*, 2016).

A replicação viral ocorre no citoplasma das células infectadas (SWAMINATHAN *et al.*, 2016). Acredita-se que o Domínio III da proteína do Envelope do ZIKV esteja associado à ligação do vírus ao receptor celular através de endocitose mediada por clatrina (LEE *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021). Após a endocitose, o vírus entra na célula por receptores celulares de adesão, tais como a lectina DC-SIGN e muitos membros da família de receptores de fosfatidilserina, ocorre a fusão viral com as membranas endossomais levando ao descolamento da partícula viral e liberação do genoma viral, que é imediatamente traduzido como uma única poliproteína no retículo endoplasmático (RE), onde o genoma de RNA viral é copiado e a poliproteína é processada, gerando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus (HAMEL *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2021).

Na montagem do vírus, os novos genomas são empacotados pela proteína C e se ligam ao prM e ao envelope (E) no lúmen do RE, produzindo vírions imaturos os quais são transportados pelas vias secretoras celulares, onde ocorre a glicosilação E e a clivagem de prM pela furina, protease do hospedeiro, resultando na formação de vírions maduros que são liberados por exocitose. A estrutura dos vírions de ZIKV imaturos têm uma superfície pontiaguda composta por 180 cópias de cada uma das proteínas E e prM associadas com heterodímeros e ancoradas na membrana lipídica de bicamada por meio de suas regiões transmembranares, enquanto os vírions maduros têm uma superfície lisa contendo homodímeros de proteína E antiparalela e proteínas M clivadas que ficam planas no envelope lipídico (PIERSON; DIAMOND, 2012; YUN; LEE, 2017).

As proteínas não estruturais (NS) estão intimamente ligadas ao processo de replicação do ZIKV e algumas participam da evasão do vírus ao sistema imunológico do hospedeiro. (YUN; LEE, 2017). A proteína NS1 possui papel importante para emissão efetiva, virulência e replicação do vírus (CRABTREE; KINNEY; MILLER, 2004; PRYOR; WRIGHT, 1994). Além de que, ao ativar os receptores do tipo TLRs, desacelaram o sistema complemento (YOUNG *et al.*, 2000). NS2A é uma proteína hidrofóbica multifuncional associada à membrana e está envolvida na replicação do RNA (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1989). Além disso, essa proteína desempenha um papel no controle da resposta antiviral interferon e da secreção de partículas virais da célula (LIU *et al.*, 2005, 2006). A NS2B, atua como cofator enzimático, com o domínio de protease C-terminal de NS3, para formar o complexo de serina protease que está envolvido na clivagem da poliproteína viral (MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006). Já NS3 está envolvida no capeamento e síntese de RNA do vírus (BRUENN, 2003). A proteína NS4A serve como fator determinante para a patogênese do vírus e o mecanismo de ação do reconhecimento de seus efeitos (LIANG *et al.*, 2016). Os

constituintes da membrana do complexo de replicação viral são formados por NS4B (BUCKLEY; GOULD, 1988). A NS5 atua na replicação do RNA do citoplasma via RNA polimerase dependente de RNA e capeamento de RNA (BÜGL *et al.*, 2000; BUTCHER *et al.*, 2001).

#### **2.1.4 Manifestações Clínicas**

De início, as características clínicas causadas pelas primeiras infecções causadas por ZIKV consistiam em uma doença semelhante à gripe leve e autolimitada (DUFFY *et al.*, 2009). No entanto, a epidemia de ZIKV detectada em 2015 nas Américas foi associada a doenças graves, incluindo falência de múltipla de órgãos, síndrome de Guillain-Barré e, em gestantes, desenvolvimento anormal do cérebro fetal, resultando em um espectro de distúrbios neurológicos, incluindo microcefalia (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Mesmo o ZIKV tendo se destacado após essas manifestações clínicas mais graves, a maioria dos casos são assintomáticos. Acredita-se que em 80% dos casos a infecção pelo ZIKV é assintomática. Em pacientes com sintomas, a doença se apresenta como uma doença febril que pode ser diagnosticada erroneamente como Dengue ou Chikungunya. Os sintomas ocorrem após um período de incubação de 3 a 12 dias, geralmente são leves e duram de 4 a 7 dias sem complicações graves, sendo caracterizados por erupção cutânea macular ou papular, febre (geralmente de baixo grau), artralgia, fadiga, conjuntivite não purulenta ou hiperemia conjuntival, mialgia e cefaleia, enquanto outros sintomas, como dor retro-orbital, edema, vômito, dor de garganta, uveíte e linfadenopatia, são menos frequentes (DUFFY *et al.*, 2009).

Existem correlações entre a infecção por ZIKV e a síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune grave em que o sistema imunológico ataca parte do sistema nervoso periférico, causando formigamento, fraqueza muscular, paralisia e até morte (CRÉANGE, 2016). A ligação etiológica entre a infecção pelo ZIKV e essa síndrome foi inicialmente sugerida pela coincidência temporal entre os picos de incidência das duas condições clínicas e posteriormente comprovado por estudos soropidemiológicos (BESNARD *et al.*, 2014; BARZON *et al.*, 2016).

Os surtos também mostraram uma associação entre a infecção pelo ZIKV e um conjunto de alterações neurológicas coletivamente chamadas de Síndrome Congênita do Zika, que inclui a microcefalia em recém-nascidos (FREITAS *et al.*, 2020). A microcefalia é uma condição neurológica na qual o cérebro de um bebê não se desenvolve adequadamente,

fazendo com que a cabeça fique menor que o normal (KLASE *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018; PANCHAUD *et al.*, 2016). Também para essa condição, a ligação etiológica foi sugerida pela coincidência temporal do aumento de 20 vezes na incidência de casos de microcefalia em recém-nascidos na Região Nordeste do Brasil (BROUTET *et al.*, 2016). Além dessa associação espaço-temporal, Calvet e colaboradores (2016) demonstraram que o vírus ZIKV ou sua expressão gênica foi detectada no líquido amniótico (CALVET *et al.*, 2016). Também foi detectado presença do vírus em vários tecidos de fetos com microcefalia e naqueles que morreram após o nascimento ou após aborto (BESNARD *et al.*, 2014; DRIGGERS *et al.*, 2016; PACKER *et al.*, 2020). No Brasil, entre os anos de 2015 e 2022, foram notificados ao Ministério da Saúde 20.874 casos suspeitos de Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (BRASIL, 2022a).

Também foram relatadas outras condições neurológicas associadas à infecção pelo ZIKV, como demonstrado em casos de meningoencefalite aguda (CARTEAUX *et al.*, 2016). E mielite, em que o RNA do ZIKV foi detectado e/ou isolado em cultura de células do líquido cefalorraquidiano (MÉCHARLES *et al.*, 2016).

### **2.1.5 Diagnóstico, tratamento e prevenção**

O diagnóstico preciso da doença Zika deve ser feito por meio de testes laboratoriais, visto que há sobreposição dos sintomas com outras arboviroses o que gera grande dificuldade em distinguir as manifestações clínicas (BARZON *et al.*, 2016).

Os testes diagnósticos comerciais para detecção de ZIKV disponíveis são baseados em diagnóstico laboratorial, podendo ser a detecção do vírus e/ou componentes virais por RT-PCR, imunoensaio e isolamento de vírus que foram desenvolvidos para detectar RNA de ZIKV, proteínas virais (particularmente NS1) e vírus vivos, respectivamente (DUFFY *et al.*, 2009; LANCIOTTI *et al.*, 2008). No entanto, a confirmação pela amplificação (RT-PCR) do genoma viral é limitada devido à cinética da viremia (PETERSEN *et al.*, 2016).

Outro tipo de diagnóstico laboratorial que poder ser realizado é baseado na detecção de anticorpos IgM induzidos pela infecção pelo ZIKV (LANCIOTTI *et al.*, 2008). A principal limitação dos atuais ensaios sorológicos é a reatividade cruzada de anticorpos derivados de diferentes infecções por flavivírus (SHAN *et al.*, 2016).

Quanto ao tratamento, não existe nenhuma terapia clinicamente aprovada para o ZIKV, assim como para a maioria dos flavivírus (SHAN *et al.*, 2016). Entretanto, alguns cuidados de suporte, incluindo repouso, administração de antipiréticos e analgésicos, ingestão

de líquidos e observação da presença de coagulopatia e tratamento dessa condição podem auxiliar no tratamento da doença (SHUAIB *et al.*, 2016).

Além do mais, algumas estratégias podem ser adotadas para auxiliar no tratamento antiviral do ZIKV, tais como o reaproveitamento de medicamentos antivirais existentes, que foram desenvolvidos anteriormente para outras indicações de doenças (JOHANSEN *et al.*, 2015), e o desenvolvimento de inibidores da infecção e replicação do ZIKV (WANG *et al.*, 2015).

Assim como não existem tratamentos aprovados e específicos contra o ZIKV, também não existem, até o momento, vacinas disponíveis para a prevenção da doença (DA SILVA *et al.*, 2018). Sem vacina ou terapia antiviral atualmente no mercado, as medidas preventivas devem se concentrar na tentativa de erradicação do vetor de transmissão, como o *A. aegypti*.

No entanto, como a circulação do mosquito nas Américas é alta, é difícil uma logística precisa para erradicação do vetor, dessa forma o controle do vetor pode ser feito por meio uso de repelentes, evitar picadas de mosquito durante o dia, ar-condicionado, telas de janelas/portas e remoção de detritos domésticos e recipientes de água, que fornecem locais de reprodução do mosquito. Indivíduos infectados com ZIKV, chikungunya ou vírus da dengue devem ser protegidos de exposição adicional ao mosquito, especialmente durante os primeiros dias da doença para evitar que outros mosquitos sejam infectados e reduzir o risco de transmissão local (SHUAIB *et al.*, 2016; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

### **2.1.6 Vacinas para *Zika virus***

Uma vez que não existem tratamentos específicos ou formas de prevenção que sejam clinicamente aprovados para a infecção pelo ZIKV, destaca-se a urgência para o desenvolvimento de vacinas que sejam seguras e eficazes (BERNATCHEZ *et al.*, 2020). Algumas vacinas foram eficazes para prevenção de outros flavivirus que estão intimamente ligados ao ZIKV, tal como o vírus da Febre Amarela (RICHNER *et al.*, 2017). Entretanto, a busca de vacinas candidatas para ZIKV só iniciou após o surto de infecção e sequelas preocupantes causadas pelo vírus (SHAN *et al.*, 2016).

Até o momento, as plataformas mais exploradas para o desenvolvimento de vacinas contra ZIKV incluem partículas virais inativadas, vacinas baseadas em ácido nucleico (DNA e RNA), vacinas de partículas semelhantes a vírus, vacinas de vetores vivos (por exemplo, vetores baseados em adenovírus recombinante) e vacinas de proteína de subunidade (MORRISON; DIAMOND, 2017; TRIPP; ROSS, 2016).

Os estudos pré-clínicos demonstraram a eficácia de duas vacinas de DNA que expressam as proteínas PrM e E de ZIKV as quais se mostraram preventivas e terapêuticas, pois induziram altos títulos de anticorpos neutralizantes e os animais foram completamente protegidos contra os desafios com ZIKV (LAROCCA *et al.*, 2016). Segundo o Clinical Trials, até então existem 75 estudos em fase clínica para vacinas contra ZIKV, sendo que 22 em fase I, 4 em fase II e 2 em fase III (CLINICALTRIALS, 2022).

Uma vacina eficaz e segura contra o ZIKV tem o potencial de proteger mais de 2 bilhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas. O relatório mais recente do Observatório Global de Pesquisa e Desenvolvimento em Saúde da OMS lista alguns projetos ainda em andamento para o desenvolvimento de uma vacina contra ZIKV. Dos projetos listados na OMS, seis têm como alvo as proteínas de membrana e envelope e dois usaram vírus atenuados vivos como imunógeno. Existem vacinas que estão sendo estudadas em ensaios clínicos de fase II como por exemplo a baseada no mRNA-1325 (Moderna Therapeutics-NCT03014089) e o VRC-ZKADNA085-00-VP patrocinado pelo NIH-NIAID (NCT03110770) (GAUDINSKI *et al.*, 2018; MODJARRAD *et al.*, 2018; TEBAS *et al.*, 2021).

Uma das principais necessidades da vacinologia gira em torno do desenvolvimento de novos adjuvantes (imunoestimulantes) e sistemas de entrega vacinais. Muitas das vacinas que estão em desenvolvimento são baseadas em subunidades purificadas, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos, componentes bem definidos que são geralmente bastante seguros. No entanto, frequentemente podem ser pouco imunogênicos e, portanto, requerem o uso de adjuvantes e sistemas de administração para induzir respostas imunes ideais (AKAGI; BABA; AKASHI, 2011).

## 2.2 NANOPARTÍCULAS

Os últimos anos testemunharam um crescimento de pesquisas e aplicações na área de nanociência e nanotecnologia. Dessa forma, produtos nanotecnológicos são utilizados na ciência de alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e medicina, neste último trazendo avanços significativos no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças (KUMAR *et al.*, 2012).

As nanopartículas (NPs) são definidas como partículas nanométricas com uma dimensão que varia entre 1 e 1000 nm (MOHANRAJ; CHEN, 2007). As nanopartículas já desenvolvidas possuem vastas funções e sua composição pode variar (OLIVIER, 2005). Os

materiais para produção das NPs podem ser de origem biológica, como fosfolipídios, lipídios, ácido láctico, dextrano, quitosana e outros polímeros, como carbono, sílica e metais (DE JONG; BORM, 2008).

Na medicina, as nanopartículas podem ser aplicadas como sistemas de entrega de medicamentos, especialmente em terapias contra cânceres, diagnósticos *in vitro* e *in vivo*, produção de materiais biocompatíveis, engenharia de tecidos, ou antígenos específicos (como sistema de entrega vacinal) (CHOW; HO, 2013; DUNCAN, 2003; FERRARI, 2005; KOUCHAKZADEH; SAFAVI; SHOJAOSADATI, 2015).

O uso de nanopartículas em formulações de vacinas permite não apenas maior imunogenicidade e estabilidade do antígeno, mas também entrega direcionada e liberação lenta, possibilitando o aumento de respostas imunes celulares e humorais. Essa vantagem é atribuível devido à propriedade adjuvante das NPs, pois o tamanho das partículas em nanoescala, pode facilitar a internalização pelas Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), levando a um reconhecimento e apresentação eficientes de antígenos tornando uma plataforma biocompatível com absorção e eficiência aprimoradas em comparação com o tratamento convencional, como por exemplo, as vacinas padrão (CHOW; HO, 2013).

Além disso, a grande área de superfície das nanopartículas possui diferentes frações de direcionamento que permitem a entrega de antígenos a receptores específicos na superfície celular, estimulando assim respostas imunes seletivas e específicas (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019).

A escolha do material de composição das NPs é importante pois eles são capazes de controlar e manter a liberação do antígeno por meio da modulação de características de liberação e de degradação da partícula de modo a aumentar a sua eficácia (MOHANRAJ; CHEN, 2007).

Nesse contexto, as nanopartículas poliméricas, principalmente as biodegradáveis, estão sendo muito utilizadas como carreadoras de fármacos e outras substâncias (PATIL; PANYAM, 2009). Biopolímeros são polímeros produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, que são classificados em três grupos: polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Exemplos de biopolímeros que podem ser usados na fabricação de nanopartículas biocompatíveis são: proteínas (seda, colágeno, gelatina,  $\beta$ -caseína e albumina) e polissacarídeos (quitosano, alginato, amido e heparina). Ao passo que, polímeros biodegradáveis são aqueles que, por ação de organismos vivos, são decompostos, pelo menos parcialmente (NITTA; NUMATA, 2013).

Além disso, as NPs poliméricas representam um avanço em relação aos métodos tradicionais de administração em termos de eficiência e eficácia. Conforme Marcató e Durán (2008), essas partículas ajudam a aumentar a estabilidade de drogas/proteínas, possuem propriedades úteis de liberação controlada e permitem o encapsulamento de moléculas bioativas e as protegem contra a degradação enzimática e hidrolítica (MOHANRAJ; CHEN, 2007).

Em relação à tecnologia de vacinas, as NPs poliméricas são de imenso interesse na entrega de vacinas devido a algumas propriedades interessantes, como biocompatibilidade, previsibilidade, biodegradação, estabilidade, fácil modificação de superfície e segurança. Os sistemas de entrega baseados em polímeros oferecem algumas vantagens, como liberação sustentada, protegem o antígeno encapsulado do ambiente hostil e degradação enzimática, entrega direcionada e têm efeitos adjuvantes. Numerosas NPs poliméricas foram investigadas para o avanço de vacinas e amplamente utilizadas para a entrega de antígenos encapsulados (KHEIROLLAHPOUR *et al.*, 2019).

As nanopartículas proteicas apresentam uma série de vantagens em relação às de polímeros sintéticos, por exemplo, elas são metabolizáveis pelas enzimas digestivas em péptidos inócuos, apresentam vários mecanismos de interação química (atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e ligação covalente), além de oferecerem várias possibilidades para a modificação da superfície devido à presença de grupos funcionais em sua superfície (o que pode permitir o direcionamento específico para sítios de interesse no organismo) (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; NITTA; NUMATA, 2013).

### **2.2.1 Nanopartículas de albumina sérica**

Como parte dessas vantagens, a proteína albumina tem potencial para produção de nanopartículas, pois é uma proteína carreadora versátil para liberação de fármacos, tem se mostrado não tóxica, biocompatível e biodegradável. Portanto, pode ser considerada um material ideal para fabricar nanopartículas para entrega de drogas e também chamam atenção devido à sua alta capacidade de ligação de várias drogas e serem bem toleradas sem efeitos colaterais graves (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012).

Além disso, as nanopartículas de albumina podem ser facilmente preparadas em condições suaves por coacervação, dessolvatação controlada ou formação de emulsão. Elas apresentam tamanho menor (50 a 300 nm) em comparação com micropartículas e, em geral,

melhores propriedades de liberação controlada, comparada aos lipossomas (WEBER; KREUTER; LANGER, 2000).

