

FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO TEIXEIRA

**Desenho e avaliação de eficácia de uma vacina de DNA contra
o vírus Zika em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo
2023

FRANCIANE MOURADIAN EMIDIO TEIXEIRA

**Desenho e avaliação de eficácia de uma vacina de DNA contra
o vírus Zika em camundongos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Notomi Sato

Co-orientadora: Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana

Versão original.

São Paulo
2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mouradian Emidio Teixeira, Franciane
Desenho e avaliação de eficácia de uma vacina de
DNA contra o vírus Zika em camundongos / Franciane
Mouradian Emidio Teixeira; orientadora Maria Notomi
Sato; coorientadora Isabelle Freire Tabosa Viana. --
São Paulo, 2023.
163 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Vacina de DNA. 2. Zika vírus. 3.
Imunogenicidade. 4. Otimização. 5. Sistemas de
entrega. I. Sato, Maria Notomi, orientador. II.
Freire Tabosa Viana, Isabelle, coorientador. III.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDIAS

Candidato (a): Franciane Mouradian Emidio Teixeira

Título da Dissertação/Tese: Desenho e avaliação de eficácia de uma vacina de DNA contra o vírus Zika em camundongos

Orientador (a): Prof^a Dra. Maria Notomi Sato

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado **Reprovado**

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 05 de Outubro de 2018

Ilmo(a)

Dr(a). **Maria Notomi Sato**

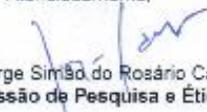
(aos cuidados de Franciane Mouradian Emidio Teixeira)

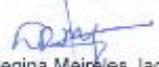
Certificamos que a proposta intitulada "**Desenho de uma vacina de DNA contra o vírus Zika e sua avaliação de eficiência em gerar resposta imune protetora**", registrado com o nº **000363A**, sob a responsabilidade de **Maria Notomi Sato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência da Autorização: 01/10/2018 a 01/11/2022							
Finalidade	Pesquisa						
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Material	Quantidade		
					M	F	M+F
Camundongo isogênico	BALB/c	8-10 semanas	15-20g	a ser Coletado	80	80	160
Camundongo isogênico	C57BL/6	8-10 semanas	15-20g	a ser Coletado	80	80	160
Origem: Biotério USP					TOTAL	320	

Atenciosamente,


Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP


Dra. Luciana Regina Meirales Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 21 de Março de 2019

Ilmo(a)

Dr(a). Maria Notomi Sato

(aos cuidados de Franciane Mouradian Emidio Teixeira)

Certificamos que a solicitação nº **000008** referente à utilização de organismo geneticamente modificado (OGM) no projeto intitulado "**Desenho de uma vacina de DNA contra o vírus Zika e sua avaliação de eficiência em gerar resposta imune protetora**", registrada na CEUA-IMT com o nº **363A**, sob a responsabilidade de **Maria Notomi Sato**, foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE BIOSSEGURANÇA EM ANIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADOS (CIBIO) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Maria Notomi Sato
Presidente da Comissão de Biossegurança em Animais Geneticamente Modificados

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da eficácia da vacina de DNA quimérica do vírus Zika e da proteína de associação à membrana lisossomal em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 6912040918, sob a responsabilidade de **Maria Notomi Sato e equipe; Franciane Mouradian Emídio Teixeira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 03/06/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the efficacy of the Zika virus chimeric DNA vaccine and the lysosomal-associated membrane protein in mice", utilizing 312 isogenics mice (156 males and 156 females), 64 Genetically modified mice (GMO) (32 males and 32 females), protocol number CEUA 6912040918, under the responsibility of **Maria Notomi Sato and team; Franciane Mouradian Emídio Teixeira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 06/03/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: Biotério Central FMUSP			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 8 a 10 semanas	
Linhagem: C57BL/6		N amostral: 78	
Origem: Biotério Central FMUSP			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 8 a 10 semanas	
Linhagem: C57BL/6		N amostral: 78	
Origem: Biotério Central FMUSP			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 8 a 10 semanas	
Linhagem: BALB/c		N amostral: 78	
Origem: Biotério Central FMUSP			
Espécie: Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Idade ou peso: 8 a 10 semanas	
Linhagem: BALB/c		N amostral: 78	
Origem: Biotério de matrizes de Camundongos do ICB			
Espécie: Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Fêmeas	Idade ou peso: 8 a 10 semanas	
Linhagem: 129 Sv IFN-ABR		N amostral: 32	
Origem: Biotério de matrizes de Camundongos do ICB			
Espécie: Camundongo geneticamente modificado (OGM)	sexo: Machos	Idade ou peso: 8 a 10 semanas	
Linhagem: 129 Sv IFN-ABR		N amostral: 32	

São Paulo, 04 de junho de 2019

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**DESENHO E AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DE UMA VACINA DE DNA CONTRA O VÍRUS ZIKA EM CAMUNDONGOS**”, registrada com o nº **1763/2022**, sob a responsabilidade de **Maria Notomi Sato e Franciane Mouradian Emidio Teixeira**, apresentada pelo IMT-FMUSP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 14/03/2022.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-03-2022 Término: 31-12-2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57BI/6 Camundongo Knockout 129 Sv IFN-ABR
Nº de animais	98 C57BI/6 fêmeas e 68 C57BI/6 machos 30 Knockout fêmeas e 30 Knockout machos
Peso/Idade	6 semanas
Origem	Biotério FMUSP/Biotério de Matrizes - ICB IV/USP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 14 de março de 2022



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Trabalho realizado no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no Laboratório de Virologia (LAVITE) do Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz de Pernambuco e no Laboratório de Caracterização de Materiais da Escola de Engenharia e Ciência dos Materiais da *Queen Mary University of London*, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos nº 2018/18230-6, 2019/25119-7 e 2021/12476-6), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo nº 165071/2018-4), Fundação Oswaldo Cruz (Programa INOVA, projetos: VPPCB-005- FIO-20-2-87, VPPCB-007-18-2-134), União Europeia (Consórcio ZIKAlliance: H2020 734548) e CuraZika Foundation.

À minha mãe Maria Luiza, à minha avó Inocência e ao meu noivo Fernando com todo amor e gratidão, por se manterem presentes e pelo incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

E às crianças e famílias acometidas pela Síndrome Congênita do Zika.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças, sabedoria e discernimento para chegar até aqui.

À minha orientadora Prof^a Dra. Maria pela oportunidade e confiar este trabalho a mim. Pela orientação dedicada e humana, pelos ensinamentos e paciência ao longo destes anos. Por sua amizade, empatia e profissionalismo diante do período desafiador da pandemia, nos ouvindo e buscando formas e alternativas para que pudéssemos contribuir para Ciência naquele momento e realizar nossos mestrados / doutorados. Por seu olhar crítico que me fazia expandir as ideias. Por sempre estar disponível profissional e pessoalmente. Obrigada por me ouvir e aconselhar em um dos momentos mais difíceis e por continuar me inspirando a ser pesquisadora.

À minha co-orientadora Dra. Isabelle Viana pela oportunidade e por ter confiado em meu trabalho. Pelas inúmeras conversas e reuniões e por ter sido tão otimista e paciente. Por ter me recebido em seu laboratório, me proporcionando períodos agradáveis e de muito aprendizado. Por estar comigo em todas as etapas e recomeços, me incentivando e acreditando que “eu ia dar conta”, principalmente, quando eu estive fora do Brasil, mantendo contato e discutindo os resultados. Pela oportunidade no grupo do Prof^o Gautrot. Obrigada por sua empatia, amizade e por me ouvir e aconselhar quando tudo parecia “fora dos trilhos” e por me inspirar como cientista. E também, por todas as dicas turísticas, gastronômicas, culturais, musicais e de imigração.

Ao Prof. Dr. Roberto Lins pela oportunidade e confiança no meu trabalho. Por ter aberto as portas de seu laboratório para os períodos de estágio. Pela oportunidade ímpar e intermédio do contato com o Prof^o Gautrot. Pelas inúmeras conversas e discussões e por ter compartilhado seu conhecimento e ideias para realização desta pesquisa.

Ao Prof^o Dr. Alberto Duarte pelo suporte institucional.

Ao Prof^o Dr. Julien Gautrot por ter me aceitado em seu grupo. Por sua orientação, oportunidades e troca de conhecimento constante. Pela confiança em meu trabalho e todo suporte para condução do projeto.

Aos meus colegas da Experimental: Luana, Anna Júlia, Nátalli, Anna Cláudia, Marina, Yasmim, Ricardo, Milena, Emily, Danielle, Iara, Júlia, Sarah, Luanda, Nilson e Kelly.

Por todos os momentos dentro e fora do laboratório, pela amizade e união nos momentos difíceis. Que sorte dividir meus dias com vocês.

À Luana (Lu) pela amizade de longa data, por continuar sendo meu braço direito no laboratório e toda ajuda (que foi muita) com os experimentos, mesmo enquanto eu estive na Inglaterra. Obrigada pela parceria, por todas as discussões científicas e por compartilhar os momentos felizes e de frustração.

À Anna Julia (Rúlia) pela amizade, parceria de doutorado e empréstimos de caneta permanente. Pelas inúmeras conversas científicas e outras nem tanto. Por me acolher (e quase me resgatar) em Berlim e me proporcionar ótimas lembranças desta jornada.

À Luanda (Luandita) pela amizade e por dividir novamente seu espaço comigo por uns meses. Pelas boas memórias como “roommates”, home office na quarentena e momentos de desabafo e celebrações.

À Natalli (Natê) pela amizade, por todo carinho e ajuda na compra de passagens. Mas principalmente, por ter sido um ponto de apoio em momentos de incerteza.

À Anna Cláudia (Anninha) pela amizade, parceria de doutorado e por ter sido a porta de entrada no grupo da Maria. Por toda ajuda com os experimentos e PCRs virais.

Ao Ricardo pela ajuda nos experimentos, por toda troca de conhecimento, palavras de apoio e pelas diversas oportunidades para colaborar nos artigos científicos.

À Elaine (Rê) por seu apoio, carinho, amizade e, claro...os amuletos da sorte.

Ao Cyro Brito por toda ajuda e suporte nos trabalhos realizados no p3.

À todos do grupo BIOMAT na Fiocruz Pernambuco, que me acolheram durante o tempo que estive por lá. Especialmente ao Bruno, Camila e Elisa que me ensinaram as técnicas e me ajudaram com os experimentos.

Aos membros do grupo de pesquisa do Profº Gautrot que me acolheram e me ajudaram. Em especial ao Carlos e Lan que me ensinaram tudo o que eu precisava para conduzir o projeto.