A albumina é uma proteína plasmática que pode ser encontrada na clara de ovo, no soro bovino (albumina sérica bovina, BSA) e no soro humano. A albumina sérica humana (HSA) é a principal proteína plasmática com um peso molecular de 66,5 kDa. Alta estabilidade em pH (entre 4 a 9) e temperaturas menores que 60 °C, captação preferencial em tecido tumoral e inflamado, biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade e circulação sanguínea adequada. Possui meia-vida de 19 dias, o que faz das albuminas um material ideal como um transportador de entrega de drogas (KRATZ, 2008). Além disso, a HSA exibe alta capacidade de ligação devido aos múltiplos sítios de ligação do fármaco. Assim, não apenas o carregamento não covalente de drogas, mas também a derivatização covalente de nanopartículas de albumina com ligante de direcionamento de drogas é possível (STEINHAUSER *et al.*, 2008).

A albumina sérica bovina (BSA), possui peso molecular de aproximadamente 69 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 4,7 em água (a 25°C), podendo ser utilizada para liberação de fármacos e possui importância médica devido a sua abundância, baixo custo, facilidade de purificação, propriedades incomuns de ligação ao ligante e sua ampla aceitação na indústria farmacêutica (HU *et al.*, 2006).

As nanopartículas de albumina oferecem várias vantagens específicas: são biodegradáveis, fáceis de preparar e reprodutíveis. Devido à alta ligação proteica de diversos fármacos, a matriz de nanopartículas de albumina pode ser utilizada para incorporação efetiva desses compostos (WARTLICK *et al.*, 2008).

Em nosso grupo de pesquisa, nanopartículas de albumina sérica bovina (NP-BSA) demonstraram potencial em atuar como sistema de entrega de antígenos e ativação do sistema imunológico contra microrganismos, como *Dengue virus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MARIA DE SOUZA MORAIS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012).

O uso dessas nanopartículas como plataforma vacinal contra Dengue foi capaz de induzir alto título de anticorpos IgG anti-DENV, mostrando que camundongos imunizados com NPs-BSA tiveram ativação da resposta imune. No entanto, esses anticorpos possuíam baixa ação neutralizante contra os quatro sorotipos de DENV (SILVA *et al.*, 2012).

Além do mais, o uso das formulações de NPs-BSA foi capaz de proteger os camundongos da infecção de *P. aeruginosa*, causada pela cepa não patogênica (RODRIGUES *et al.*, 2013). Isso também foi observado em um estudo que utilizou a cepa patogênica PA14, em que as NPs-BSA contribuíram para a eliminação da bactéria dos pulmões, o que

consequentemente refletiu na sobrevivência dos animais. Esses resultados indicam que essa plataforma vacinal tem potencial em atuar como sistema de entrega de antígenos e ativação do sistema imunológico (MARIA DE SOUZA MORAIS *et al.*, 2018).

Nosso grupo também demonstrou o potencial adjuvante das NPs-BSA, as quais mostraram papel pró-inflamatório ao serem administradas na pele de camundongos. Esses resultados foram importantes para estabelecer que as NPs-BSA podem ser caracterizadas como sistema de entrega de antígeno (DA SILVA *et al.*, 2018).

A produção de anticorpos também foi observada quando camundongos foram imunizados com BSA-NPs misturados com ZIKV inativado, o que induziu anticorpos anti-ZIKV. No entanto, futuros estudos devem ser realizados para avaliar a atividade neutralizante desses anticorpos e também para verificar o potencial desta formulação em induzir um efeito protetor resposta em um modelo animal de infecção por ZIKV (SOUZA, *et al.*, 2019).

Em nosso laboratório foi desenvolvida um tipo de NP mimética a vírus, preparada a partir de BSA através do método de co-acervação, associadas com ácido poliinosínico-policitidílico poli (I:C) (NPPI) (VIEIRA-JUNIOR, J. C. V., 2021). As nanopartículas miméticas a patógenos são biosistemas inovadores de imitações naturais que podem ser usados para uma ampla gama de aplicações biomédicas. Esse tipo de nanopartículas tem sido amplamente utilizadas na biotecnologia de vacinas pois além de não apresentarem patogenicidade, elas podem estar associadas à maximização da resposta imune (NOAD; ROY, 2003; RIITHO *et al.*, 2017).

O ácido polininosínico:policitidílico (poli I:C) é um RNA sintético de fita dupla (dsRNA), que é usado experimentalmente para mimetizar infecções virais *in vivo*. O dsRNA é um padrão molecular associado à infecção viral que é reconhecido por receptores de padrão molecular (FORTIER *et al.*, 2004). O poli (I:C) ativa os receptores de reconhecimento de padrões TLR3, RIG-I/MDA5 e PKR, induzindo assim a sinalização por várias vias inflamatórias, incluindo as vias de indução da ativação do NF- $\kappa$ B e dos fatores regulatórios de interferon (IRF). O poli (I:C) pode estimular a liberação de citocinas inflamatórias e, ao induzir a produção de interferon-gama, pode aumentar o número e as atividades tumoricidas de várias células imunológicas (PALCHETTI *et al.*, 2015).

Dessa forma, considerando o potencial adjuvante das NPPI e a necessidade de desenvolvimento de formulações vacinais para a prevenção da infecção pelo ZIKV, o presente projeto busca caracterizar e validar o potencial vacinal das NPPI em associação com o domínio III da proteína do envelope do ZIKV.

### 3.3 MODELOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PARA ESTUDO DO *Zika virus*

Entre os modelos experimentais utilizados para estudos com ZIKV, os modelos de roedores forneceram muitas respostas na investigação da infecção pelo ZIKV durante o neurodesenvolvimento embrionário e fetal. Modelos animais que utilizam camundongos imunocompetentes ou deficientes para o sistema interferon são importantes ferramentas para a compreensão da biologia e da patogênese viral e para a avaliação de candidatos vacinais e fármacos com atividade antiviral (MORRISON; DIAMOND, 2017).

Animais imunocompetentes utilizados como modelo de estudo de infecção pelo ZIKV se mostraram resistentes à maioria dos sinais clínicos da doença. Camundongos BALB/c e fêmeas de C57BL/6 adultos não apresentaram nenhum sinal de patologia, apesar do vírus ser detectado no sague e em tecidos vaginais desses animais, respectivamente (LAROCCA *et al.*, 2016; YOCKEY *et al.*, 2016). Já machos de C57BL/6 demonstraram lesões nos testículos e orquite, com detecção e permanência do ZIKV em tecidos testiculares (MA *et al.*, 2016).

Os camundongos C57Bl/6 são um ótimo modelo animal experimental devido à alta reprodutibilidade de dados. De modo geral, as características desse animal favorecem o uso em pesquisas na área de imunologia, oncologia, obesidade entre outras categorias (SONG *et al.*, 2017; SONG; HWANG, 2017). Esta linhagem animal possui uma resposta protetora frente a infecção do ZIKV, uma vez que animais adultos de 5 a 6 semanas infectados não demonstram sintomas clínicos. Apesar de C57Bl/6 serem resistentes a infecção pelo ZIKV, existem formas de utilizar outras abordagens, como o modelo de animais neonatos, os quais infectados possuem um desenvolvimento gradual dos sintomas e em um intervalo de suas semanas apresentam sintomas como ataxia, hiperatividade, desequilíbrio entre outros (DONG; LIANG, 2018). Além de que camundongos C57Bl/6 com silenciamento na expressão de receptores Interferon não possuem essa resposta, e devido a essa característica, esses animais desenvolvem manifestações de neurodegeneração mais severas quando comparado aos camundongos imunocompetentes (MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016).

Outros estudos mostraram não haver sinais de doença, baixa detecção de vírus infeccioso e RNA viral em tecidos de camundongos C57Bl/6, BALB/c ou CD-1 do tipo selvagem (WT) infectados com isolados africanos e asiáticos de ZIKV, incluindo cepas de Polinésia Francesa, Brasil ou Porto Rico (LAROCCA *et al.*, 2016).

Consistente com esses experimentos em camundongos, a análise bioquímica mostrou que o ZIKV antagoniza a resposta do interferon tipo I humano (IFN), por meio de sua

proteína NS5, que promove a degradação do, um fator de transcrição que medeia a sinalização pelo receptor de IFN tipo I (IFNAR). Dessa forma, as células humanas ficam mais susceptíveis a replicação viral e desenvolvimento de efeitos citopáticos. No entanto, a NS5 não promove degradação de STAT2 murina, o que pode explicar por que linhagens de camundongos imunocompetentes geralmente são resistentes à infecção e doença por ZIKV STAT2 (GRANT *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2016).

Neste contexto, os primeiros modelos animais para o estudo da patogênese do ZIKV utilizaram animais imunocomprometidos. Dessa forma, os camundongos com deficiências genéticas na via de sinalização do IFN tipo I apresentam maior suscetibilidade à infecção por flavivírus, inclusive o ZIKV (JOHNSON; ROEHRIG, 1999; LEE; LOBIGS, 2002; MEIER *et al.*, 2009; SAMUEL; DIAMOND, 2005; SHRESTA *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2014).

Diante disso, como camundongos imunocompetentes apresentam resistência à infecção pelo ZIKV, vários grupos avaliaram a capacidade de camundongos com deficiências imunes inatas em favorecer a replicação do ZIKV e induzir sintomas clínicos nesses animais. Camundongos sem o gene *Ifnar1*, incluindo camundongos A129 e camundongos C57BL/6 *Ifnar1*<sup>-/-</sup>, ou camundongos deficientes em *Irf3*, *Irf5* e *Irf7* (*Irf3*<sup>-/-</sup> *Irf5*<sup>-/-</sup> *Irf7*<sup>-/-</sup>, fatores de transcrição de nocaute triplo [TKO]) desenvolveram doença grave, incluindo fraqueza dos membros posteriores, paralisia e morte, após inoculação subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa de africanos (MR 766 ou Dakar 1984), asiáticos (H/PF/2013) ou cepas americanas (Brasil Paraíba\_2015) de ZIKV (DOWALL *et al.*, 2016; LAZEAR *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram observados após a inoculação intraperitoneal de ZIKV Dakar 1984 em camundongos WT C57BL/6 tratados com um anticorpo bloqueador monoclonal (MAb) anti-IFNAR1 em momentos antes e após a inoculação do vírus (SMITH *et al.*, 2017).

A infecção por ZIKV também foi realizada em camundongos BALB/c com imunodeficiências adquiridas (CHAN *et al.*, 2016), que foram tratados com o esteróide imunossupressor dexametasona por 3 dias antes e 9 dias após a inoculação intraperitoneal com uma cepa de ZIKV porto-riquenha (PRVABC59). Os resultados observados incluem perda de peso, viremia e infecção disseminada, com RNA viral e antígeno detectados em muitos tecidos, incluindo cérebro, rim, testículo e baço. A retirada da dexametasona 9 dias após a infecção levou à rápida deterioração dos camundongos que foi associada à inflamação e lesão no cérebro, rim e testículo (CHAN *et al.*, 2016). Usando este modelo, os autores mostraram que a administração de IFN tipo I exógeno poderia melhorar o desfecho clínico.

Este modelo de imunossupressão induzida por dexametasona pode ter utilidade para investigar mecanismos de danos associados à resposta imune do hospedeiro e contramedidas para infecção por ZIKV. No entanto, os modelos imunocomprometidos não oferecem uma análise aprofundada da resposta imunológica natural ou da resposta imune frente à um estímulo vacinal. Dessa forma, alguns modelos surgiram utilizando animais imunocompetentes, como por exemplo o modelo de infecção em camundongos neonatos. Os animais neonatos imunocompetente podem ser úteis, pois os principais processos de desenvolvimento do cérebro em roedores ocorrem após o nascimento, em contraste com o caso de humanos, onde ocorrem durante o terceiro trimestre do desenvolvimento fetal (SEMPLE *et al.*, 2013). Assim sendo, a infecção desses animais nos primeiros dias pós-natal pode contribuir para a disseminação do vírus às células progenitoras neurais, levando a uma neurodegeneração semelhante à observada em crianças com a síndrome congênita do Zika (LI *et al.*, 2018).

A infecção de camundongos C57BL/6 WT de 7 a 8 dias de idade com ZIKV Dakar 41519 ou ZIKV H/PF/2013 por injeção subcutânea ou intraperitoneal resultou em patologia do sistema nervoso central e letalidade parcial (LAZEAR *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016b). Em comparação, a inoculação subcutânea de camundongos WT C57Bl/6 com 1 dia de idade com ZIKV PRVABC59 resultou em doença neurológica não fatal caracterizada por tremores, ataxia e convulsões que se desenvolveram 2 semanas depois. Esses sinais da doença foram associados à infecção pelo ZIKV no cérebro, neurodegeneração no cerebelo e infiltração do tecido cerebral com células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016).

Camundongos Swiss recém-nascidos inoculados por via subcutânea ou intracraniana com ZIKV cepa SPH 2015, um isolado clínico brasileiro (CUNHA *et al.*, 2016), também apresentaram letargia, ataxia e paralisia com evidência de infecção por ZIKV no cérebro (FERNANDES *et al.*, 2017). Diante deste contexto, a infecção por ZIKV de camundongos neonatos pode ser usada para definir mecanismos de patogênese como uma alternativa ao estudo de camundongos adultos imunocomprometidos. Além disso, a infecção por ZIKV de camundongos WT neonatais, nos quais um subgrupo sobrevive, pode permitir a avaliação de sequelas comportamentais e de desenvolvimento neurológico de longo prazo associadas à infecção por ZIKV do cérebro em maturação (MORRISON; DIAMOND, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterizar e validar o efeito adjuvante de uma formulação preparada de nanopartículas compostas de albumina sérica bovina e ácido poliinosínico-policidílico (NPPI) quando adicionadas a uma solução contendo o domínio III da proteína do envelope do ZIKV (zEDIII) verificando se são capazes de induzir anticorpos neutralizantes.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho se propões a:

- a) avaliar e quantificar a produção de anticorpos IgG anti-zEDIII em camundongos imunizados com as NPPI e zEDIII (NPPI+zEDIII);
- b) avaliar a presença de anticorpos neutralizantes em animais imunizados com NPPI+zEDIII;
- c) avaliar a capacidade de proteção, por transferência passiva dos soros dos animais imunizados, em modelos de infecção experimental por ZIKV.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKV

A sequência de nucleotídeos para zEDIII foi obtida a partir do genoma de ZIKV isolado no Brasil (Número de Acesso GENBANK: MH882541). O peptídeo referente ao domínio III da proteína do envelope do ZIKV (zEDIII) foi doado pelo Professor Jonatas Santos Abrahão do Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O grau de pureza e concentração da proteína foram avaliados por gel de poliacrilamida corada por Coomassie Brilliant Blue e pelo método do Ácido bicinconínico (BCA), respectivamente.

### 4.2 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

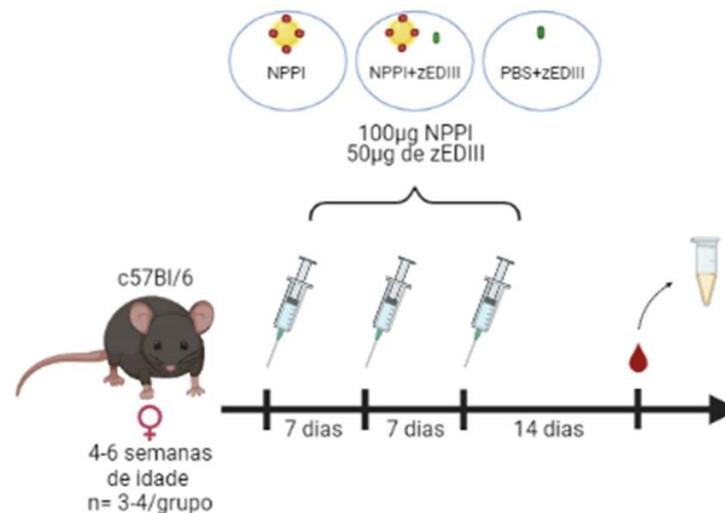
Para a produção de nanopartículas de albumina sérica bovina estéreis contendo ácido polinosínico-policitidílico (Poli I:C) encapsulado (NP+Poli I:C - NPPI), 200 µL de uma solução aquosa estéril de Poli I:C a 5 mg/mL foram adicionados a 1 mL de solução aquosa estéril de BSA 2% e mantido sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida foi realizada a etapa de dessolvatação, que consiste na adição de álcool etílico absoluto gota a gota sob agitação. Após a formação da nanopartícula contendo Poli I:C, foi realizado a ligação cruzada através da adição de 25 µL de glutaraldeído a 25%. A solução foi mantida sob agitação magnética por 2 horas à temperatura ambiente. Ao término do tempo necessário para promover a ligação cruzada, as NPPI foram transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis e submetidas à centrifugação a 10000 rpm durante 15 minutos. Os sedimentos foram lavados uma vez com 1 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) estéril, centrifugado novamente conforme as condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em tampão fosfato-salino (PBS) na concentração de 10 mg/mL. Todos os procedimentos descritos foram realizados em cabine de segurança biológica classe II A2 (VIEIRA-JUNIOR, 2021).

### 4.3 ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO ANIMAL

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 4-6 semanas de idade (n=3-4/grupo) foram adquiridas do biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e mantidos com acesso livre a ração e água. Os animais foram subdivididos nos seguintes grupos: 1) nanopartículas compostas de BSA associadas ao Poli (I:C) com adição do antígeno zEDIII

(NPPI+zEDIII). Nesse grupo os animais foram imunizados com 100 µg de NPPI e 50 µg de zEDIII em um volume final de 100 µL; 2) nanopartículas compostas de BSA associadas ao Poli (I:C) (NPPI). Nesse grupo os animais foram imunizados com 100 µg de NPPI e em um volume final de 100 µL; e 3) PBS+zEDIII. Nesse grupo os animais foram imunizados com 50 µg de zEDIII em um volume final de 100 µL. A imunização dos animais foi realizada pela via subcutânea em intervalos de 7 dias nos dias 0, 7 e 14 com 100 µL. Após 14 dias da última dose de imunização, os camundongos foram anestesiados com 100 µL de uma solução de PBS contendo Cetamina (60 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) (Agener União, Brasil) pela via subcutânea. O sangue foi coletado pela veia submandibular (FIGURA 1). Após a coleta do sangue, este foi mantido a 4 °C por 1 hora, e em seguida centrifugado a 3600 rpm durante 10 minutos. O soro foi recolhido e congelado a -20 °C até o momento de realização do ELISA e dos ensaios de soroneutralização. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas (Nº de protocolo: 0009/2020).

Figura 1 - Representação esquemática do protocolo de imunização dos animais.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 4.4 ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO E TITULAÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-zEDIII

Os soros dos camundongos foram analisados quanto às respostas de anticorpos específicos para zEDIII ZIKV por ELISA. A proteína zEDIII foi diluída na concentração de

2 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato (0,1M pH 9,6) e utilizada para a sensibilização da placa de ELISA de 96 poços Nunc MaxiSorp® (eBIOSCIENCE, EUA). Foram adicionados 100 µL da solução por poço, e a placa incubada por 16 horas a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada por três vezes com solução de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween-20, PBS-T) e em seguida bloqueada com 200 µL de PBS contendo 5% de leite em pó (Molico®, Nestlé) e 0,05% Tween-20 por 2 horas a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem e depois foram acrescentados os soros dos animais na concentração de 1:50 em PBS-T em um volume final de 100 µL. Logo após, incubou-se a placa por uma hora a 37°C. Após incubação e nova lavagem com PBS-T, adicionou-se 100 µL por poço de anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SigmaAldrich, EUA) diluídos a 1:5000 em solução de PBS-T. A placa foi incubada por 60 minutos a 37°C e novamente lavada por mais três vezes com a solução de lavagem. Posteriormente foi acrescentado 100 µL por poço de uma solução de Tetrametilbenzidina - TMB (Sigma-Aldrich, EUA) preparada em tampão citrato/fosfato (0,1M de Ácido Cítrico; 0,1M de Fosfato de Sódio; pH 4,5) acrescentado de 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e após este tempo foi realizada a leitura da densidade ótica em leitor de microplacas (Leitor de Elisa AnthosZenyth 200rt) em comprimento de onda de 450 nm. O ponto de corte (*cut-off*) foi calculado através da média da densidade ótica obtida nos animais que receberam apenas a administração de PBS (controle negativo) somada a duas vezes o valor do desvio padrão obtido para este grupo.

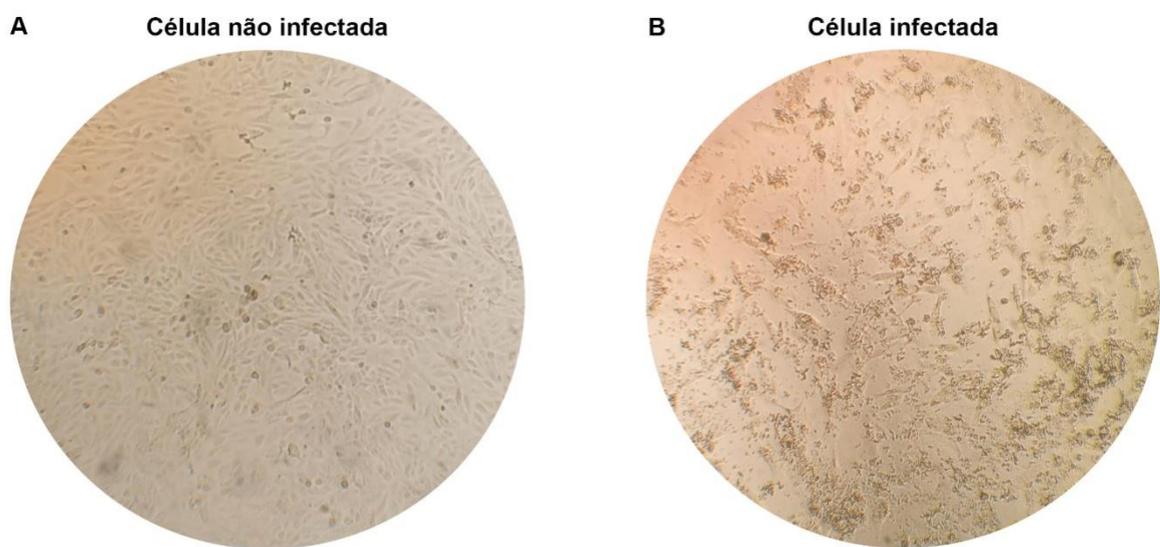
Também foi realizada a titulação dos anticorpos presentes nas amostras, e para isso, diluiu-se os soros dos animais de cada grupo de maneira seriada, com concentrações variando de 1:50 a 1:3200. O valor de corte foi definido como a média das leituras de absorbância do controle negativo (animais tratados com PBS) mais duas vezes o desvio padrão. O título registrado foi o inverso da maior diluição de cada amostra de soro que apresentou reatividade acima do valor de corte.

#### 4.5 PRODUÇÃO E TITULAÇÃO DO ZIKV

A cepa de *Zika virus* (BRPE243/2015) foi inoculada em monocamadas de células VERO em garrafas de cultura em uma multiplicidade de infecção de 0,01 e após 5-7 dias de infecção e desenvolvimento do efeito citopático característico, o sobrenadante foi coletado, clarificado por centrifugação. Para titulação do ZIKV, foi feita a diluição seriada (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> do sobrenadante coletado em meio mínimo de Eagle (MEM) contendo 1% de soro fetal

bovino · Posteriormente, descartou-se o meio da placa de 96 poços contendo monocamada de células VERO feita no dia anterior e então foram adicionados 100  $\mu$ L referentes as diluições por poço na placa e incubadas em um intervalo de 48 horas. O título viral foi determinado por meio da presença ou não do efeito citopático (FIGURA 2). Como o controle de células, foram adicionados 100  $\mu$ L de meio MEM contendo 1% de soro fetal bovino em cada poço. O cálculo do título viral foi feito por meio do método de Reed–Muench (REED, 1938) e expresso em 50% da dose infectante para culturas de tecido por ml (TCID<sub>50</sub>/ml).

Figura 2 - Efeito citopático causado pelo *Zika virus* em monocamada de células VERO.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: Representação do efeito citopático causado pelo *Zika virus* em monocamada de células VERO. (A) Células não infectadas. (B) Células infectadas, demonstrando o efeito citopático do ZIKV nessas células.

#### 4.6 SORONEUTRALIZAÇÃO

A detecção dos anticorpos específicos e neutralizantes no soro dos animais foi feita de acordo com o protocolo de ensaio de microneutralização viral (BONAPARTE *et al.*, 2020; MOORE *et al.*, 2017). O soro contendo os anticorpos foram incubados a 56°C por 30 minutos para inativação do sistema complemento. Em seguida, as amostras foram diluídas seriadamente nas diluições 1:20, 1:40; 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640 em meio mínimo de Eagle (MEM) contendo 1% de soro fetal bovino. Foram transferidos 50  $\mu$ L de cada diluição para uma placa de 96 poços e incubados por 1 hora com 50  $\mu$ L de ZIKV contendo 200 TCID<sub>50</sub>. Posteriormente, os soros provenientes da incubação com o vírus foram transferidos para os

poços de uma placa de 96 poços contendo monocamada de células VERO, com aproximadamente  $2 \times 10^4$  células/poço, e incubados em um intervalo de 5 a 6 dias. Após o intervalo de incubação, o título viral foi determinado por meio da presença ou não do efeito citopático característico (FIGURA 2). Os títulos de neutralização (NT) foram expressos como a recíproca da maior diluição do soro capaz de inibir o efeito citopático em comparação com o controle de vírus (células infectadas com 200 TCID<sub>50</sub>). Títulos maiores ou iguais a 1:20 foram considerados positivos. Em cada teste foram utilizados controles positivos e negativos de soroneutralização.

#### 4.7 ANÁLISE DO POTENCIAL PROTETOR DAS NANOPARTÍCULAS EM MODELO DE CAMUNDONGOS NEONATOS

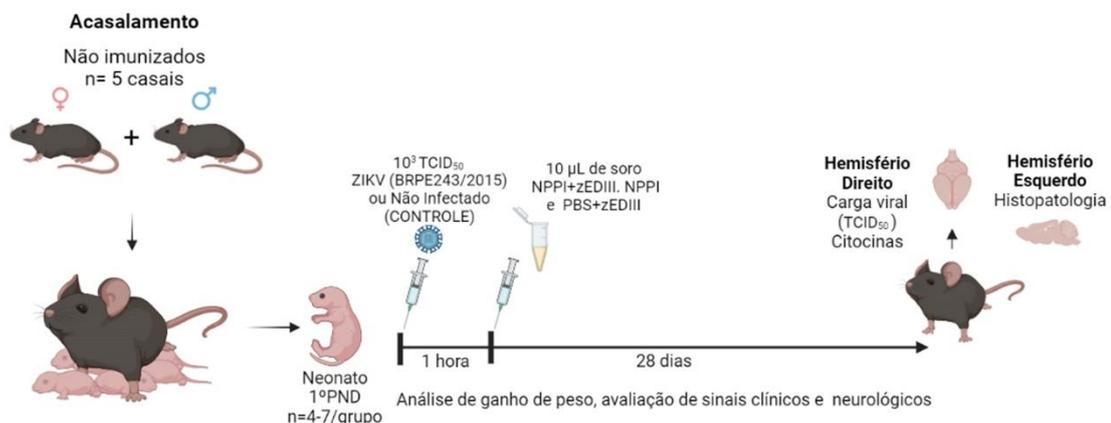
Para avaliar o potencial protetor da imunização, foi utilizado o modelo de infecção em neonatos (LI *et al.*, 2018; MANANGEESWARAN *et al.*, 2016). Camundongos C57Bl/6 de um dia de idade são extremamente sensíveis a infecção pelo ZIKV e desenvolvem alterações físicas neurológicas visíveis e alta carga viral em diversos órgãos, portanto são considerados um excelente modelo para avaliar a eficácia protetora das vacinas ZIKV.

A fim de verificar se os anticorpos produzidos após a imunização dos animais podem proteger os neonatos que receberam passivamente os anticorpos (transferência) após a infecção por ZIKV, camundongos fêmeos C57BL/6 não imunizados foram colocados para acasalar (n= 5 casais). Os neonatos (1 dia de idade – n= 4-7/grupo) foram infectados com ZIKV e após uma hora da infecção, receberam de forma passiva o soro de animais previamente imunizados.

Deste modo, esse modelo foi aplicado para avaliação do potencial protetor das nanopartículas no modelo de transferência passiva de anticorpos, em que cada neonato no 1º primeiro dia pós-natal (PND) foram infectados com  $10^3$  TCID<sub>50</sub> de ZIKV pela via intraperitoneal. Após 1 hora da infecção, cada animal de cada grupo recebeu 10 µL de soros dos animais previamente imunizados com NPPI+zEDIII, NPPI e PBS+zEDIII. Como controle de animais infectados (grupo ZIKV), foi administrado em cada neonato 10 µL de meio Eagle (MEM) contendo 1% de soro fetal bovino e, como controle não-infectado (grupo CONTROLE), foi administrado 10 µL soro de animais não imunizados (soro PBS) em cada neonato.

Os camundongos foram avaliados todos os dias em relação ao peso corporal, sinais clínicos e neurológicos durante 28 dias após a infecção ou até sua morte. O exame incluiu aparência, postura e mobilidade. Foi também avaliada a evidência de tremores, hiperatividade (aumento do esforço motor e excitabilidade), postura (aumento da extensão das patas traseiras em pé ou andando), marcha escalonada (evidência de pausas incomuns durante o movimento), colapso do membro (refere-se ao colapso momentâneo do membro sob o peso do corpo), convulsões (perda parcial do movimento voluntário com evidência de rigidez e/ou contração tônica das patas traseiras), paralisia flácida (perda do tônus muscular com colapso das extremidades inferiores) (BRANCHE *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2021). Os animais moribundos ou que apresentaram pontuação maior ou igual a 6, conforme o Quadro 1, foram eutanasiados imediatamente por administração excessiva de anestésico (150  $\mu$ l de Cetamina a 100 mg/ml e 50  $\mu$ l de Xilazina a 20 mg/ml por animal). Os cérebros foram removidos asépticamente para a realização de ensaios de determinação da quantificação da carga viral, sendo que o hemisfério direito do cérebro foi processado para extração de RNA, quantificação da carga viral (TCID<sub>50</sub>/miligrama de cérebro) e quantificação de citocinas. Já o hemisfério esquerdo foi fixado para o estudo histopatológico através da técnica de hematoxilina-eosina (FIGURA 3).

Figura 3 - Representação esquemática da transferência passiva de anticorpos aos neonatos seguida da infecção.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

#### 4.8 ANÁLISE CLÍNICA

Após a infecção, os camundongos foram pesados e observados quanto a sinais clínicos e pontuados diariamente. As pontuações clínicas referentes ao escore clínico foram baseadas na aparência, mobilidade e atitude do camundongo em uma escala de 7 pontos,

sendo 1 - saudável; 2 - pouco arrepiado; 3 - arrepiado; 4 - Doente; 5 - Muito doente; 6 - Eutanásia; e 7 - Morte (Quadro 1). Os animais que tiveram características relacionadas ao *score* (pontuação) maior ou igual a 6 foram imediatamente eutanasiados (BRANCHE, *et al*, 2019).

Quadro 1 - Pontuação utilizada para avaliação clínica dos animais infectados.

PONTUAÇÃO	INICIAIS	DESCRIÇÃO	APARÊNCIA	MOBILIDADE	ATITUDE
1	S	Saudável	Revestimento liso. Olhos brilhantes.	Ativo, apressado, escavando	Alerta
2	PA	Pouco arrepiado	Pelos pouco arrepiados (geralmente apenas em torno da cabeça e pescoço)	Ativo, apressado, escavando	Alerta
3	A	Arrepiado	Pelo arrepiado por todo o corpo	Ativo, apressado, escavando.	Alerta
4	D	Doente	Arrepiado, Olhos ligeiramente fechados	Andando, mas sem correr	Levemente letárgico
5	MD	Muito doente	Muito arrepiado e olhos fechados	Lento a nenhum movimento. Retornará à posição vertical se colocado de lado	Extremamen te letárgico
6	E	Eutanásia	Muito arrepiado. Olhos fechados. Moribundo exigindo eutanásia humanitária	Nenhum movimento ou movimentos espásticos incontroláveis. NÃO retornará à posição vertical se colocado de lado	Completa mente inconscient e ou em perigo perceptível
7	M	Morte	---	---	---

Fonte: BRANCHE *et al.*, 2019.

#### 4.9 ANÁLISE NEUROLÓGICA

Para avaliar os sinais clínicos relacionados a movimentação e locomoção dos animais, foi calculado o *score* neurológico analisando os sintomas aparentes de cada membro do animal, que foi designado da seguinte forma: 0 - sem sinal de alteração (normal); 1 - fraqueza ou marcha alterada; 2 - paresia; 3 - paralisia total. A pontuação de um camundongo neonato

foi calculada como a soma das pontuações dos quatro membros. Assim, a pontuação máxima de um animal examinado será 12 (YU *et al.*, 2021).

#### 4.10 ANÁLISE DA CARGA VIRAL PRESENTE NAS AMOSTRAS DE CÉREBRO DE CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM IMUNIZAÇÃO PASSIVA

Após a coleta do cérebro, o hemisfério direito foi pesado e macerado manualmente com pistões estéreis em 500µL de PBS estéril gelado até que os homogenatos uniformes fossem obtidos e congeladas a -80°C. Com o intuito de avaliar a carga viral presente nas amostras, descongelou-se o macerado de cérebro e este foi centrifugado a 4°C por 5000 rpm em 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar o título viral (TCID<sub>50</sub>/mg de cérebro) utilizando a técnica de TCID<sub>50</sub>. Para isso, foi feita a diluição seriada (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> do sobrenadante coletado em meio mínimo de Eagle (MEM) contendo 1% de soro fetal bovino. Posteriormente, descartou-se o meio da placa de 96 poços contendo monocamada de células VERO feita no dia anterior e então foram adicionados 100 µL referentes as diluições por poço na placa e incubadas em um intervalo de 5 a 6 dias. Como controle de vírus, foram utilizados 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>/poço e como o controle de células, foi adicionado 100 µL de meio MEM contendo 1% de soro fetal bovino em cada poço. Após o intervalo de incubação, o título viral presente nas amostras de cérebro foi determinado por meio da presença ou não do efeito citopático característico. O cálculo do título viral foi feito pelo método de Reed–Muench (LEI *et al.*, 2021; REED; MUENCH, 1938).

#### 4.11 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NO CÉREBRO DOS ANIMAIS

As suspensões do hemisfério direito do cérebro foram centrifugadas a 2655 g durante 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos e congelados a -80 °C para posterior dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10 por citometria de fluxo utilizando o kit BD Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, EUA), e o equipamento BD FACSCalibur (BD Biosciences, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Essa análise foi realizada na Universidade Federal de Ouro Preto.

#### 4.12 HISTOPATOLOGIA

Os hemisférios esquerdos dos camundongos foram coletados e fixados à temperatura ambiente, utilizando formaldeído 10% diluído em PBS. Posteriormente, foram desidratados e diafanizados em um gradiente crescente de etanol e xilol, e incluídos em parafina histológica. Secções sagitais de 5  $\mu\text{m}$  foram obtidas em micrótomo rotativo e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram examinados sob microscópio óptico AxioCam ICc3 (Zeiss, Alemanha) e as imagens foram capturadas utilizando-se o programa AxioVision (Zeiss, Alemanha), nos aumentos de 20x, 40x e 100x.

#### 4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

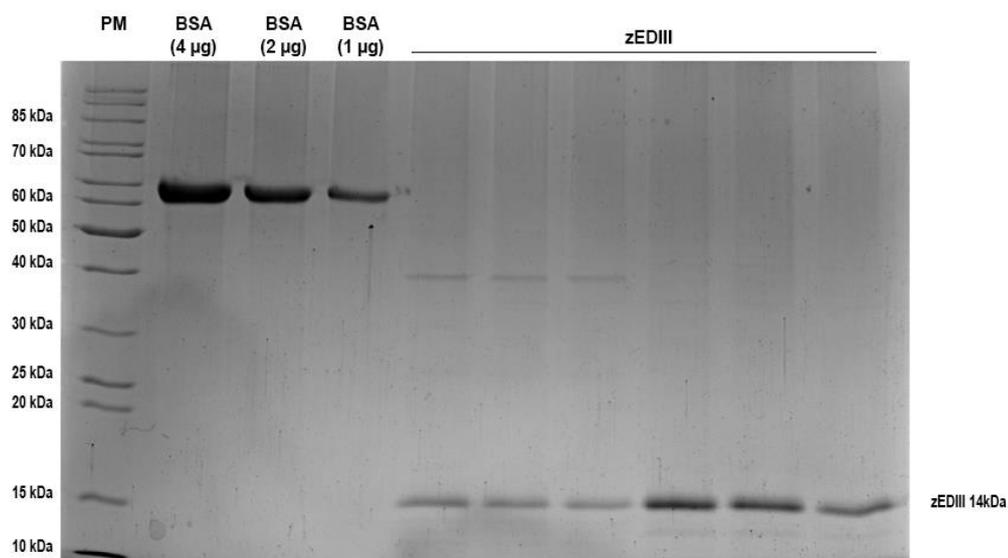
As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism® 7.0. As análises foram feitas utilizando a análise de variância, seguido de um pós teste de Tukey. A análise estatística da curva de mortalidade (curva de Kaplan Meier) foi realizada utilizando o teste de Teste de Log-rank (Mantel-cox). O nível mínimo de significância aceito foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO zEDIII

A proteína zEDIII, derivada do domínio III do envelope do *Zika virus* foi expressa e purificada no Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Após a sua purificação, essa proteína foi enviada para o Laboratório de Vacinas da UNIFAL-MG. A quantificação da proteína recebida foi realizada pelo método de BCA e o resultado demonstra que a proteína possui uma concentração de 1,2 mg/mL. O perfil eletroforético da proteína pode ser visualizado na Figura 4, onde se verifica que o tamanho molecular de zEDIII é de aproximadamente 14kDa.