Aos amigos que a Queen Mary me deu: Carlos, Hilda, Nivi e Arun. Vocês foram minha família fora do Brasil e sempre vou levar na memória os momentos que compartilhamos,

as palavras de incentivo e os registros de cruzar o Reino Unido de carro até o topo das montanhas escocesas (literalmente). E ao apoio dos demais amigos de Londres.

Aos demais docentes, à toda equipe dos setores técnicos e funcionários do LIM-56 que nos oferecem suporte, auxílio e apoio em diversos momentos.

Aos funcionários do biotério pelo cuidado com nossos animais.

Aos amigos e professores do Departamento de Imunologia, pelo apoio e amizade.

Aos professores membros da CCP-Imuno (Prof^a Ana Lepique, Prof^a Alessandra Pontillo e Prof^o Niels Câmara) pelos momentos enriquecedores de aprendizado durante os períodos de representação discente.

Aos amigos da comissão organizadora do Curso de Férias, pelos momentos que compartilhamos dentro e fora do curso.

Aos amigos e equipe da plataforma COVID Verificado (Anna Cláudia, Déborah, Gislane, Felipe, Letícia, Marina, Nayara, Renato e Taís) pelo tempo juntos atuando na divulgação científica durante a pandemia. Tenho muito orgulho do trabalho que fizemos.

À secretária Eni pela atenção, apoio e suporte em inúmeros momentos.

Aos professores da banca de qualificação pelas sugestões e questionamentos que enriqueceram este trabalho: Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, Dra. Luciana Barros de Arruda e Dra. Vivian Vasconcelos Costa.

Ao suporte financeiro das agências de fomento (CAPES, CNPq e FAPESP). Ao CNPq e FAPESP pela concessão de bolsa.

Em especial, agradeço à minha mãe Maria Luiza (Malu) e minha avó Inocência (Dna. Nena) por toda dedicação, educação e base para que eu pudesse chegar até aqui e ser alguém que me orgulho. Por se doarem, incentivarem meus sonhos e sempre acreditarem em mim. Por terem sido mães e pai. Vocês são meus exemplos e inspiração.

Ao meu noivo e parceiro de vida Fernando, pelo imenso amor, dedicação e companheirismo. Por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não o fazia. Pelo incentivo diário e por ter sido meu porto seguro e combustível quando eu pensava em desistir. Por ter estado sempre ao meu lado, vivendo e vendo de perto o lado do

doutorado fora do laboratório (as vezes dentro do laboratório também). Por ter sido paciente e presente, principalmente diante do maior desafio de nossas vidas: a distância. Obrigada pela compreensão e por todo esforço para cruzar o mundo algumas vezes e estar comigo nos momentos mais importantes daquele um ano fora de casa.

Às minhas irmãs Ellen e Ane, pelo amor, torcida e apoio nesta jornada. E agora à nossa “mascotinha” Liz, minha sobrinha, que trouxe cor aos meus dias.

À minha tia Elci, que sempre me deu carinho e que nunca escondeu o orgulho que sentia de mim. E a tia Marlene, que sempre me incentivou, acreditou em mim e foi fundamental para minha formação.

Aos meus avós do coração Severino e Antônia que no olhar transmitem carinho e apoio.

Aos demais familiares e amigos que me apoiaram e acreditaram em mim.

À família do meu noivo que tanto torceu por mim e se fez presente enquanto estive longe. Em especial minha cunhada Tatiane, minha sogra Sônia, Nivaldo, tia Cristiane, tio Reginaldo e minha pequena Ana Clara (pelas constantes trocas de mensagens).

Ao meu afilhado Luigi que, mesmo tão pequeno, me ensina diariamente sobre amor incondicional e a ser uma pessoa melhor.

Aos meus sobrinhos Mariana, Enzo, Lívia, Felipe, Pietro e Gael, por me proporcionarem momentos de leveza e alegria. Ao meu pequeno e carinhoso Enzo, por também se manter presente no meu dia a dia fora do Brasil, aliviando o fardo de estar sozinha.

Ao meu pai, que pela primeira vez, se fez presente e demonstrou seu apoio.

E à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.

MUITO OBRIGADA!!!

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

TEIXEIRA, F.M.E. **Desenho e avaliação de eficácia de uma vacina de DNA contra o vírus zika em camundongos.** 2023.163p Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023

Os efeitos congênitos e pós-natais da infecção pelo vírus Zika (ZIKV) somado a sua relevância epidemiológica, ressaltam a importância para o desenvolvimento de estratégias vacinais profiláticas e, até o momento, não há nenhuma vacina licenciada para uso. Neste projeto, desenvolvemos formulações vacinais de DNA codificando para as proteínas pré-membrana/membrana e envelope (E) do ZIKV objetivando abordagens de otimização para almejar imunogenicidade adequada. Uma candidata vacinal de DNA (descrita como ZK_ΔSTP) utilizando a sequência líder tPA-SP (*tissue plasminogen activator signal peptide*) para aumento da expressão e secreção das proteínas sintetizadas, com remoção da região de ancoramento *stem* da proteína E, foi selecionada pela maior imunogenicidade. A imunização de camundongos C57BL/6 imunocompetentes com ZK_ΔSTP, foi capaz de induzir células esplênicas secretoras de IFN- γ ZIKV-específicas por até três meses e geração de anticorpos neutralizantes. A imunização com ZK_ΔSTP em camundongos adultos C57-IFN α / $\beta^{-/-}$ contribuiu para proteção ao desafio de infecção por ZIKV, com redução da carga viral no cérebro aos 21 dias após infecção (dpi) em relação ao grupo controle (PBS). Adicionalmente, 42% destes animais mostraram carga viral abaixo do limite de detecção. Os títulos de anticorpos IgG anti-ZIKV exibiram queda a partir do segundo mês da vacinação, o que comprometeu a proteção da prole de mães imunizadas em período superior a dois meses. Contudo, a imunização associada ao adjuvante Alum foi capaz de elevar os títulos e duração dos anticorpos neutralizantes, promovendo efeito protetor a curto e longo prazo em camundongos adultos. A curto prazo, a carga viral foi indetectável no cérebro de animais vacinado aos 10dpi. A longo prazo, dois terços dos animais vacinados, com ou sem dose de reforço adicional, tiveram carga viral no cérebro abaixo do limite de detecção aos 10 dpi. A fim de aumentar a expressão dos antígenos vacinais, foi desenvolvido um sistema de

nanopartículas (NPs) funcionalizadas com escovas de polímeros catiônicos, utilizando o polímero poli(dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA) para entrega de DNA plasmideal (pDNA). Este sistema mostrou ligação de alta afinidade ao pDNA com formação de complexos catiônicos e sua internacionalização celular. Esta abordagem também permitiu a transfecção celular com eficiência comparável à sistemas de transfecção comerciais, porém sem efeito citotóxico pronunciado. Por fim, esta abordagem foi eficiente na transfecção da vacina candidata ZK_ΔSTP com expressão da proteína do E do ZIKV. Em conjunto, os resultados apontam para uma estratégia vacinal que pode ser promissora em proteger contra a infecção por ZIKV e seus efeitos adversos. Da mesma forma, o racional para o desenho desta formulação e sistema de entrega baseado em NPs policatiônicas emergem como uma estratégia inovadora e potencial para outras vacinas de DNA e RNA. Oferecendo subsídios não apenas para vacinas gênicas, mas também para outras imunoterapias.

Palavras-chaves: vacina de DNA, Zika vírus, imunogenicidade, otimização, sistemas de entrega.

ABSTRACT

TEIXEIRA, F. M. E. **Design and efficacy evaluation of a DNA vaccine against zika virus in mice.** 2023. 163p. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023

Congenital and postnatal outcomes of Zika virus (ZIKV) infection, added to its epidemiological relevance, highlight the importance for prophylactic vaccine strategies development and, to date, there is no vaccine licensed. In this project, we developed DNA vaccine formulations encoding to ZIKV pre-membrane/membrane and envelope (E) proteins, aiming different optimization approaches to achieve adequate immunogenicity. A DNA vaccine candidate (described as ZK_ΔSTP) using the tPA-SP (tissue plasminogen activator signal peptide) leader sequence to increase expression and secretion of synthesized proteins, with depletion of the stem anchoring region of the E protein was selected due higher immunogenicity. Immunization of immunocompetent C57BL/6 mice with ZK_ΔSTP was able to induce ZIKV-specific IFN- γ -secreting splenic cells for up to three months and generation of neutralizing antibodies. Immunization with ZK_ΔSTP in adult C57-IFN α/β -/- mice contributed to protection against ZIKV challenge, with reduced viral load in the brain at 21 days post infection (dpi) in comparison to the control group (PBS). In addition, 42% of these animals showed a viral load below the detection limit. Anti-ZIKV IgG antibody titers decreased from the second month of vaccination, which compromised the protection of the offspring from immunized mothers for a period longer than two months. However, the immunization associated with the Alum adjuvant was able to increase the titers and duration of neutralizing antibodies, promoting a short- and long-term protective effect in adult mice. At the short term, viral load was undetectable in the brains of animals vaccinated at 10dpi. While at the long term, two-thirds of animals vaccinated, with or without an additional booster dose, showed a brain viral load below the detection limit at 10 dpi. In order to increase the expression of vaccine antigens, a system of nanoparticles (NPs) functionalized with cationic polymer brushes was developed, using the polymer poly(dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA) to deliver plasmid DNA (pDNA). This system showed high affinity binding to pDNA with formation of cationic complexes and their

cellular internationalization. This approach also allowed cell transfection with efficiency comparable to commercial transfection systems, but without pronounced cytotoxic effect. Finally, this approach was efficient in transfecting the ZK_ΔSTP candidate vaccine with ZIKV E protein expression. Taken together, the results point to a vaccine strategy that may be promising to protect against ZIKV infection and its adverse outcomes. As well as, the rational design for this formulation and delivery system based on polycationic NPs emerges as an innovative and potential strategy for other DNA and RNA vaccines. Offering support not only for genetic vaccines, but also for other immunotherapies.

Keywords: DNA vaccine, Zika virus, immunogenicity, optimization, delivery systems.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Características moleculares do vírus Zika e sua epidemiologia.....	20
1.2. Patogênese da doença e transmissão vertical do ZIKV	24
1.3. Vacinas contra o ZIKV.....	28
1.4. Vacinas de DNA e adjuvantes para potencialização da resposta vacinal 31	
1.4.1. Adjuvantes moleculares.....	34
1.4.2. Formulações adjuvantes sintéticas.....	36
1.5. Métodos de entrega de vacinas de DNA.....	37
1.5.1. Nanopartículas de escovas de polímeros para entrega de ácidos nucleicos.....	41
.....	43
1.6. Justificativa e hipótese do trabalho	43
2. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características moleculares do vírus Zika e sua epidemiologia