Figura 4 - Perfil eletroforético da proteína zEDIII.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

### 5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-zEDIII EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA ASSOCIADAS AO ÁCIDO POLIINOSÍNICO-POLICITIDÍLICO COM OU SEM A PRESENÇA DA PROTEÍNA zEDIII

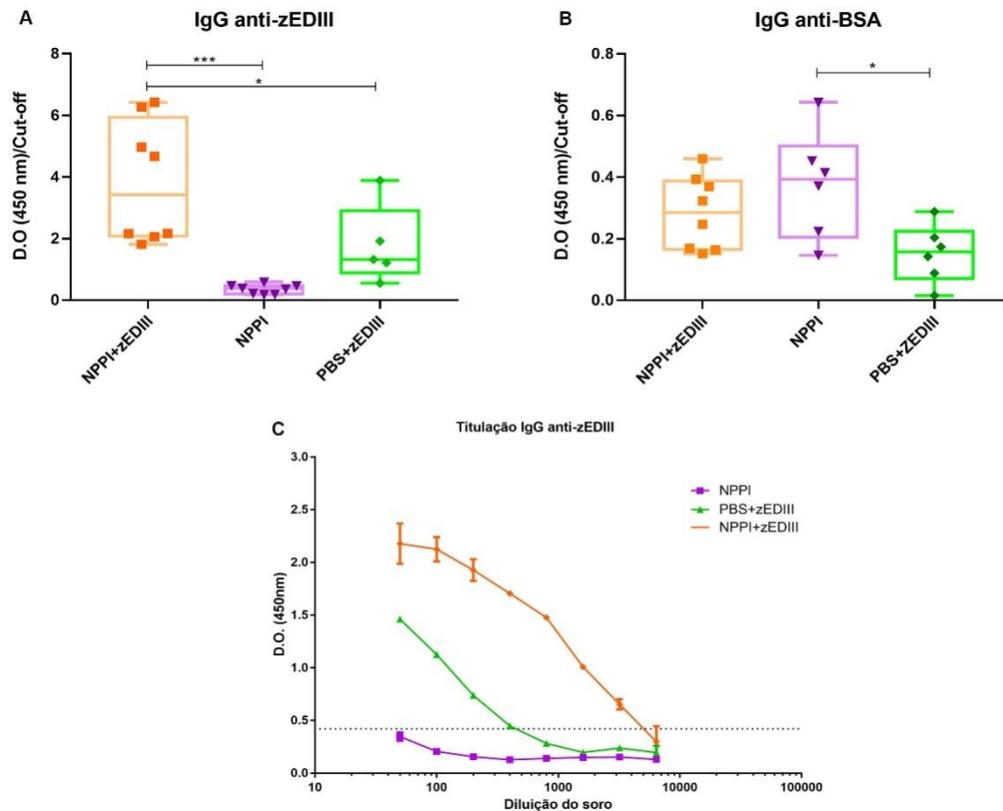
Para avaliar a imunogenicidade das NPPI associadas à proteína zEDIII, fêmeas de camundongos C57Bl/6 foram imunizadas seguindo o cronograma de imunização e os níveis

de anticorpos específicos para a proteína zEDIII (IgG anti-zEDIII) presente no soro desses camundongos foram quantificados. De acordo com a Figura 5A foi possível observar que os animais imunizados com NPPI+zEDIII apresentaram produção significativa de anticorpos IgG anti-zEDIII ( $3,82 \pm 1,978$ ) em relação aos grupos NPPI ( $0,3632 \pm 0,1505$ ) ( $p=0,0002$ ) e PBS+zEDIII ( $1,782 \pm 1,274$ ) ( $p=0,0455$ ).

Já com relação aos anticorpos IgG anti-BSA, observou-se que os animais imunizados com NPPI ( $0,3757 \pm 0,1758$ ) apresentaram uma produção significativamente maior se comparado com os animais imunizados com PBS+zEDIII ( $0,1522 + 0,094$ ) ( $p=0,0242$ ), como mostrado na Figura 5B. Apesar dessa diferença é importante notar que todas as amostras analisadas apresentaram uma relação D.O./cut-off menor do que 1, indicando a ausência de produção significativa de anticorpos anti-BSA pela imunização na presença das nanopartículas.

Ensaio imunoenzimático realizado para determinar a titulação de anticorpos anti-zEDIII mostraram que os animais imunizados com NPPI+zEDIII e PBS+zEDIII apresentaram título de 3200 e 400, respectivamente. O título de anticorpos IgG anti-zEDIII não foi detectado nos animais imunizados com apenas NPPI (FIGURA 5C) e tabela 1.

Figura 5 - Produção e titulação de anticorpos IgG anti-zEDIII e IgG anti-BSA em camundongos imunizados com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido polinosínico-policitidílico na presença de zEDIII.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).  
 Legenda: Camundongos C57Bl/6 foram imunizados de acordo com o cronograma indicado e os soros foram coletados 2 semanas após a última imunização. (A) Produção de anticorpos IgG anti-zEDIII; (B) Produção de anticorpos IgG anti-BSA; (C) Curvas de titulação representativas de diluição de anticorpos para análises de anticorpos IgG anti-zEDIII. Os soros dos animais imunizados foram misturados em volumes iguais e titulados. Cada diluição foi feita em triplicata. A linha pontilhada representa ponto de corte (cut-off) calculado a partir do uso de soros de animais controle (inoculados apenas com PBS). Os gráficos representam os dados obtidos a partir de dois experimentos de imunização independentes. (one-way ANOVA). (\*)  $p < 0,05$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Os dados foram expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão.

Tabela 1 - Títulos de anticorpos IgG anti-ZEDIII no soro de camundongos C57BL/6 após imunização com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido polinosínico-policitidílico na presença de zEDIII.

	NPPi	PBS+zEDIII	NPPi+zEDIII
Título IgG anti-zEDIII	ND	400	3200

Fonte: Elaborado pela autora (2022).  
 Legenda: ND: não detectado

A fim de verificar se esses anticorpos possuem ação neutralizante, foram feitos testes de soroneutralização, o que indicou presença de anticorpos com atividade neutralizante no soro destes animais (TABELA 2). Sendo assim, os soros derivados de camundongos imunizados com NPPI, PBS+zEDIII e NPPI+zEDIII apresentaram título de anticorpos neutralizantes, conforme mostrado na Tabela 2. Os valores de  $p$  referentes às diferenças estatísticas estão mostrados na nota da Tabela 2.

Tabela 2 - Títulos de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos.

	Título de anticorpo neutralizante
NPPI	60 ± 23,09 <sup>a</sup>
PBS+zEDIII	90 ± 50,33
NPPI+zEDIII	220 ± 120 <sup>a</sup>

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: a:  $p=0,0381$  NPPI comparado a NPPI + zEDIII.

Nota: A tabela representa resultados de dois experimentos independentes. (one-way ANOVA). Os dados foram expressos em Média + Desvio Padrão.

### 5.3 NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA ASSOCIADAS AO ÁCIDO POLIINOSÍNICO-POLICITIDÍLICO COM PRESENÇA DO ANTÍGENO zEDIII INDUZIRAM PROTEÇÃO PASSIVA EM CAMUNDONGOS NEONATOS INFECTADOS COM *Zika virus*

Para investigar a atividade neutralizante das NPPI *in vivo*, camundongos neonatos de um dia de idade foram infectados pela via intraperitoneal com  $10^3$  TCID<sub>50</sub> de *Zika virus* e, após uma hora, os soros dos animais previamente imunizados foram transferidos passivamente aos neonatos e estes foram acompanhados durante 28 dias.

Os animais foram observados e avaliados quanto alterações de peso corporal, tamanho, sobrevivência e sinais clínicos de doença. O gráfico da Figura 6A mostra a curva de ganho de peso dos animais, em que fica perceptível a queda do ganho de peso no grupo infectado com ZIKV a partir do 10º dia pós-natal (PND). Embora a curva referente aos animais do grupo PBS+zEDIII siga o mesmo padrão que os grupos (CONTROLE,

NPPI+zEDIII e NPPI) é possível verificar uma tendência da redução do peso dos animais desse grupo.

A fim de comparar o ganho de peso entre os grupos, foram realizadas as análises desse ganho de peso a cada 7 dias. Dessa forma, as análises estatísticas foram feitas com relação aos 7°, 14°, 17°, 21° e 28° PND. O 17° PND foi escolhido por ser um dia crítico para o grupo ZIKV, caracterizado pela morte dos animais deste grupo. Dessa forma, não houve diferenças estatísticas entre os grupos quanto as alterações do ganho de peso no 7° PND e 14°PND, como mostrado na Figura 6B e 6C.

A partir do 17° PND há redução significativa do ganho de peso entre os animais do grupo ZIKV ( $2,703 \pm 0,4561$ ) em relação aos grupos CONTROLE ( $4,568 \pm 0,3699$ ) sendo  $p=0,0041$ , NPPI+zEDIII ( $4,925 \pm 0,9649$ )  $p<0,0003$ , NPPI ( $6,018 \pm 0,477$ )  $p<0,0001$  e PBS+zEDIII ( $4,441 \pm 0,2319$ )  $p=0,0031$ . Também neste dia de análise, houveram diferenças estatísticas significativas para NPPI e CONTROLE ( $p=0,0176$ ) e PBS+zEDIII ( $p=0,0031$ ) (FIGURA 6D).

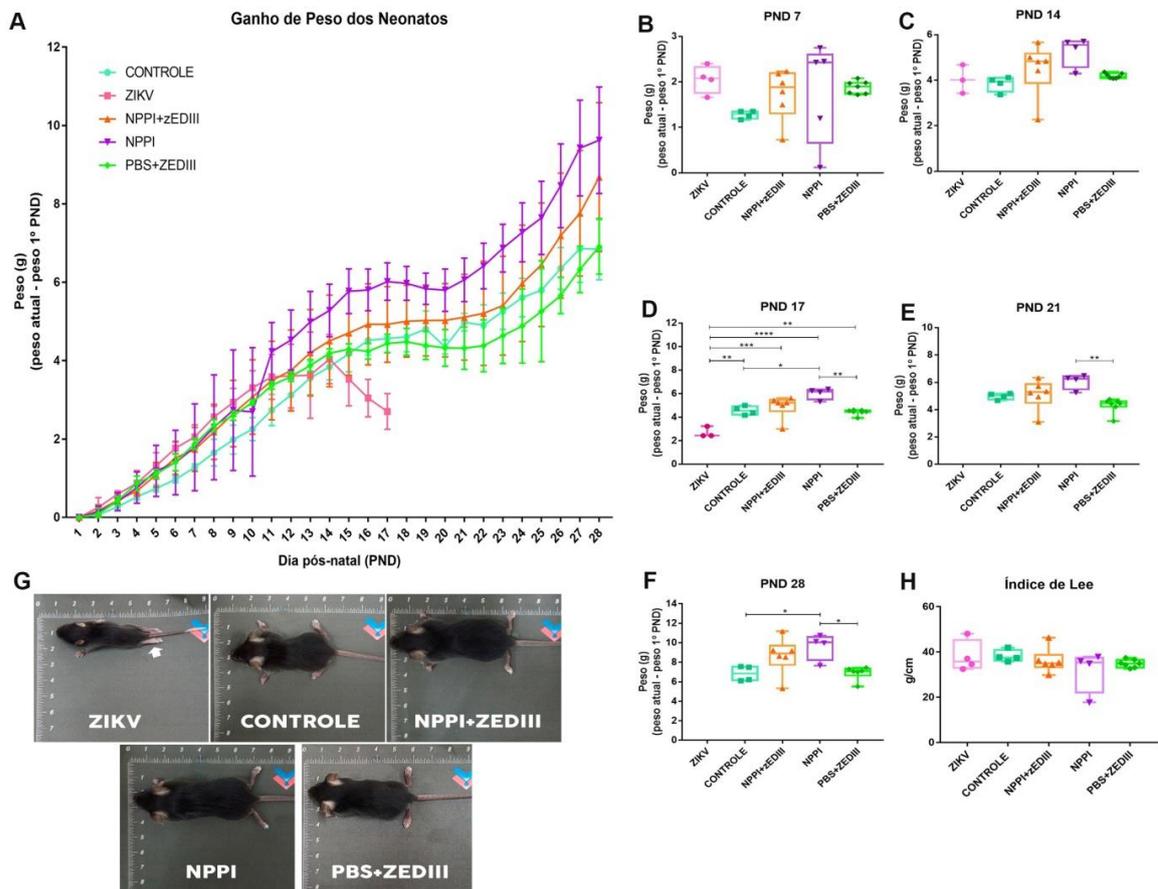
No 21° dia pós-natal (21° PND), os animais do grupo PBS+zEDIII ( $4,319 \pm 0,537$ ) apresentaram menor ganho de peso comparados ao grupo NPPI ( $6,063 \pm 0,553$ ) ( $p=0,0061$ ) (FIGURA 6E). Já no 28° PND, as diferenças estatísticas entre o grupo NPPI ( $9,625 \pm 1,359$ ) comparado aos grupos CONTROLE ( $6,85 \pm 0,7869$ ) e PBS+zEDIII ( $6,908 \pm 0,7006$ ), sendo valores de  $p=0,0404$  e  $p=0,0265$ , respectivamente (FIGURA 6F).

Após 10 dias da infecção, os camundongos do grupo ZIKV desenvolveram marcha instável com tremores, atrofia dos membros inferiores e ataxia (seta em branco). Isso foi seguido por mobilidade reduzida, colapso alternado intermitente dos membros posteriores, perda de equilíbrio e convulsões (FIGURA 6G) (Link dos vídeos: [ZIKV 12° PND](#), [ZIKV 14° PND](#), [ZIKV 17° PND](#)). Em contrapartida, os animais do grupo CONTROLE e os animais do grupo NPPI+zEDIII não apresentaram esse tipo de sintoma e não desenvolveram paralisia flácida dos membros posteriores ou sucumbiram à infecção, como mostra a Figura 6G (Link dos vídeos: [CONTROLE 17°PND](#), [NPPI+zEDIII 17° PND](#)). Já os grupos NPPI e PBS+zEDIII, apenas um animal em cada um dos grupos apresentou manifestação desses sintomas (Link dos vídeos: [NPPI 9° PND](#), [PBS+zEDIII 20° PND](#)).

Para avaliar se a imunização passiva com as NPs foi capaz de reduzir os danos causados pela infecção em relação a redução do crescimento, os animais foram medidos quanto ao comprimento naso-anal e naso-caudal. Entretanto, as medidas foram realizadas no dia de morte ou eutanásia e alguns camundongos morreram antes do tempo estipulado para o final do experimento. Como a análise do comprimento naso-anal foi feita em dias diferentes,

foi realizado o cálculo do Índice de Lee, o qual objetiva avaliar o grau de adiposidade corporal, sendo considerado um análogo do índice de massa corporal em humanos (BERNARDIS;PATTERSON, 1968). Como o Índice de Lee calcula o peso em função do tamanho do animal, ele independe do dia em que as análises foram feitas e assim possibilita a normalização desses dados. Dessa forma, as estatísticas apontam que não houve diferença estatística significativa do Índice de Lee em relação aos grupos sendo as médias do grupo ZIKV ( $38,06 \pm 6,934$ ), CONTROLE ( $38,2 \pm 2,622$ ), NPPI + zEDIII ( $36,1 \pm 5,443$ ), NPPI ( $31,63 \pm 9,354$ ) e PBS+zEDIII ( $34,86 \pm 1,712$ ) como observado na Figura 6H.

Figura 6 - A imunização passiva reverte a perda de peso e a paralisia dos membros causada pela infecção do ZIKV em neonatos de camundongos C57Bl/6.

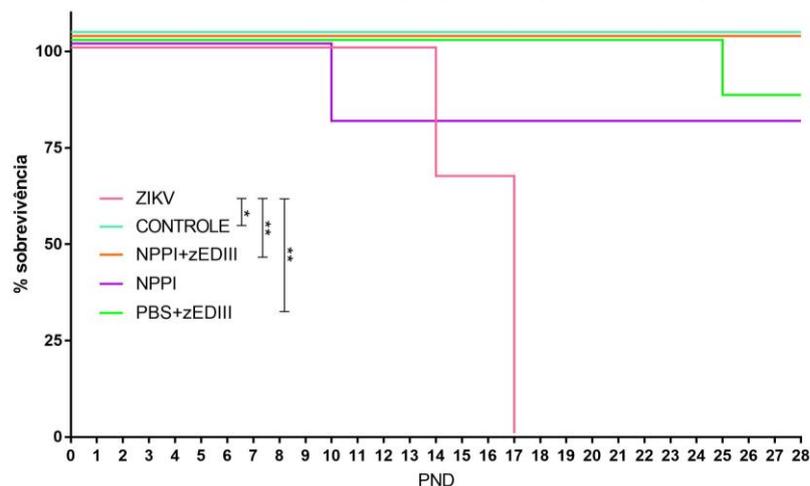


Fonte: Eleborada pela autora (2022).