O vírus Zika (*Zika virus* – ZIKV) é um Flavivírus, pertencente à família *Flaviviridae*, que inclui outros importantes vírus humanos, como os vírus da dengue (*Dengue virus* – DENV), vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus* – WNV), da febre amarela (*Yellow Fever virus* – YFV) e da encefalite japonesa (*Japanese Encephalitis virus* – JEV). É um vírus de RNA de fita simples, cujo genoma contém uma única sequência de leitura aberta (*open reading frame* – ORF) que codifica três proteínas estruturais (capsídeo – C, pré-membrana/membrana – prM/M e envelope – E) e sete proteínas não estruturais (*non-structural* – NS: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (KUNO; CHANG, 2007; MEDIN; ROTHMAN, 2017) (figura 1). Em função de diferenças genotípicas, foram determinadas até o momento duas linhagens de ZIKV, africana e asiática (HADDOW; SCHUH; YASUDA; KASPER *et al.*, 2012).

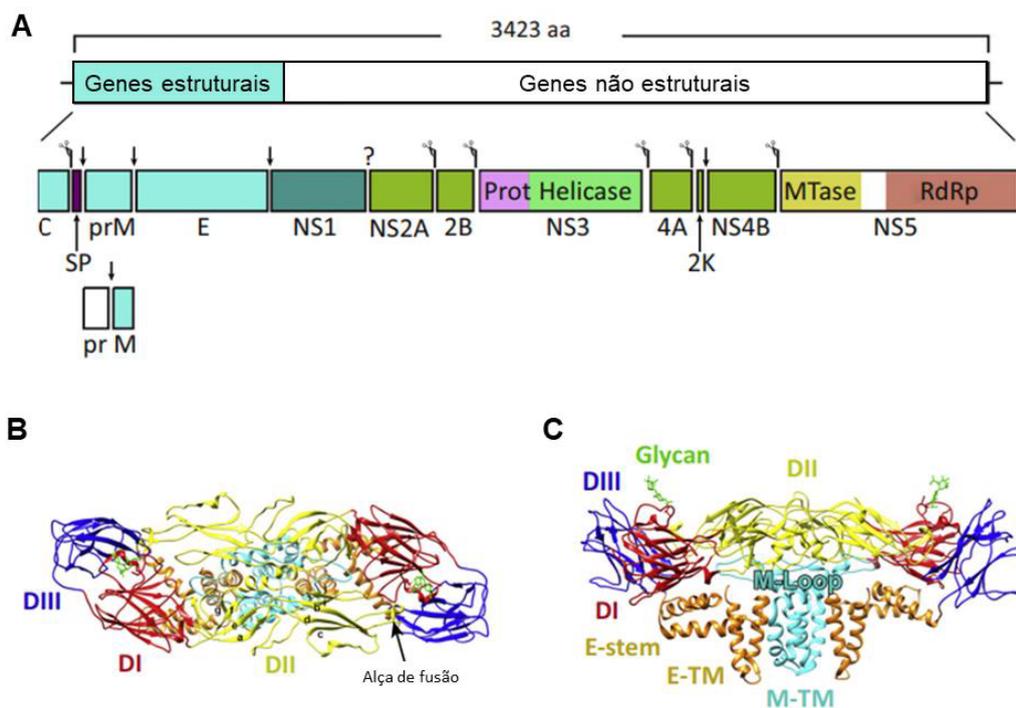


Figura 1. Organização estrutural e genômica do ZIKV. (A) O ZIKV é um vírus de RNA de fita simples e possui um genoma de aproximadamente 11kb que codifica para três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3,

NS4A, NS4B e NS5). (B) Visualização estrutural por microscopia crio-eletrônica do dímero de proteína E-M, mostrado em forma de fita, visto ao longo do eixo duplo. (C) Vista lateral do dímero E-M, mostrando os ectodomínios de E, bem como os domínios *stem* e transmembrana (TM) das proteínas E (laranja) e M (ciano) (Adaptado, (SHI; GAO, 2017).

A proteína C é responsável pela encapsulação da partícula viral e proteção do material genético, com papel essencial no controle da estabilidade da poliproteína estrutural subsequente, participando da montagem do vírus (HASAN; SEVVANA; KUHN; ROSSMANN, 2018; RANA; SLON CAMPOS; LECCESE; FRANCOLINI *et al.*, 2018). Em sua extremidade N-terminal há uma região formada por 5 α -hélices ($\alpha 1 - \alpha 5$), sendo que a hélice $\alpha 5$ precede a proteína prM na poliproteína viral. A porção C-terminal da hélice $\alpha 5$ é um peptídeo sinal que direciona a translocação da prM através da membrana do retículo endoplasmático (RE) para o lúmen do RE. Dentro do lúmen, a peptidase de sinal do hospedeiro cliva na junção da hélice $\alpha 5$ -prM. Ao passo que na face citoplasmática, a protease viral NS2B/NS3 cliva na junção $\alpha 4$ - $\alpha 5$ para liberação da proteína C madura (RANA; SLON CAMPOS; LECCESE; FRANCOLINI *et al.*, 2018).

A prM sofre clivagem para produzir a proteína M durante a maturação das partículas e desempenha papel crítico na montagem da partícula viral, formação do heterodímero com a proteína E e na manutenção de sua estrutura (HASAN; SEVVANA; KUHN; ROSSMANN, 2018). A proteína E contém sítios de ligação à receptores celulares que facilitam a fusão da membrana entre o vírus e a célula hospedeira. Uma vez que o vírus está no endossomo, o microambiente ácido dirige a trimerização irreversível da proteína E, resultando na fusão do vírus e membrana celular e aumento da infectividade. Além disso, a proteína E contém três domínios distintos (*envelope domain* – ED: EDI, EDII e EDIII) e domínios de hélice transmembrana (TM: TM1 e TM2), os quais estão ligados à região de ancoramento *stem* que compreende regiões de α hélices ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) na extremidade C-terminal da proteína E (DAI; SONG; LU; DENG *et al.*, 2016; ZHANG; JIA; SHEN; WANG *et al.*, 2017) (figuras 1B e 1C).

As proteínas não estruturais coordenam os aspectos intracelulares para replicação viral, montagem, proteólise, maturação e regulação da imunidade do hospedeiro (HASAN; SEVVANA; KUHN; ROSSMANN, 2018). Vale destacar que

a proteína NS3 é a principal protease viral para clivagem da poliproteína, além de exercer atividade de helicase no processo de replicação. Assim como, a proteína NS5 desempenha papel chave no estabelecimento da infecção, replicação e evasão da resposta imune do hospedeiro (SHI; GAO, 2017).

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na Floresta Zika, na Uganda, de um macaco *rhesus* sentinela que fazia parte de um estudo sobre febre amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Já a primeira infecção humana foi relatada na Uganda em 1964 (SIMPSON, 1964). Até 2007, as infecções em humanos por ZIKV foram esporádicas e de pequena escala, relatadas em países da África e sudeste da Ásia (MOORE; CAUSEY; CAREY; REDDY *et al.*, 1975; OLSON; KSIAZEK; SUHANDIMAN; TRIWIBOWO, 1981). Em 2007, a primeira grande epidemia foi relatada na Ilha Yap, na Micronésia, com quase 75% da população infectada (DUFFY; CHEN; HANCOCK; POWERS *et al.*, 2009). Em 2013, um surto de infecção ocorreu na Polinésia Francesa e o vírus se espalhou posteriormente para outras ilhas do Pacífico (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Em Abril de 2015, a transmissão do ZIKV foi notificada no Brasil e subseqüentemente detectada em grande parte das Américas (PAHO/WHO, 2017).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), casos com evidências de transmissão do ZIKV por vetores foram relatados ao longo da história em 84 países e territórios, dos quais 61 evidenciaram o surgimento do vírus após janeiro de 2015 (WHO, 2017). Mesmo com o fim da situação de emergência global em saúde pública, dados mais recentes confirmam a presença do ZIKV em 89 países e evidenciam que ainda existe o risco potencial do ZIKV continuar a se espalhar para outros países (WHO, 2022). Adicionalmente, entre janeiro de 2015 e 2018, um total de 806.928 casos autóctones suspeitos e confirmados de infecção por ZIKV haviam sido notificados à Organização Pan-Americana da Saúde em países e territórios das Américas, dos quais 27,6% dos casos foram confirmados laboratorialmente (PAHO/WHO, 2018). O maior número de casos suspeitos e confirmados foi registrado no Brasil (346.475 casos; 46%), seguido da Colômbia (108.730; 13,4%) e Venezuela (62.559; 7,7%) (PAHO/WHO, 2018).

O primeiro relato confirmado de infecção por ZIKV no Brasil, ocorreu em março de 2015 (ZANLUCA; MELO; MOSIMANN; SANTOS *et al.*, 2015), quando a análise filogenética mostrou que a cepa identificada era pertencente ao clado asiático. A epidemia promovida pela infecção pelo ZIKV teve uma extensão global e sua repercussão foi decorrente principalmente da associação sem precedentes da infecção à ocorrência de microcefalia fetal, detectada inicialmente no Brasil (TEIXEIRA; COSTA; DE OLIVEIRA; NUNES *et al.*, 2016). Estudo de caso controle realizado em Recife (epicentro de infecção por ZIKV durante a epidemia) apontou para uma forte associação da infecção congênita por ZIKV e ocorrência de microcefalia em neonatos (DE ARAÚJO; RODRIGUES; DE ALENCAR XIMENES; DE BARROS MIRANDA-FILHO *et al.*, 2016). A continuidade do estudo confirmou o ZIKV como agente etiológico da microcefalia, eliminando outros fatores de risco potenciais relacionados a este desfecho clínico (DE ARAÚJO; XIMENES; MIRANDA-FILHO; SOUZA *et al.*, 2018). Nas Américas, o Brasil concentrou quase 80% dos casos de microcefalia associados ao ZIKV (PAHO/WHO, 2017).

No auge da epidemia em 2016, 216.207 casos prováveis de doença aguda do ZIKV foram relatados no Brasil, e estima-se que 8.604 bebês nasceram com malformações (WHO, 2019). No Brasil, os dados epidemiológicos mais recentes disponíveis, apontam para 591 casos prováveis de ZIKV em gestantes registrados em 2022 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023c). Quanto à situação epidemiológica da síndrome congênita do zika (SCZ) no Brasil, entre 2015 e 2022, foram confirmados 1857 casos (cerca de 50% do total de casos de infecção congênita de outras etiologias), sendo 736 casos suspeitos notificados em 2022 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023c). Embora o período de emergência tenha sido encerrado, gestantes continuam sendo expostas ao vírus.