Legenda: (A) Curva representativa referente ao do ganho de peso dos neonatos. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre o peso atual e o peso inicial (dia 01). Média do ganho de peso nos (B) 7º PND, (C) 14º PND, (D) 17º PND, (E) 21º PND e (F) 28º PND. (G) Imagens representativas dos animais no dia da eutanásia ou morte. Seta em branco indica alteração nos membros inferiores dos filhotes. (H) Índice de Lee. CONTROLE (n=4), ZIKV (n=4), NPPI+zEDIII (n=6), NPPI (n=5) e PBS+zEDIII (n=7). (one-way ANOVA). (\*)  $p < 0,05$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$ . (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ . Os dados foram expressos em Média + Desvio Padrão.

Com o intuito de analisar o efeito protetor que os anticorpos causariam nos filhotes infectados com ZIKV, estes foram observados diariamente quanto a sobrevivência e sinais clínicos de doença. No período de 28 dias após a infecção seguida de imunização passiva, 100% dos animais dos grupos CONTROLE e NPPI+zEDIII permaneceram vivos. Em contrapartida, no grupo ZIKV, 100% dos animais haviam falecido no 17º PND. No grupo de animais que receberam NPPI, 80% permaneceram vivos até o último dia de análise. E cerca de 85,71% dos animais do grupo PBS+zEDIII permaneceram vivos até o 28º PND. A sobrevivência dos animais do grupo ZIKV foi significativamente menor se comparado com a sobrevivência dos animais imunizados com NPPI+zEDIII ( $p=0,0033$ ), comparado ao grupo PBS+zEDIII ( $p=0,0016$ ) e ao grupo CONTROLE ( $p=0,0140$ ), como mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Curva de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV.



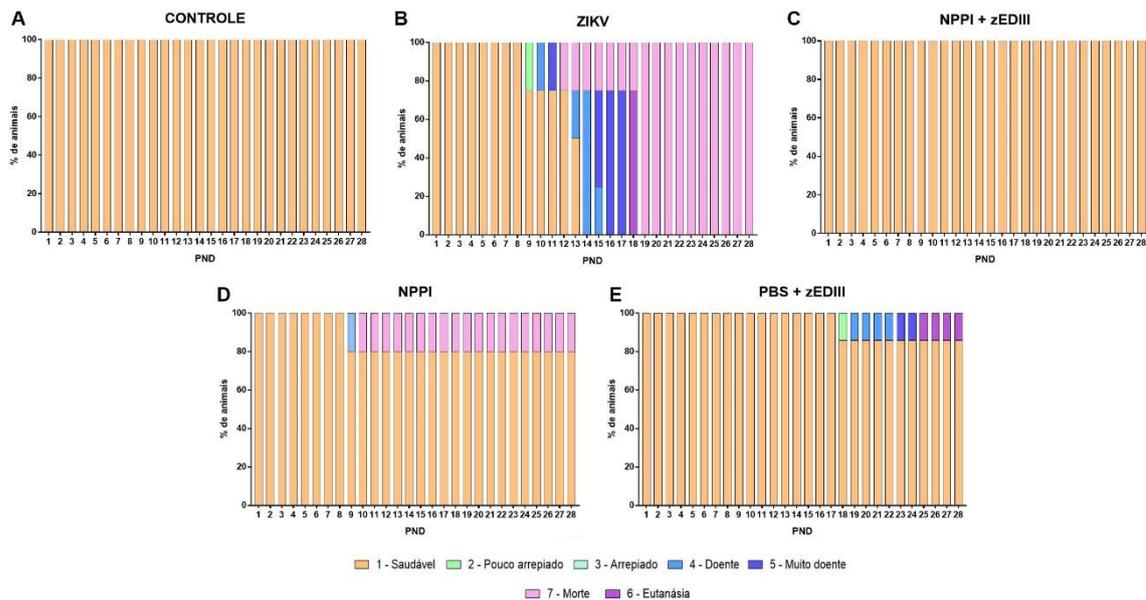
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: CONTROLE (n=4), ZIKV (n=4), NPPI+zEDIII (n=6), NPPI (n=5) e PBS+zEDIII (n=7).  
(Curva de Kaplan-Meier- Teste de Log-rank (Mantel-cox).  
(\*)  $p<0,05$ . (\*\*)  $p<0,001$ .

A Figura 8 mostra a evolução do quadro clínico dos animais em cada grupo. As manifestações de quadros de gravidade da doença foram observadas principalmente nos animais do grupo ZIKV a partir do 9º PND, em que esses animais apresentaram mobilidade reduzida em comparação com o grupo de controle, com mudança de peso diferente e resultados de pontuação clínica ao longo do período de observação de 17 dias. Nos grupos CONTROLE e NPPI+zEDIII, 100% dos animais permaneceram sem nenhuma manifestação de sinais clínicos durante os 28 dias de acompanhamento. Em contrapartida, 20% dos animais do grupo NPPI e 14,28% do grupo PBS+zEDIII apresentaram sintomas clínicos, no entanto a

evolução destes ocorreu de forma gradual, diferente do que aconteceu com os animais do grupo ZIKV.

Figura 8 - Evolução dos sinais clínicos da doença pelos camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV.



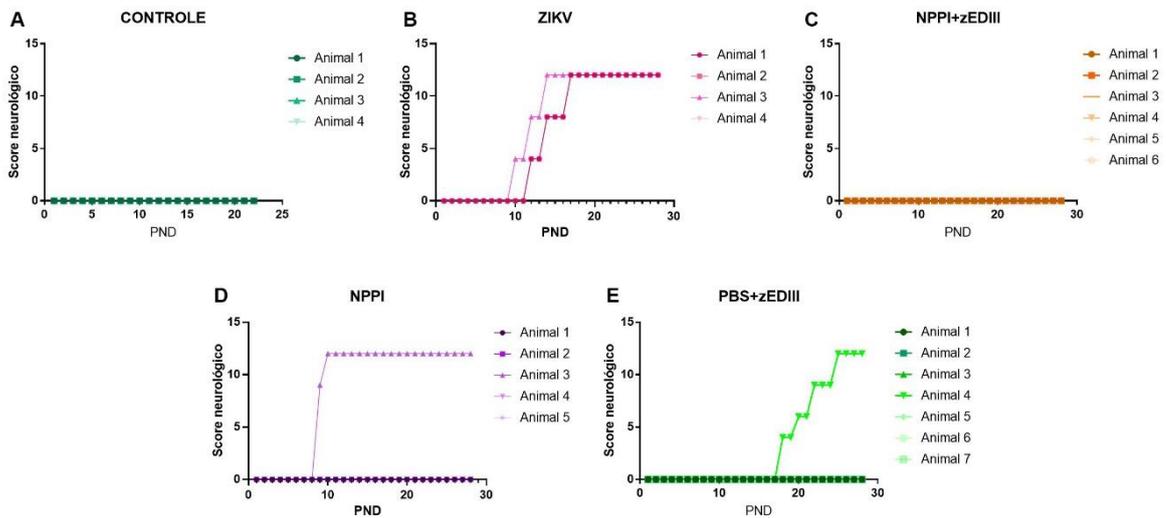
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: Os escores (score) referentes as pontuações clínicas estão na legenda da figura. As barras representam a porcentagem de animais e suas respectivas pontuações. CONTROLE (n=4), ZIKV (n=4), NPPI+zEDIII (n=6), NPPI (n=5) e PBS+zEDIII (n=7).

Para avaliar as manifestações neurológicas da doença, foi feita a análise da evolução do quadro neurológico por meio da pontuação de *score* neurológico. Os sinais avaliados foram relacionados a movimentação e locomoção dos filhotes, tais como fraqueza dos membros, dificuldade de locomoção, paresia e paralisia dos membros. Todos os camundongos dos grupos CONTROLE e NPPI+zEDIII não apresentaram anormalidade neurológica ao longo do experimento (pontuação 0). Entretanto, os animais do grupo ZIKV começaram a desenvolver esses sinais a partir do 9º PND (pontuação 4) e ao longo dos dias houve o agravamento do quadro sendo que no 17º PND obtiveram pontuação máxima (pontuação 12). O único animal do grupo NPPI apresentou os primeiros sinais a partir do 8º PND (pontuação 8) e no 10º PND pontuação máximo (pontuação 12). Já o animal do grupo PBS+zEDIII mostrou-se sintomático no 17º PND (pontuação 4) com evolução gradual dos sinais, em que

as pontuações nos 20º PND e 24 PND foram 6 e 9, respectivamente e no 25º PND apresentou pontuação 12. (FIGURA 9).

Figura 9 - Evolução dos sinais neurológicos da doença em camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV.

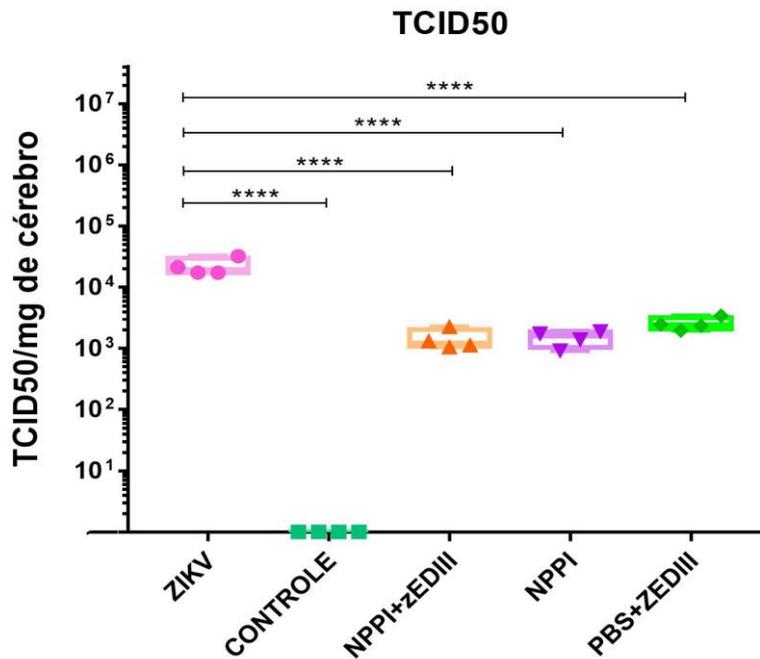


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: Evolução do quadro neurológico da doença: Pontuações de sintomas neurológicos de filhotes desafiados com ZIKV seguido de imunização passiva. CONTROLE (n=4), ZIKV (n=4), NPPI+zEDIII (n=6), NPPI (n=5) e PBS+zEDIII (n=7).

Ao se realizar a determinação da carga viral nos cérebros dos filhotes, observou-se variações nos valores de TCID<sub>50</sub>/mg de tecido entre os diferentes grupos. Os valores referentes a carga viral presente no cérebro dos filhotes pertencentes ao grupo ZIKV foram em média de  $2,2125 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mg de tecido. O grupo PBS+zEDIII apresentou uma média de  $6,995 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mg de tecido. Já o grupo NPPI obteve carga viral com média  $1,491 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mg de tecido e o grupo NPPI+zEDIII com média de  $1,438 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/mg. Conforme esperado, o grupo CONTROLE não demonstrou presença de carga viral no cérebro dos animais. O grupo ZIKV apresentou maior carga viral nos cérebros dos animais se comparado aos grupos CONTROLE, NPPI+zEDIII, NPPI e PBS+zEDIII com  $p < 0,0001$  (FIGURA 10).

Figura 10 - Carga viral presente no cérebro de camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV.

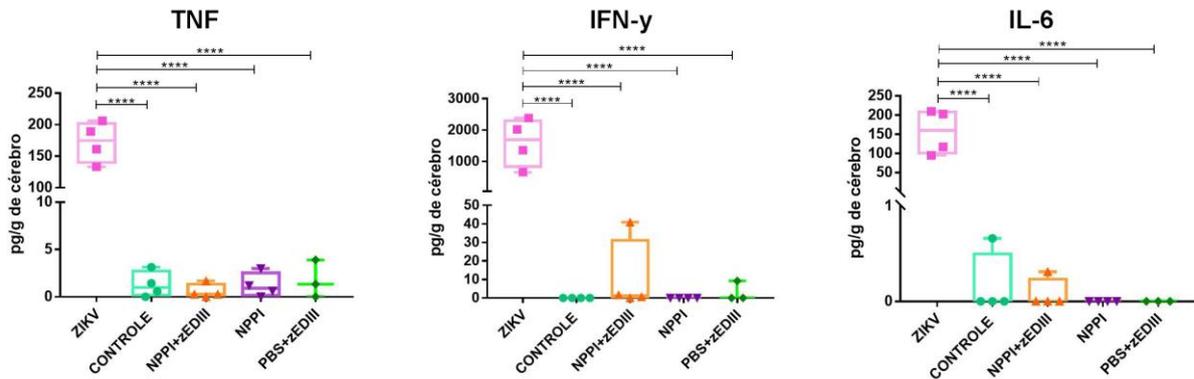


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: Carga viral presente no cérebro dos filhotes desafiados com  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL de *Zika virus* que receberam imunização passiva referentes aos grupos ZIV, CONTROLE, NPPI+zEDIII, NPPI, PBS+zEDIII, (n=4/grupo). (one-way ANOVA). (\*\*\*) p<0,001. (\*\*\*\*) p<0,0001. Os valores de carga viral estão representados na forma de log<sub>10</sub><sup>+1</sup>.

Além de se avaliar a sobrevivência dos animais e a carga viral presente nos cérebros dos neonatos dos diferentes grupos, outro parâmetro analisado foi a produção das citocinas IL-10, IL-17A, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-4 e IL-2 no cérebro dos animais. Os dados mostram que os animais do grupo ZIKV tiveram uma maior expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 nos cérebros se comparado aos animais do grupo CONTROLE, NPPI+zEDIII, NPPI e PBS+zEDIII, sendo os valores de p<0,0001 (FIGURAS 11A, B e C). As citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IL-10 não foram detectadas em todos os grupos analisados.

Figura 11 - Produção de citocinas no cérebro de camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) Produção de TNF; (B) IFN- $\gamma$ ; (C) IL-6 nos cérebros dos dos filhotes desafiados com  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL *Zika virus* que receberam imunização passiva referentes aos grupos ZIKV, CONTROLE, NPPI+zEDIII, NPPI e PBS+zEDIII, (n=4/grupo). (one-way ANOVA). (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

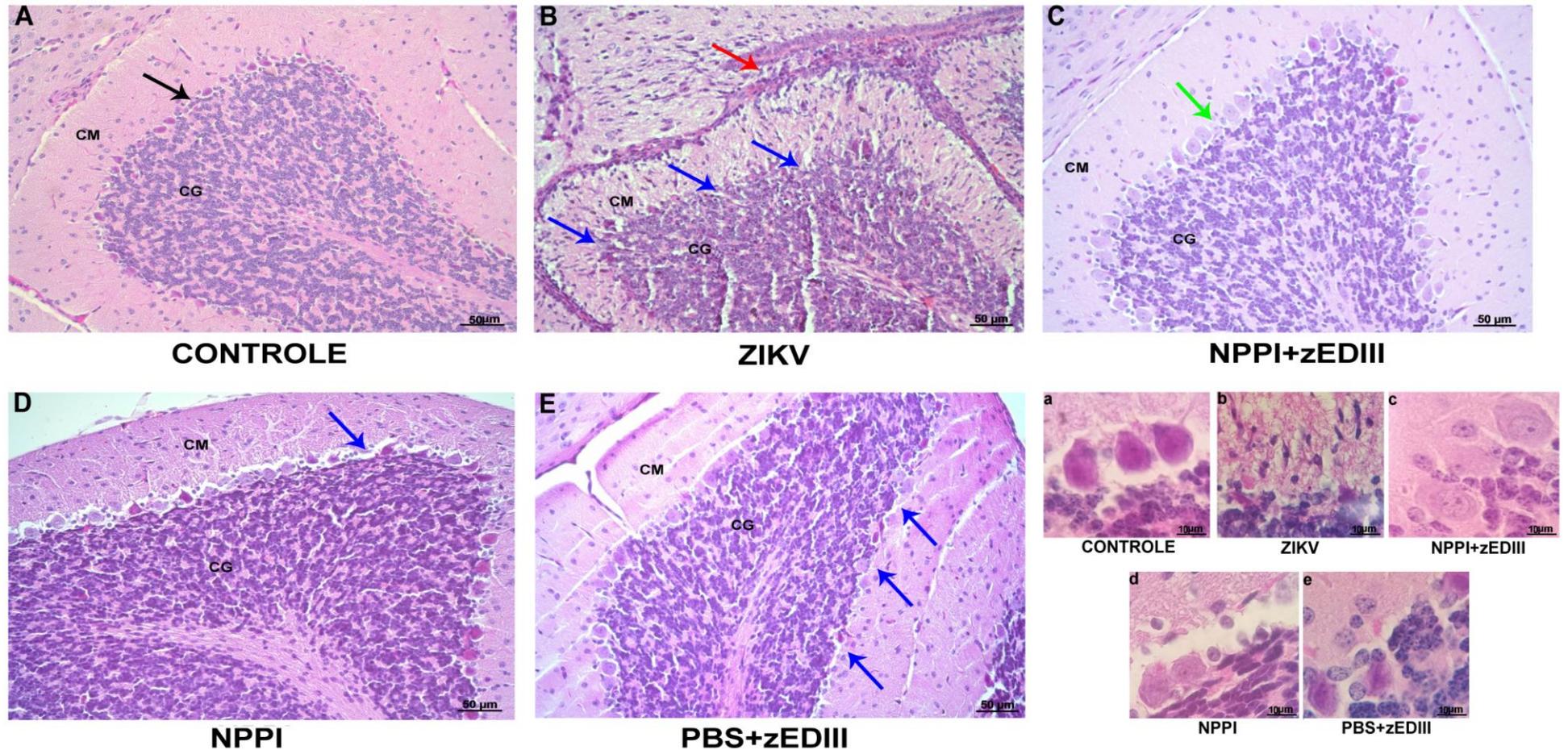
A fim de avaliar os aspectos histopatológicos dos cérebros dos animais, cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina foram analisados. Nossos resultados mostram que a análise histopatológica do cerebelo do grupo ZIKV revelou diminuição da espessura da camada molecular, aumento da espessura da camada granulosa, desorganização e perda de células na camada de células de Purkinje quando comparado aos demais grupos. Além disso, foi observada hiperemia, inflamação e células em apoptose identificadas pela condensação celular e eosinofilia acentuada (FIGURA 12B).