Dados de uma coorte de estudo de Pernambuco/Brasil mostrou que até 2017, cerca de 20% das gestantes estavam infectadas com ZIKV e deram à luz crianças com SCZ (XIMENES; MIRANDA-FILHO; MONTARROYOS; MARTELLI *et al.*, 2021). Em 2018, 5% das gestantes observadas no estudo de coorte de ZIKV em crianças e gestantes (*ZIP Study – Zika in Infants and Pregnancy study*) mostraram resultados laboratoriais compatíveis com infecção por ZIKV (LEBOV; ARIAS; BALMASEDA; BRITT *et al.*, 2019).

Um estudo de soroprevalência de arboviroses realizado em 2019, também relatou que 50%, 90% e 30% da população do Recife possuía anticorpos contra ZIKV, DENV e Chikungunya vírus (CHIKV), respectivamente. Deste modo, metade da população permanecia *naïve* ao ZIKV (BRAGA; MARTELLI; SOUZA; LUNA *et al.*, 2023). Dados do Ministério da Saúde dos últimos anos têm evidenciado o aumento alarmante do número de casos tanto de ZIKV quanto de CHIKV, inclusive com um surto de ambas no início de 2023 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b). Embora o estudo se refira à Pernambuco, reflete uma amostra e um exemplo que pode ser ampliado para o resto do país.

Com relação aos casos gerais de infecção por ZIKV, em 2022 foram notificados mais de 9 mil casos prováveis, o qual representou um aumento de 42% dos casos em relação ao ano anterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023a). Estes dados apontam que a transmissão do ZIKV permanece ativa em nosso país, enfatizando a importância da intensificação do controle dos criadouros do mosquito *Aedes aegypti*, considerando o cenário epidemiológico atual de outras arboviroses, como Dengue e CHIKV. Como também a necessidade de estudos de estratégias vacinais profiláticas e terapêuticas, de enfrentamento deste cenário.

1.2. Patogênese da doença e transmissão vertical do ZIKV

O ZIKV é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, destacando-se o *Ae. aegypti*, considerado o principal vetor de ZIKV em áreas urbanas e suburbanas, juntamente com o *Ae. albopictus*, relatado como potencial vetor do ZIKV de expansão mundial (CHOUIN-CARNEIRO; VEGARRUA; VAZEILLE; YEBAKIMA *et al.*, 2016; WONG; LI; CHONG; NG *et al.*, 2013). Outras vias de transmissão documentadas incluem exposição sexual, laboratorial, por transfusão de sangue e a transmissão vertical (intrauterina e perinatal), a qual está associada com alta taxa de morbidade fetal / neonatal (GRISCHOTT; PUHAN; HATZ; SCHLAGENHAUF, 2016; MLAKAR; KORVA; TUL; POPOVIĆ *et al.*, 2016) (figura 2).

A apresentação clínica da infecção por ZIKV pode ser leve ou mesmo assintomática na maioria dos casos (cerca de 80%), sendo exantema, febre

baixa, artralgia, conjuntivite não purulenta, cefaleia e mialgia os sintomas mais frequentes (MUSSO; GUBLER, 2016). Entretanto, duas principais complicações neurológicas graves relacionadas ao ZIKV foram identificadas: Síndrome de Guillian-Barré (*Guillain-Barré Syndrome* – GBS), primeiramente descrita durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa em 2013 (OEHLER; WATRIN; LARRE; LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014), e microcefalia associada à SCZ, relatada durante a epidemia brasileira em 2015 (MLAKAR; KORVA; TUL; POPOVIĆ *et al.*, 2016; VESNAVER; TUL; MEHRABI; PARISSONE *et al.*, 2017).

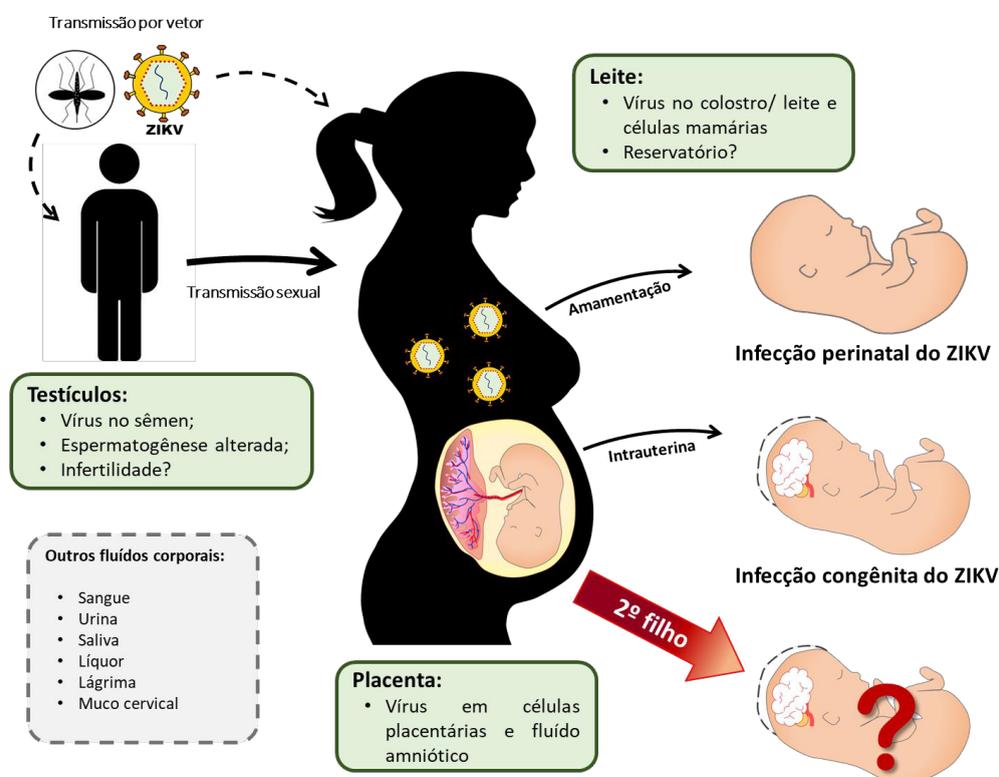


Figura 2. Transmissão vertical do ZIKV. O ZIKV apresenta tropismo para diferentes tecidos e fluidos corporais que permitem diferentes rotas de transmissão. A infecção por ZIKV em gestantes pode ocorrer tanto pela picada do mosquito infectado, quanto pelo contato sexual com o parceiro infectado. A transmissão vertical do ZIKV pode ocorrer de maneira congênita durante a gestação ou no período pós natal pela amamentação (Adaptado, (TEIXEIRA; PIETROBON; OLIVEIRA; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

A GBS é caracterizada por uma polirradiculoneuropatia inflamatória aguda que resulta em fraqueza dos membros e dos nervos cranianos, muitas vezes com comprometimento respiratório, com conseqüentes limitações na função física (HUGHES; HADDEN; GREGSON; SMITH, 1999). Enquanto que a SCZ

compreende um padrão de lesão cerebral fetal grave, incluindo microcefalia e lesão ocular, associada à infecção durante a gravidez (MOORE; STAPLES; DOBYNS; PESSOA *et al.*, 2017). A SCZ também está relacionada a outras anormalidades e/ou malformações fetais, como a craniossinostose, restrição de crescimento intrauterino (*intrauterine growth restriction* – IUGR), malformações craniofaciais, hipoplasia pulmonar e artrogripose (MARQUES; SANTOS; SANTIAGO; MARQUES *et al.*, 2019). Outros efeitos da infecção congênita incluem falha de linguagem, desenvolvimento neuropsicomotor prejudicado, impedimento de crescimento pós-natal, entre outros (LOPES MOREIRA; NIELSEN-SAINES; BRASIL; KERIN *et al.*, 2018; MARTINS; ALVES DA CUNHA; ROBAINA; RAYMUNDO *et al.*, 2021; TEIXEIRA; PIETROBON; OLIVEIRA; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Além disso, os efeitos adversos pós-natais da infecção congênita do ZIKV não estão limitados à presença de microcefalia, visto que crianças normocefálicas tem apresentado alguma complicação de desenvolvimento (BLACKMON; EVANS; FERNANDES; LANDON *et al.*, 2022; FAIÇAL; DE OLIVEIRA; OLIVEIRA; DE ALMEIDA *et al.*, 2019; LOPES MOREIRA; NIELSEN-SAINES; BRASIL; KERIN *et al.*, 2018; MARBÁN-CASTRO; VAZQUEZ GUILLAMET; PANTOJA; CASELLAS *et al.*, 2022; PRATA-BARBOSA; MARTINS; GUASTAVINO; CUNHA, 2019).

A patogênese da infecção pelo ZIKV se inicia pela sua inoculação no hospedeiro através da picada do mosquito-vetor. Na pele, os queratinócitos são permissivos ao ZIKV, um dos sítios primários durante a infecção (HAMEL; DEJARNAC; WICHIT; EKCHARIYAWAT *et al.*, 2015). Apesar do vírus ser capaz de infectar células epiteliais e células dendríticas (*dendritic cells* – DC) imaturas, através dos receptores de entrada DC-SIGN, AXL e Tyro-3 (HAMEL; DEJARNAC; WICHIT; EKCHARIYAWAT *et al.*, 2015), também foi constatado que o ZIKV é sensível aos efeitos antivirais dos interferons (IFN) tipo I, II (HAMEL; DEJARNAC; WICHIT; EKCHARIYAWAT *et al.*, 2015) e III (BAYER; LENNEMANN; OUYANG; BRAMLEY *et al.*, 2016). A própria inflamação local iniciada pela picada promove o recrutamento de fagócitos, que podem carrear o vírus e contribuir para sua disseminação pelo organismo (PINGEN; BRYDEN; PONDEVILLE; SCHNETTLER *et al.*, 2016).

A via de IFN pode ser ativada após o reconhecimento de partículas virais e exerce papel importante no estabelecimento de respostas imunes antivirais. Em humanos, a proteína NS5 do ZIKV antagoniza a sinalização de IFN por se

ligar à STAT2 promovendo a degradação proteossomal, mas é incapaz de se ligar de forma eficiente a STAT2 de camundongo (GRANT; PONIA; TRIPATHI; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2016). Portanto, a sinalização de STAT2 é importante na resposta ao ZIKV, visto que camundongos deficientes de STAT2 são suscetíveis à infecção (TRIPATHI; BALASUBRAMANIAM; BROWN; MENA *et al.*, 2017), assim como os camundongos deficientes de receptores de IFN do tipo I. Sabe-se também que o ZIKV induz a ativação do receptor de hidrocarboneto de arila (*aryl hydrocarbon receptor* – AHR), o qual suprime a produção de IFN-I e contribui para o estabelecimento da infecção. Deste modo, o uso de antagonistas de AHR mostra redução da replicação viral e das malformações fetais relacionadas (GIOVANNONI; BOSCH; POLONIO; TORTI *et al.*, 2020).

O ZIKV é neurotrópico e pode atingir células progenitoras neurais