Os animais do grupo NPPI+zEDIII apresentaram células de Purkinje com indícios de degeneração, caracterizada pelo aumento de volume e citoplasma mais claro além de núcleo redondo com nucléolo evidente, como observado na Figura 12C. Os animais do grupo NPPI demonstraram predomínio de células de Purkinje com morfologia semelhante ao controle, porém foi observado focos de descontinuidade dessa camada celular (Figura 12D). Já o grupo PBS+zEDIII revelou evidente degeneração celular caracterizada por células de Purkinje mais volumosas e com nucléolos evidentes, associada a descontinuidade desta camada em virtude da perda de células (Figura 12E).

Já as alterações histopatológicas na região do córtex motor foram mais evidentes no grupo ZIKV, que revelou vasos sanguíneos hiperêmicos, presença de infiltrado inflamatório mononuclear adjacente aos vasos sanguíneos, morte celular, degeneração celular, e núcleos vacuolados caracterizados por vazio central e padrão de cromatina marginalizado, sugerindo

morte celular em curso, além de focos de hemorragia (FIGURA 13B). No entanto, os grupos CONTROLE, NPPI+zEDIII, NPPI, não apresentaram esses sinais (FIGURA 13A, C e D). Também foi possível observar vasos hiperêmicos bem como inflamação perivascular no grupo PBS+zEDIII, como observado na Figura 13E.

Figura 12 - Análise histopatológica da região cerebelar de camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV.

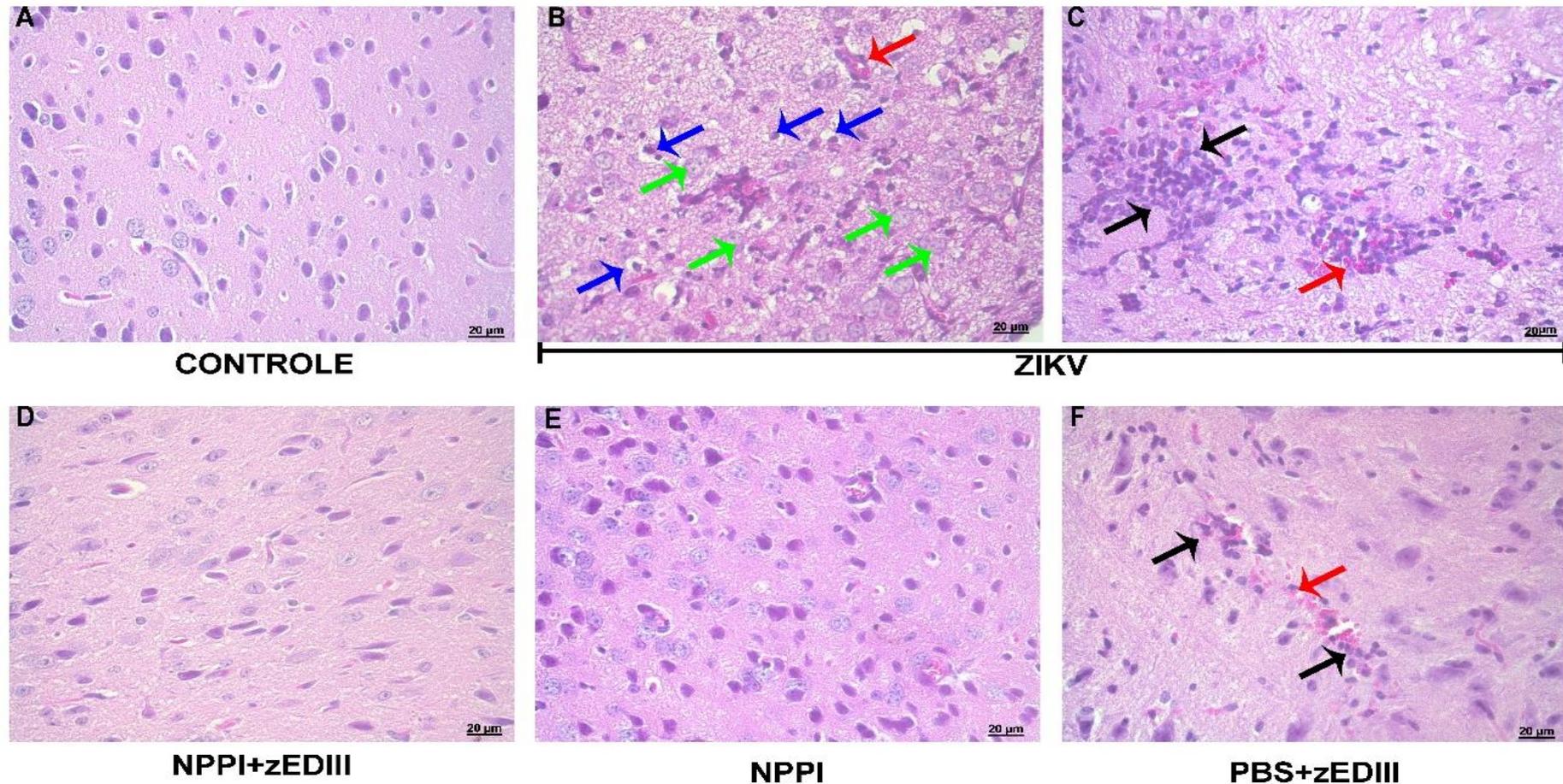


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: Fotomicrografias representativas da região cerebelar dos grupos controle (A), CONTROLE, (B) ZIKV, (C) NPPI+zEDIII, (D) NPPI e (E) PBS+zEDIII em objetiva de 20x e (a) CONTROLE, (b) ZIKV, (c) NPPI+zEDIII, (d) NPPI e (e) PBS+zEDIII em objetiva de 100x. As setas pretas indicam de células de Purkinje normais; Setas azuis indicam descontinuidade da camada de células de Purkinje; Setas vermelhas indicam hiperemia; Setas verdes indicam células de Purkinje hipertróficas. CM- Camada Molecular, CG- Camada Granulosa.

Coloração com hematoxilina e eosina (HE); magnificação - 20x e 100x; escala 50 $\mu$ m e 10 $\mu$ m.

Figura 13 - Análise histopatológica da região cortical de camundongos C57Bl/6 que receberam a imunização passiva após a infecção por ZIKV.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: Fotomicrografias da região cortical representativas dos grupos controle (A), CONTROLE, (B) ZIKV, (C) NPPI+zEDIII, (D) NPPI e (E) PBS+zEDIII. Setas pretas indicam presença de inflamação perivascular; Setas vermelhas indicam vasos hiperêmicos; Setas azuis indicam morte celular em curso; Setas verdes indicam presença de núcleos vacuolares.

Coloração com hematoxilina e eosina (HE); magnificação - 40x; escala 20µm

## 6 DISCUSSÃO

O *Zika virus* (ZIKV) é um flavivirus que ganhou destaque após o surto de infecções em 2007 na ilha Yap do Pacífico Ocidental e do surgimento de casos na América Latina, principalmente no Brasil, a partir do início de 2015 (PETERSEN *et al.*, 2016; WEAVER *et al.*, 2016). Embora a maioria das infecções pelo vírus ZIKV seja caracterizada por doença subclínica ou leve semelhante à gripe, estudos mostraram manifestações graves relacionadas com essa arbovirose, tais como distúrbios neurológicos, como a microcefalia em recém-nascidos de mães infectadas pelo vírus e também relações com a síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune que pode acometer adultos infectados com ZIKV (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; PETERSEN *et al.*, 2016).

Não existe nenhum tratamento eficaz e nenhuma vacina disponível para ZIKV. Sobretudo, os estudos concentram-se na prevenção da infecção, principalmente em mulheres grávidas, o que evidencia a alta necessidade do desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz (PLOURDE; BLOCH, 2016). A partir de então, algumas vacinas desenvolvidas mostraram resultados promissores tanto em modelos animais quanto em estudos pré-clínicos. No entanto, ainda é um desafio o desenvolvimento clínico dessas vacinas, pois existe a dificuldade de selecionar um antígeno capaz de produzir anticorpos neutralizantes (ABBINK; STEPHENSON; BAROUCH, 2018).

Neste trabalho, foram produzidas nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA) associadas ao Poli (I:C) como sistemas adjuvantes para a imunização com o peptídeo zEDIII. A proteína E é composta de três domínios, sendo denominados de domínio I (DI), domínio II (DII) e domínio III (DIII). O domínio III está associado à ligação do vírus ao receptor celular, além de possuir epítomos específicos capazes induzir fortes respostas de anticorpos neutralizantes do hospedeiro e/ou imunidade protetora, por isso é caracterizado como antígeno promissor para o desenvolvimento de vacinas contra ZIKV (CONLAN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2017).

Estudos demonstraram que os anticorpos direcionados aos domínios I e II geralmente possuem reatividade cruzada e pouco neutralizantes, potencializando a infecção por ZIKV e *Dengue virus*, enquanto aqueles direcionados ao domínio III têm a atividade neutralizante mais potente contra a infecção pelo ZIKV (TAI *et al.*, 2018). Dessa forma, Abbink e colaboradores (2018) demonstraram que durante duas décadas de pesquisa sobre flavivírus, em especial o ZIKV, o candidato vacinal mais promissor e que induz proteção contra o vírus pode estar relacionado a anticorpos que se ligam à proteína do envelope do vírus. Outros

estudos demonstraram que vacinas, as quais possuem como imunógeno a proteína prM (prM) e a proteína E (E) do envelope (prM-E) levam a produção de anticorpos anti-prM-E (LUNARDELLI *et al.*, 2020; MEDINA-MAGÜES *et al.*, 2021).

Apesar de existirem vários candidatos vacinais, é importante desenvolver e testar novas estratégias de imunização utilizando a proteína mais promissora do ZIKV (proteína do Envelope). Este trabalho vem corroborar com o potencial adjuvante das NPs, uma vez que os camundongos imunizados com zEDIII na presença de NPPI foram capazes de produzir alta quantidade de anticorpos IgG anti-zEDIII após a imunização se comparado aos outros grupos (Figura 4). Esse dado reforça que as nanopartículas de BSA associadas ao Poli (I:C) possuem potencial adjuvante, pois foram capazes de induzir maior produção de anticorpos contra o antígeno de interesse se comparado aos outros grupos.

As nanopartículas têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de vacinas por estimularem o sistema imunológico, proporcionando desta forma, a liberação controlada do antígeno após a sua administração (KHEIROLLAHOUPOUR *et al.*, 2019). As nanopartículas de BSA foram identificadas como um sistema promissor para a administração *in vivo* de antígenos microbianos (KOUCHAKZADEH; SAFAVI; SHOJAOSADATI, 2015; MAHAPATRO; SINGH, 2011; ZHAO *et al.*, 2014). Evidências experimentais obtidas em nosso laboratório mostraram que camundongos vacinados com NPs-BSA contendo antígenos de cepa não virulenta *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) apresentaram altos títulos de anticorpos IgG1 anti-*Pseudomonas* e redução dos sinais inflamatórios ocorridos no pulmão após a infecção com essa bactéria (RODRIGUES, *et al.*, 2013). Em outro trabalho, mostramos que a vacina à base de nanopartículas associadas aos antígenos da *P. aeruginosa* também pode ser protetora em um modelo agudo de infecção provocada pela cepa virulenta de *P. aeruginosa* PA14 (MARIA DE SOUZA MORAIS *et al.*, 2018). Também foi demonstrado a atividade adjuvante dessas nanopartículas que foi confirmada por meio da imunização de camundongos Swiss com a NS1 recombinante na presença das NP-BSA, o que foi capaz de levar a uma produção de anticorpos IgG anti-NS1, confirmando assim, o poder adjuvante dessas NPs (DA SILVA *et al.*, 2018). Além disso, Souza e colaboradores (2019) demonstraram que NPs-BSA misturadas com ZIKV inativado podem induzir anticorpos anti-ZIKV. Estes resultados indicam que NPs-BSA têm uma relevância biotecnológica para o desenho racional de formulações de vacinas baseadas em nanocarreadores de albumina e que alterações que visam melhorar sua atividade adjuvante devem ser exploradas.

As nanopartículas biomiméticas são uma nova classe de NPs que exibem estabilidade coloidal aprimorada, evitando eficientemente a interação indesejada com células imunes e com a circulação no sangue prolongada, e surgiram como biosistemas inovadores de imitações naturais que podem ser usados para uma ampla gama de aplicações biomédicas e (VIJAYAN *et al.*, 2019). Como parte dessas NPs, estão as nanopartículas miméticas a patógenos, como por exemplo, as nanopartículas que mimetizam vírus, as quais podem ser NPs poliméricas adjuvadas com poli I:C, e carregado com proteínas virais que atuam como antígenos. Esse tipo de nanopartículas tem sido amplamente utilizadas na biotecnologia de vacinas pois além de não apresentarem patogenicidade, elas podem estar associadas à maximização da resposta imune (NOAD; ROY, 2003; RIITHO *et al.*, 2017).

Neste estudo, avaliamos se as NPPI, um tipo de NPs miméticas a vírus, possuem potencial para serem parte de composições vacinais, uma vez que podemos ter um efeito adjuvante e estimulador da imunidade. Um estudo anterior do nosso laboratório, mostrou que as NPPI foram capazes de induzir aumento da expressão de IFN- $\beta$  e CD40 em células dendríticas, além da formação de um infiltrado inflamatório na derme de animais inoculados com NPPI (VIEIRA-JUNIOR, J. C. V., 2021).

Dessa forma, no presente trabalho mostramos que animais imunizados com NPPI com adição de zEDIII são capazes de produzir altos títulos de anticorpos IgG anti-zEDIII após a imunização (FIGURA 5 e Tabela 1). Além do mais, esses anticorpos produzidos demonstraram ação neutralizante, o que corrobora com o potencial imunoestimulante e protetor dessas NPs em conjunto com um antígeno de interesse, sendo que os animais que apresentaram maior título neutralizante foram os imunizados com NPPI+zEDIII (Tabela 2).

Os dados obtidos corroboram com o observado na literatura, em que vários estudos mostraram que animais imunizados com essa proteína são capazes de produzir anticorpos neutralizantes e proteger os animais da infecção pelo ZIKV. Tai e colaboradores (2018) demonstraram que um fragmento específico contendo o resíduo E298-409 do domínio III da proteína do envelope foi capaz de induzir maior título de anticorpos neutralizantes contra infecção de nove cepas de ZIKV isoladas de diferentes hospedeiros, países e períodos de tempo, e manteve a imunogenicidade anti-ZIKV de longo prazo para induzir anticorpos neutralizantes (TAI *et al.*, 2018).

Também foi encontrado na literatura que camundongos imunizados com três doses de uma vacina de DNA 50  $\mu$ g de zED III por eletroporação intramuscular mostraram imunogenicidade suficiente contra a cepa selvagem do ZIKV Brasil, pois induziu grande

título de IgG total específico para proteína E do ZIKV e anticorpos neutralizantes, bem como respostas de células T (LEE *et al.*, 2021).

Nanopartículas compostas de sequência de *Aquifex aeolicus Lumazine* (AaLS) com adjuvação do antígeno zED III (AaLS-EDIII) se mostraram candidato promissor de vacina, foram capazes de induzir uma resposta de anticorpos neutralizante e protetora (GEORGIEV *et al.*, 2022).

Alguns estudos mostraram que vacinas à base de EDIII provocaram títulos neutralizantes relativamente baixos em camundongos, embora, em alguns casos, fossem suficientes para proteger contra a mortalidade induzida pelo ZIKV, disseminação viral ou infecção placentária (CABRAL-MIRANDA *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019).

Kim e colaboradores (2021) mostraram que um potente anticorpo monoclonal específico anti-ZIKV DIII isolado de pacientes infectados com ZIKV neutralizou potentemente cepas asiáticas e americanas de ZIKV *in vitro* e conferiu proteção completa contra infecção por ZIKV em camundongos.

Cibulski e colaboradores (2021) mostraram que uma proteína recombinante derivada do domínio III do envelope do ZIKV fornecida com nanoadjuvante à base de saponina de *Quillaja brasiliensis* aumentou as respostas imunes anti-ZIKV, incluindo anticorpos neutralizantes e proliferação de esplenócitos em camundongos C57Bl/6 (CIBULSKI *et al.*, 2021).

Van Rompay e colaboradores (2020) relataram que a coadministração profilática de dois anticorpos monoclonais humanos anti-EDIII em macacos *Rhesus* prenhes desafiados três vezes com ZIKV durante o primeiro e segundo trimestre não eliminaram totalmente a viremia materna, mas limitaram a transmissão vertical, protegendo o feto de danos neurológicos (VAN ROMPAY *et al.*, 2020). Um estudo recente sugeriu que os imunógenos baseados em zEDIII foram capazes de induzir produção de anticorpos neutralizantes em macaco *Rhesus* (YANG *et al.*, 2021).

Chen e colaboradores (2020) mostraram que o domínio III da proteína do envelope de ZIKV recombinante (rZE3) induziu potentemente anticorpos neutralizantes contra a infecção por ZIKV. Além disso, a transferência passiva de soros imunizados com essa proteína reduziu os níveis de viremia e prolongou os tempos de sobrevivência em camundongos desafiados com ZIKV (CHEN *et al.*, 2020).

Embora a maioria das infecções por ZIKV em adultos seja assintomática ou resulte em sintomas leves, a disseminação do ZIKV e sua associação com taxas aumentadas de

distúrbios neurológicos criou uma necessidade urgente de modelos animais para examinar a patogênese da doença e explorar a eficácia de potenciais terapêuticas e vacinas (MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016).

Modelos animais são sempre importantes para investigar a patogênese da infecção viral, entretanto o modelo de camundongo adulto do tipo selvagem (WT) é resistente à infecção pelo ZIKV (RICHNER *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016). Além disso, a maioria dos estudos concentram-se em animais *knockout* para o gene IFN, ou seja, animais que possuem deficiência de receptor de IFN, deficiência de produção de IFN ou deficiência de gene estimulado por IFN (como STAT2) (MINER *et al.*, 2016a). E como o IFN tipo I também afeta a resposta imune adaptativa, camundongos com essa deficiência não são ideais para uma análise aprofundada da resposta imunológica natural (NAZERAI *et al.*, 2018).

Dessa forma, no presente trabalho, para avaliar se os anticorpos gerados após a imunização são capazes de impedir os efeitos que o ZIKV pode causar no hospedeiro, utilizamos um modelo de transferência passiva de anticorpos em neonatos. Camundongos recém-nascidos de um dia de idade têm mostrado alta susceptibilidade a infecções virais e isso ocorre pelo fato de ainda não terem o sistema imune maduro, provavelmente por não terem a resposta antiviral do tipo interferon (IFN) estabelecida (LI *et al.*, 2018). Além disso, em camundongos, o estágio de desenvolvimento do SNC de filhotes neonatais foi comparado ao de um feto humano no segundo trimestre de desenvolvimento (SEMPLE *et al.*, 2013). Além do mais, esse modelo de camundongo ignora a transmissão transplacentária e a consequente insuficiência placentária e, também, possibilita investigações detalhadas sobre a patogênese da doença (MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o modelo de infecção por ZIKV em camundongos neonatos foi pertinente, visto que os animais apresentaram sintomatologia (FIGURAS 6, 7, 8 e 9) semelhante às relatadas em outros estudos que utilizaram esse mesmo modelo (BRANCHE *et al.*, 2019; NAZERAI *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2017). Além disso, os sintomas se assemelham ao de animais INFAR KO infectados com ZIKV no 10º PND, mostrando ainda mais a importância e eficácia de um modelo de animal neonato selvagem para estudos com ZIKV (MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016).

Os nossos resultados obtidos indicaram que os animais que receberam transferência passiva de soros de animais imunizados com NPPI+zEDIII não apresentaram nenhum tipo de sintoma, tais como alteração de peso, marcha alterada, paralisia e ataxia dos membros, tremores após a infecção por ZIKV (FIGURA 6 e vídeos), mostrando, dessa forma, o efeito

neutralizante dos anticorpos produzidos. Essa eficácia do modelo de transferência passiva em neonatos é similar a observada em outro estudo que usou o mesmo modelo animal, porém nesse modelo, o candidato vacinal foi a proteína NS1 (YU *et al.*, 2017). Além disso, nossos resultados mostraram que a taxa de mortalidade dos animais que receberam anticorpos passivamente diminuiu significativamente (FIGURA 7), além de que os sintomas clínicos e neurológicos também foram reduzidos (FIGURAS 8 e 9). Branche e colaboradores (2019) relataram resultados semelhantes em seu estudo, em que utilizaram transferência passiva de anticorpos policlonais humanos contra ZIKV em camundongos neonatos de C57Bl/6.

O modelo utilizado em nosso estudo também mostrou que a transferência passiva de anticorpos foi capaz de reduzir a carga viral no cérebro dos camundongos infectados (FIGURA 10) confirmando o potencial terapêutico contra a infecção por ZIKV. Esse dado, corrobora com um estudo recente o qual mostrou que anticorpos monoclonais contra a proteína NS1 do vírus ZIKV transferidos passivamente a neonatos conferiu proteção a esses animais (YU *et al.*, 2021).

A infecção causada pelo ZIKV é capaz induzir o aumento de citocinas, tais como IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 que são essenciais para a resposta antiviral (CAMACHO-ZAVALA *et al.*, 2021; DE QUENTAL *et al.*, 2019). Neste trabalho, mostramos que os animais do que foram infectados com ZIKV e não receberam transferência passiva de anticorpos, apresentaram níveis maiores de citocinas IL-6, TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  presente no cérebro (FIGURA 11). Esse dado corrobora com o estudo de Mohanraj Manangeeswaran e colaboradores (2016) que avaliou a presença de citocinas em camundongos IFNAR KO infectados com ZIKV, o que resultou em níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias. Também, outros estudos mostraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias depende da cepa do ZIKV (TRIPATHI *et al.*, 2017). Por outro lado, mostramos que os níveis de expressão dessas citocinas foram menores nos demais grupos (NPPI+zEDIII, NPPI e PBS+zEDIII), indicando que provavelmente a redução dos níveis de citocinas pode estar atrelada com a ação neutralizante dos anticorpos transferidos.

Com intuito de avaliar os efeitos da infecção seguida pela transferência passiva dos anticorpos, fizemos a análise histopatológica do tecido cerebral dos animais. É sabido que o ZIKV apresenta tropismo por células progenitoras neurais as quais são induzidas à morte celular (DANG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; ONORATI *et al.*, 2016) e sua neurovirulência também foi confirmada em camundongos (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Embora a tendência de infecção do ZIKV por progenitores neurais ainda não seja muito bem

compreendida, Chavali e colaboradores (2017) demonstraram que o genoma do ZIKV é capaz de se ligar a uma proteína altamente expressa em células progenitoras de neurônios. Essa capacidade do ZIKV de infectar células progenitoras neuronais pode contribuir para impacto negativo no desenvolvimento neurológico no cérebro (MINER; DIAMOND, 2017).

Neste contexto, as infecções por ZIKV estão intimamente relacionadas com manifestações clínicas características da Síndrome Congênita do Zika, tais como microcefalia, restrição do crescimento intrauterino, calcificações intracranianas (ICC) hipoplasia, artrogripose e malformações oculares (FRANÇA *et al.*, 2016; BRASIL *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA-SZEJNFELD *et al.*, 2016; DE FATIMA VASCO ARAGAO *et al.*, 2016; VAN DER LINDEN *et al.*, 2016; MIRANDA *et al.*, 2016).

Esses sintomas podem estar relacionados a estruturas cerebrais como o córtex e o cerebelo. O cerebelo é um componente do sistema nervoso central (SNC) que faz conexão entre o tronco encefálico e o córtex cerebral. Ele abrange mais da metade dos neurônios presentes no SNC (BANDEIRA; LENT; HERCULANO-HOUZEL, 2009). Seus aspectos neurofuncionais são atribuídos a funções motoras e de equilíbrio, em que essa estrutura cerebral recebe e envia informações para regiões corticais motoras, incluindo áreas pré-frontais envolvidas na cognição superior. Além disso, o cerebelo também contribui para o processamento cognitivo e controle emocional (SCHMAHMANN; CAPLAN, 2006).

Uma característica marcante do cerebelo é a organização celular regular e simples que se repete em seu córtex. O córtex cerebelar possui substância cinzenta (periférica) e substância branca (central), a exemplo da organização do córtex cerebral. A substância cinzenta possui três camadas celulares: camada de células de Purkinje, camada molecular e camada de células granulares (ITO, 1928).

Já o córtex cerebral é constituído por neurônios e células da neuroglia ou glia (astrócitos, oligodentrócitos e microglia). As células que constituem o córtex cerebral se organizam em padrões caracterizados por arranjos laminares e colunares, cujos prolongamentos e conexões caracterizam o tecido nervoso (MENESES, 2006). Dentre as subdivisões do córtex, o córtex motor é o local de origem do trato corticoespinal responsável pela execução de movimentos voluntários. Uma alça de neurônios assegura a comunicação do córtex com o cerebelo iniciada no córtex frontal, chegando aos núcleos e por sua vez transmitindo sinais ao cerebelo (SCHRÖDER; MOSER; HUGGENBERGER, 2020).

De Oliveira-Szejnfeld e colaboradores (2016) demonstraram que 50% dos pacientes com infecção congênita presumida pelo ZIKV apresentavam hipoplasia de cerebelo ou

tronco cerebral corroborando nossos resultados. No entanto, estudos anteriores que utilizaram camundongos embrionários infectados com ZIKV não relataram anormalidades no cerebelo (CUGOLA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018).

Neste trabalho, constatou-se que os neonatos infectados pelo ZIKV apresentaram hipoplasia cerebelar, evidenciada pela diminuição número de células de Purkinje, bem como na espessura da camada molecular, demonstrando falhas graves na laminação do cerebelo, especialmente na camada molecular e na camada de células de Purkinje, nas quais é difícil visualizar corpo celular da célula de Purkinje, o que não foi observado nos demais grupos (CONTROLE e NPPI+zEDIII). Portanto, nossos resultados sugerem uma ligação entre a infecção pelo ZIKV e a hipoplasia do cerebelo, o que pode resultar em distúrbios da marcha e incoordenação motora observada nos camundongos infectados pelo ZIKV, além de reforçar que a transferência passiva do soro de animais previamente imunizados com NPPI+zEDIII foi capaz de proteger os neonatos em relação a manifestação desses sinais clínicos (CUI *et al.*, 2017).

Além do mais, nossos resultados nos permitem especular que a deficiência motora dos camundongos do grupo ZIKV pode ser atribuída às anormalidade constatadas no cerebelo e córtex motor, devido à forte correlação entre distúrbios motores e defeitos cerebelares, pois todos os camundongos do grupo ZIKV em nosso estudo exibiram um fenótipo semelhante à artrogripose (contraturas articulares), conforme descrito em vários relatos de casos clínicos (VAN DER LINDEN *et al.*, 2016).

Mostramos também que o Poli (I:C) pode ser capaz de estimular a resposta imunológica, pois NPPI sendo uma NP mimética semelhante a vírus com adição de zEDIII teve seu potencial adjuvante aumentado, mostrando potencial neutralizante dos anticorpos IgG anti-zEDIII *in vitro* e *in vivo*. Além de que, embora não tenha diferença entre os grupos NPPI+zEDIII, NPPI e PBS+zEDIII quanto carga viral e expressão de citocinas no cérebro, nossos achados histopatológicos revelaram que os animais dos grupos NPPI e PBS+zEDIII apresentaram descontinuidade da camada de células de Purkinje em virtude da perda dessas células, e também os animais do grupo PBS+zEDIII mostraram hiperemia e inflamação perivascular na região cortical do cérebro, o que pode estar relacionado ao aparecimento dos sinais clínicos e neurológicos nos animais desses grupos (FIGURA 12 e 13).

As NPPI não possuem imunidade específica para proteger os animais de uma infecção causada por ZIKV, mas a presença de alterações histopatológicas menos severas pode ser explicada por uma ação protetora não específica dos anticorpos produzidos pós-imunização com essas NPs.

Os soros de animais imunizados com NPPI podem apresentar uma gama de anticorpos não-específicos produzidos pela imunização com essas NPs que foram capazes de reduzir os danos causados pela infecção quando transferidos passivamente a animais neonatos infectados pelo ZIKV. Essa evento se assemelha ao observado no uso de imunoglobulina intravenosa de alta dose (IVIG) para tratar distúrbios autoimunes e inflamatórios em pacientes (TJON *et al.*, 2015). A transferência passiva de IVIG é um método bem estabelecido e eficaz para o tratamento de doenças causadas por infecções virais (HEMMING, 2001). Segundo João e colaboradores (2018), esse método já se demonstrou eficaz para prevenir doenças infecciosas, incluindo deficiências congênitas causados por outros flavivírus, como o vírus da encefalite do Nilo como demonstrado por Shimoni e colaboradores (2001), e ZIKV, que foi capaz de reduzir a carga viral em camundongos quando administrada em altas concentrações (PINTO *et al.*, 2021). Em trabalho anterior já demonstramos essa atividade policlonal de anticorpos anti-BSA, em que foram capazes de reduzir sinais de inflamação pulmonar em animais imunizados somente com NPs-BSA em um modelo de infecção por *P. aeruginosa* (MARIA DE SOUZA MORAIS *et al.*, 2018). Entretanto, é importante reforçar que experimentos devem ser conduzidos de forma a verificar se ocorre a ativação policlonal de células B pós-imunização com as NPPI e se há realmente aumento da produção de anticorpos não-específicos no soro desses animais.

Portanto, nossos resultados mostram que NPPI+zEDIII é um candidato terapêutico eficaz para ZIKV, pois se mostrou capaz de neutralizar potencialmente a infecção pelos ZIKV *in vitro* e os resultados *in vivo* no modelo de transferência passiva de anticorpos em camundongos neonatos nos forneceram evidências de que o anti-zEDIII pode neutralizar a infecção pelo ZIKV.

## 7 CONCLUSÃO

Estes resultados nos permitem concluir que:

- a) animais imunizados com nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policitidílico e proteína zEDIII (NPPI+zEDIII) demonstraram maior produção e títulos elevados de anticorpos IgG anti-zEDIII quando comparada à produção de IgG anti-zEDIII nos animais imunizados com NPPI, PBS+zEDIII após a imunização;
- b) essa imunização também foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes, pois os anticorpos produzidos se mostraram capazes de neutralizar potencialmente a infecção pelos ZIKV *in vitro*;
- c) o soro dos animais imunizados com NPPI+zEDIII foi capaz de reduzir a mortalidade e prevenir os sinais clínicos e neurológicos em um modelo de transferência passiva de anticorpos a animais neonatos, além de reduzir a carga viral e expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro desses animais. Além disso, a transferência passiva desses anticorpos foi capaz de reduzir os sinais histopatológicos de inflamação no córtex motor e cerebelo, bem como impedir a hipoplasia cerebelar.

## REFERÊNCIAS

- ABBINK, P.; STEPHENSON, K. E.; BAROUCH, D. H. Zika virus vaccines. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 594, Oct. 2018.
- AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. **Advances in Polymer Science**, v. 247, n. 1, p. 31–64, 2011.
- AMARAL, M. P. *et al.* Homologous prime-boost with Zika virus envelope protein and poly (I:C) induces robust specific humoral and cellular immune responses. **Vaccine**, v. 38, n. 20, p. 3653–3664, Apr. 2020.
- ATKINSON, B. *et al.* Detection of Zika virus in semen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 940–940, May 2016.
- AUBRY, M. *et al.* Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 41, p. 11–12, 1 Dez. 2015.
- BANDEIRA, F.; LENT, R.; HERCULANO-HOUZEL, S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 14108, 8 Aug. 2009.
- BARZON, L. *et al.* Zika virus: from pathogenesis to disease control. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 18, p. 202, Sept. 2016.
- BERNATCHEZ, J. A. *et al.* Drugs for the treatment of Zika virus infection. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 470–489, Jan. 2020.
- BERNECK, B. S. *et al.* A recombinant Zika virus envelope protein with mutations in the conserved fusion loop leads to reduced antibody cross-reactivity upon vaccination. **Vaccines** v. 8, n. 4, p. 603, Oct. 2020.
- BERNARDIS, L. L, PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal Endocrinol**, v. 40, p. 527-528, 1968.
- BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, Apr. 2014.
- BONAPARTE, M. *et al.* Evaluation of dengue serological tests available in Puerto Rico for identification of prior dengue infection for prevaccination screening. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 96, n. 3, p. 114918, Mar. 2020.
- BRANCHE, E. *et al.* Human polyclonal antibodies prevent lethal Zika virus infection in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, July 2019.
- BRASIL, P. *et al.* Zika virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: clinical characterization, epidemiological and virological aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, Apr. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022, até a SE 31.** Brasília, Oct. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 47,** Brasília, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 29 de 2022.** Brasília, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 7.** Brasília, 2022.

BROUTET, N. *et al.* Zika virus as a cause of neurologic disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1506–1509, Apr. 2016.

BRUENN, J. A. A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 7, p. 1821, Apr. 2003.

BUCKLEY, A.; GOULD, E. A. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. **The Journal of General Virology**, v. 69, n. 8, p. 1913–1920, 1988.

BÜGL, H. *et al.* RNA methylation under heat shock control. **Molecular Cell**, v. 6, n. 2, p. 349–360, 2000.

BUTCHER, S. J. *et al.* A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 235–240, Mar. 2001.

CABRAL-MIRANDA, G. *et al.* Zika virus-derived E-DIII protein displayed on immunologically optimized VLPs induces neutralizing antibodies without causing enhancement of dengue virus infection. **Vaccines**, v. 7, n. 3, p. 72, July 2019.

CALVET, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, Jun. 2016.

CAMACHO-ZAVALA, E. *et al.* Pregnant women infected with zika virus show higher viral load and immunoregulatory cytokines profile with CXCL10 increase. **Viruses**, v. 13, n. 1, Jan. 2021.

CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, Apr. 2016.

CARBAUGH, D. L.; BARIC, R. S.; LAZEAR, H. M. Envelope protein glycosylation mediates Zika virus pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 93, n. 12, Jun. 2019.

CARTEAUX, G. *et al.* Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1595–1596, Mar. 2016.

- CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. **Virology**, v. 169, n. 1, p. 100–109, 1989.
- CHAN, J. F. W. *et al.* Zika virus infection in dexamethasone-immunosuppressed mice demonstrating disseminated infection with multi-organ involvement including orchitis effectively treated by recombinant type I interferons. **EBioMedicine**, v. 14, p. 112–122, Dec 2016.
- CHAVALI, P. L. *et al.* Neurodevelopmental protein Musashi 1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. **Science**, v. 357, n. 6346, p. 83, July 2017.
- CHEN, M. Y. *et al.* Recombinant lipidated Zika virus envelope protein domain III elicits durable neutralizing antibody responses against Zika virus in mice. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, Apr. 2020.
- CHOW, E. K. H.; HO, D. Cancer nanomedicine: from drug delivery to imaging. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 216, Dec. 2013.
- CIBULSKI, S. *et al.* Zika virus envelope domain III recombinant protein delivered with saponin-based nanoadjuvant from quillaja brasiliensis enhances anti-zika immune responses, including neutralizing antibodies and splenocyte proliferation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 4 Mar. 2021.
- CLINICALTRIALS. **Zika virus vaccines**. [S.l.]. 2022. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=zika+virus&term=&cntry=&state=&city=&dist=>. Acesso em: Nov. 2022.
- CONLAN, S. *et al.* Role of Zika virus envelope protein domain III as a target of human neutralizing antibodies. **MBio**, v. 10, n. 5, Sept. 2019.
- CRABTREE, M. B.; KINNEY, R. M.; MILLER, B. R. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: Construction and characterization of mutant viruses. **Archives of Virology**, v. 150, n. 4, p. 771–786, Dec. 2004.
- CRÉANGE, A. Guillain-Barré syndrome: 100 years on. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 12, p. 770–774, Dec. 2016.
- CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, May 2016.
- CUI, L. *et al.* Visual and motor deficits in grown-up mice with congenital Zika virus infection. **EBioMedicine**, v. 20, p. 193–201, Jun. 2017.
- CUNHA, M. S. *et al.* First complete genome sequence of Zika virus (Flaviviridae, flavivirus) from an autochthonous transmission in Brazil. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, 2016.
- DA SILVA, N. I. O. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticles induce histopathological changes and inflammatory cell recruitment in the skin of treated mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1311–1317, Nov. 2018.

DANG, J. *et al.* Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, Aug. 2016.

DE FATIMA VASCO ARAGAO, M. *et al.* Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ**, v. 353, Apr. 2016.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133, 2008.

DE OLIVEIRA-SZEJNFELD, P. S. *et al.* Congenital brain abnormalities and Zika virus: What the radiologist can expect to see prenatally and postnatally. **Radiology**, v. 281, n. 1, p. 203–218, Oct. 2016.

DE QUENTAL, O. B. *et al.* Zika Virus Alters the Viscosity and Cytokines Profile in Human Colostrum. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

DE SILVA, R. *et al.* Sensitization to bovine serum albumin as a possible cause of allergic reactions to vaccines. **Vaccine**, v. 35, n. 11, p. 1494–1500, Mar. 2017.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (D). Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, Sept. 1952.

DONG, S.; LIANG, Q. Recent advances in animal models of Zika virus infection. **Virologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 125–130, Mar. 2018.

DOS SANTOS, T. *et al.* Zika Virus and the Guillain-Barré Syndrome - case series from seven countries. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 16, p. 1598–1601, Oct. 2016.

DOWALL, S. D. *et al.* A susceptible mouse model for Zika virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, 2016.

DRIGGERS, R. W. *et al.* Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, Jun. 2016.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, Dec. 2009.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 347–360, May 2003.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 168–182, Jan. 2012.

FERNANDES, N. C. C. A. *et al.* Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. **Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie**, v. 69, n. 2, p. 63–71, Feb. 2017.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161–171, Mar. 2005.

FONTES-GARFIAS, C. R. *et al.* Functional Analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. **Cell Reports**, v. 21, n. 5, p. 1180–1190, Oct. 2017.

FORTIER, M. E. *et al.* The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 4 56-4, p. 759–766, Oct. 2004.

FRANÇA, G. V. A. *et al.* Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 891–897, 27 Aug. 2016.

FREITAS, D. A. *et al.* Congenital Zika syndrome: A systematic review. **Plos One**, v. 15, n. 12, p. e0242367, Dec. 2020.

GAUDINSKI, M. R. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. **Lancet**, v. 391, n. 10120, p. 552, Feb. 2018.

GEORGIEV, G. I. *et al.* Resurfaced ZIKV EDIII nanoparticle immunogens elicit neutralizing and protective responses in vivo. **Cell Chemical Biology**, v. 29, n. 5, p. 811–82, Feb. 2022.

GOULD, E.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500–509, 2008.

GRANT, A. *et al.* Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882, Jun. 2016.

HAMEL, R. *et al.* Biology of Zika virus infection in human skin cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880, Sept. 2015.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. The antigenic structure of Zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 1, Mar. 2017.

HEMMING, V. G. Use of intravenous immunoglobulins for prophylaxis or treatment of infectious diseases. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 5, p. 859–863, 2001.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika virus spreads to new areas — region of the americas, May 2015–January 2016. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 3, p. 1031–1034, Mar. 2016.

- HU, Y. J. *et al.* Binding of anti-inflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 39, n. 4–5, p. 280–285, Nov. 2006.
- ITO, M. **The cerebellum and neural control**. New York: Raven, 1928.
- JAMALI MOGHADAM, S. R. *et al.* Zika virus: A review of literature. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 12, p. 989–994, Dec. 2016.
- JOÃO, C. *et al.* Passive serum therapy to immunomodulation by IVIG: a fascinating journey of antibodies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 200, n. 6, p. 1957–1963, Mar. 2018.
- JOHANSEN, L. M. *et al.* A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 290, Jun. 2015.
- JOHNSON, A. J.; ROEHRIG, J. T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 783–786, Jan. 1999.
- KHEIROLLAHPOUR, M. *et al.* Nanoparticles and vaccine Development. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 6–21, 24 Oct. 2019.
- KIM, S. IL *et al.* Neutralization of Zika virus by E protein domain III-Specific human monoclonal antibody. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 545, p. 33–39, Mar. 2021.
- KLASE, Z. A. *et al.* Zika fetal neuropathogenesis: etiology of a viral syndrome. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004877, Aug. 2016.
- KOSTYUCHENKO, V. A. *et al.* Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425–428, Apr. 2016.
- KOUCHAKZADEH, H.; SAFAVI, M. S.; SHOJAOSADATI, S. A. Efficient delivery of therapeutic agents by using targeted albumin nanoparticles. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 98, p. 121–143, Jan. 2015.
- KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 171–183, Dec. 2008.
- KUMAR, A. *et al.* Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO Reports**, v. 17, n. 12, p. 1766, Dec. 2016.
- KUMAR, V. *et al.* Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 215, p. 39–121, 2012.
- LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, Aug. 2008.
- LAROCCA, R. A. *et al.* Vaccine Protection Against Zika Virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474, Jun. 2016.

LAZEAR, H. M. *et al.* A mouse model of Zika virus pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, May 2016.

LEE, E.; LOBIGS, M. Mechanism of virulence attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis virus and Murray Valley encephalitis virus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 10, p. 4901–4911, May 2002.

LEE, Y. H. *et al.* Optimization of Zika DNA vaccine by delivery systems. **Virology**, v. 559, p. 10–14, July 2021.

LEI, C. *et al.* On the Calculation of TCID<sub>50</sub> for Quantitation of Virus Infectivity. **Virologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 141, Feb. 2021.

LI, H. *et al.* Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 593–598, Nov. 2016.

LI, S. *et al.* Zika virus fatally infects wild type neonatal mice and replicates in central nervous system. **Viruses**, v. 10, n. 1, Jan. 2018.

LIANG, Q. *et al.* Zika virus NS4A and NS4B oroteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663, Nov. 2016.

LIN, D. L. *et al.* The ER membrane protein complex promotes biogenesis of Dengue and Zika virus non-structural multi-pass transmembrane proteins to support infection. **Cell Reports**, v. 27, n. 6, p. 1666- 1674.e4, May 2019.

LINDENBACH, B. D. The viruses and their replication. **Fields Virology**, p. 1101- 1152., 2007.

LIU, W. J. *et al.* Inhibition of interferon signaling by the New yYrk 99 strain and kunjin subtype of west nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. **Journal of Virology**, v. 79, n. 3, p. 1934, Feb. 2005.

LIU, W. J. *et al.* A single amino acid substitution in the west nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. **Journal of Virology**, v. 80, n. 5, p. 2396, Mar. 2006.

LUNARDELLI, V. A. S. *et al.* Zika virus—an update on the current efforts for vaccine development. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 3, p. 904–908, 2020.

MA, W. *et al.* Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1511- 1524.e10, Dec. 2016.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, Mar. 1954.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 55, Nov. 2011.

- MANANGEESWARAN, M.; IRELAND, D. D. C.; VERTHELYI, D. Zika (PRVABC59) infection is associated with T cell infiltration and neurodegeneration in CNS of immunocompetent neonatal C57Bl/6 mice. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, Nov. 2016.
- MARCATO, P. D.; DURÁN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 5, p. 2216–2229, May 2008.
- MARIA DE SOUZA MORAIS, S. *et al.* Serum albumin nanoparticles vaccine provides protection against a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge. **Vaccine**, v. 36, n. 43, p. 6408–6415, Oct. 2018.
- MÉCHARLES, S. *et al.* Acute myelitis due to Zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1481, Apr. 2016.
- MEDINA-MAGÜES, L. G. *et al.* mRNA vaccine protects against zika virus. **Vaccines**, v. 9, n. 12, Dec. 2021.
- MEIER, K. C. *et al.* A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, Oct. 2009.
- MENESES, M. S. **Neuroanatomia aplicada**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8854–8863, Mar. 2006.
- MINER, J. J. *et al.* Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 19 May 2016a.
- MINER, J. J. *et al.* Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. **Cell Reports**, v. 16, n. 12, p. 3208–3218, Sept. 2016b.
- MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134, Feb. 2017.
- MIRANDA, H. A. DE *et al.* Expanded Spectrum of Congenital Ocular Findings in Microcephaly with Presumed Zika Infection. **Ophthalmology**, v. 123, n. 8, p. 1788–1794, Aug. 2016.
- MODJARRAD, K. *et al.* Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: preliminary aggregate results from three phase 1a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trials. **Lancet**, v. 391, n. 10120, p. 563, Feb. 2018.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561–573, July 2007.
- MOORE, S. M. *et al.* Rabies Virus antibodies from oral vaccination as a correlate of protection against lethal infection in wildlife. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 2, n. 3, p. 31, July 2017.

- MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal models of Zika virus infection, pathogenesis, and immunity. **Journal of Virology**, v. 91, n. 8, Abr. 2017.
- MUSSO, D.; KO, A. I.; BAUD, D. Zika virus infection — after the pandemic. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 15, p. 1444–1457, Oct. 2019.
- NAZERAI, L. *et al.* A new in vivo model to study protective immunity to Zika virus infection in mice with intact type I interferon signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, p. 593, Mar. 2018.
- NITTA, S. K.; NUMATA, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1629, 2013.
- NOAD, R.; ROY, P. Virus-like particles as immunogens. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 438–444, Sept. 2003.
- OLIVIER, J. C. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles. **NeuroRx**, v. 2, n. 1, p. 108, 2005.
- ONORATI, M. *et al.* Zika virus disrupts phospho-TBK1 localization and mitosis in human neuroepithelial stem cells and radial glia. **Cell reports**, v. 16, n. 10, p. 2576–2592, Sept. 2016.
- PACKER, M. *et al.* Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 15, p. 1413–1424, 2020.
- PALCHETTI, S. *et al.* Transfected Poly(I:C) Activates Different dsRNA Receptors, Leading to Apoptosis or Immunoadjuvant Response in Androgen-independent Prostate Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5470, Feb. 2015.
- PANCHAUD, A. *et al.* Emerging role of Zika virus in adverse fetal and neonatal outcomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 659–694, May 2016.
- PATIL, Y.; PANYAM, J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1–2, p. 195, Feb. 2009.
- PERGOLIZZI, J. *et al.* The Zika virus: Lurking behind the COVID-19 pandemic? **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 46, n. 2, p. 267–276, Apr. 2021.
- PETERSEN, E. *et al.* Rapid Spread of Zika virus in the americas - implications for public health preparedness for mass gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, p. 11–15, Mar. 2016.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 2, p. 168, 2012.
- PINTO, A. K. *et al.* The Ability of Zika virus intravenous immunoglobulin to protect from or enhance Zika virus disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, Sept. 2021.
- PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A literature review of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185, July 2016.

POLAND, G. A. *et al.* Development of vaccines against Zika virus. *T* v.18, n.7, p. 211-219, 2018. **TheLancet, United Kingdom**, v. 18, n. 7, p. 211–219, 2018.

PRYOR, M. J.; WRIGHT, P. J. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 5, p. 1183–1187, May 1994.

RASMUSSEN, S. A. *et al.* Zika virus and birth defects — reviewing the evidence for causality. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981–1987, May 2016.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, May 1938.

REGLA-NAVA, J. A. *et al.* A Zika virus mutation enhances transmission potential and confers escape from protective dengue virus immunity. **Cell Reports**, v. 39, n. 2, p. 110655, Apr. 2022.

RICHNER, J. M. *et al.* Vaccine mediated protection against Zika virus-induced congenital disease. **Cell**, v. 170, n. 2, p. 273- 283.e12, July 2017.

RIITHO, V. *et al.* Design and evaluation of the immunogenicity and efficacy of a biomimetic particulate formulation of viral antigens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, Oct. 2017.

RODRIGUES, N. F. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticle vaccine reduces lung pathology induced by live *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 44, p. 5062–5066, Oct. 2013.

ROSSI, S. L. *et al.* Characterization of a novel murine model to study Zika virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1362–1369, Jun. 2016.

SAMUEL, M. A.; DIAMOND, M. S. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 13350–13361, Nov. 2005.

SAUMYA, K. U. *et al.* Zika virus capsid anchor forms cytotoxic amyloid-like fibrils. **Virology**, v. 560, p. 8–16, Aug. 2021.

SCHMAHMANN, J. D.; CAPLAN, D. Cognition, emotion and the cerebellum. **Brain**, v. 129, n. 2, p. 290–292, Feb. 2006.

SCHRÖDER, H.; MOSER, N.; HUGGENBERGER, S. The mouse cerebral cortex. **Neuroanatomy of the Mouse**, p. 231–265, 2020.

SEMPLE, B. D. *et al.* Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, v. 0, p. 1, July 2013.

SEVVANA, M. *et al.* Structural basis of Zika virus specific neutralization in subsequent flavivirus infections. **Viruses**, v. 12, n. 12, p. 1346, Nov. 2020.

SHAN, C. *et al.* Zika Virus: Diagnosis, therapeutics, and vaccine. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 170–172, Mar. 2016.

SHAN, C.; XIE, X.; SHI, P. Y. Zika virus vaccine: Progresses and challenges. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 1, p. 12, July 2018.

SHIMONI, Z. *et al.* Treatment of West Nile virus encephalitis with intravenous immunoglobulin. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 759, 2001.

SHRESTA, S. *et al.* Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **Journal of Virology**, v. 78, n. 6, p. 2701–2710, Mar. 2004.

SHUAIB, W. *et al.* Re-emergence of Zika virus: A review on pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention. **The American Journal of Medicine**, v. 129, n. 8, p. 879.e7-879.e12, Aug. 2016.

SILVA, E. F. *et al.* A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, p. 13, Mar. 2012.

SIROHI, D. *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 22 Apr. 2016.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika virus structure, maturation, and receptors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 10, p. S935, 2017.

SMITH, D. R. *et al.* Neuropathogenesis of Zika virus in a highly susceptible immunocompetent mouse model after antibody blockade of type I interferon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, Jan. 2017.

SONG, B. H. *et al.* Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50–64, July 2017.

SONG, H. K.; HWANG, D. Y. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. **Laboratory Animal Research**, v. 33, n. 2, p. 119, 2017.

SOUZA, G. A. P. de. **Avaliação de plataformas vacinais experimentais contra o Zika virus utilizando nanopartículas de albumina sérica bovina**. 2019. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2019.

STEINHAUSER, I. M. *et al.* Effect of trastuzumab-modified antisense oligonucleotide-loaded human serum albumin nanoparticles prepared by heat denaturation. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 4022–4028, Oct. 2008.

SWAMINATHAN, S. *et al.* Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 19, p. 1907–1909, Nov. 2016.

TAI, W. *et al.* Critical neutralizing fragment of Zika virus EDIII elicits cross-neutralization and protection against divergent Zika viruses article. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–8, Dec. 2018.

TAN, T. Y. *et al.* Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, Dec. 2020.

TEBAS, P. *et al.* ZIKA-001: Safety and Immunogenicity of an Engineered DNA Vaccine against Zika virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 12, p. e35, Sept. 2021.

TJON, A. S. W. *et al.* Differences in anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin between mice and men: More than meets the eye. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n APR, p. 197, 2015.

TRIPATHI, S. *et al.* A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 3, Mar. 2017.

TRIPP, R. A.; ROSS, T. M. Development of a Zika vaccine. **Vaccines for Biodefense**, v. 15, n. 9, p. 1083–1085, Sept. 2016.

TSABOURI, S.; DOUROS, K.; PRIFTIS, K. Cow's milk allergenicity. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 16–26, Mar. 2014.

VALENTE, A. P.; MORAES, A. H. Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, Aug. 2019.

VAN DER LINDEN, V. *et al.* Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. **The BMJ**, v. 354, 2016.

VAN ROMPAY, K. K. A. *et al.* A combination of two human monoclonal antibodies limits fetal damage by Zika virus in macaques. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 14, p. 7981–7989, Apr. 2020.

VICTORA, C. G. *et al.* Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? **The Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 621–624, 13 fev. 2016.

VIEIRA-JUNIOR, J. C. V. **Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policitidílico sobre o fenótipo de células dendríticas.** 2021. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2021.

VIJAYAN, V. *et al.* Recent Advances in Nanovaccines Using Biomimetic Immunomodulatory Materials. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 10, Oct. 2019.

WANG, L. *et al.* From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika virus. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 561, May 2016.

WANG, Q.-Y. *et al.* Discovery of Dengue Virus NS4B Inhibitors. **Journal of Virology**, v. 89, n. 16, p. 8233, Aug. 2015.

WANG, Q.; YAN, J.; GAO, G. F. Monoclonal antibodies against Zika virus: therapeutics and their implications for vaccine design. **Journal of Virology**, v. 91, n. 20, Oct. 2017.

- WANG, X. *et al.* Effects of Adjuvants on the immunogenicity and efficacy of a Zika virus envelope domain II subunit vaccine. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. 161, 27 out. 2019.
- WARTLICK, H. *et al.* Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells. **Journal of Drug Targeting**, v. 12, n. 7, p. 461–471, 2008.
- WEAVER, S. C. *et al.* Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, p. 69, Jun. 2016.
- WEBER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 197–200, Mar. 2000.
- WEBER, E. *et al.* Type I interferon protects mice from fatal neurotropic infection with Langkat virus by systemic and local antiviral responses. **Journal of Virology**, v. 88, n. 21, p. 12202–12212, Nov. 2014.
- YANG, M. *et al.* Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. **Vaccine**, v. 35, n. 33, p. 4287–4294, July 2017.
- YANG, R. *et al.* Two immunogenic recombinant protein vaccine candidates showed disparate protective efficacy against Zika virus infection in rhesus macaques. **Vaccine**, v. 39, n. 6, p. 915–925, Feb. 2021.
- YOCKEY, L. J. *et al.* Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1247, Aug. 2016.
- YOUNG, P. R. *et al.* An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053, 2000.
- YU, J. *et al.* Effective suckling C57BL/6, kunming, and BALB/c mouse models with remarkable neurological manifestation for Zika virus infection. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 165, Jun. 2017.
- YU, L. *et al.* Monoclonal antibodies against Zika virus ns1 protein confer protection via fccreceptor-dependent and-independent pathways. **mBio**, v. 12, n. 1, p. 1–18, Jan. 2021.
- YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 204–219, Feb. 2017.
- ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569, 2015.
- ZANLUCA, C.; DOS SANTOS, C. N. D. Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 295–301, May 2016.
- ZHANG, N. *et al.* Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, July 2016.
- ZHAO, L. *et al.* Nanoparticle vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p. 327–337, Jan. 2014.

## ANEXO A

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina sobre células dendríticas e construção de um protótipo vacinal para prevenção da infecção por Zika virus**, registrada com o nº **0009/2020**, sob a responsabilidade de **Luiz Felipe Leomil Coelho**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/06/2020 a 31/12/2021**, 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / C57bl/6	30	0	30	Central unifal-mg

Alfenas, 05 de Novembro de 2020

**Prof(a). Dr(a). Leonardo Augusto de Almeida**

Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG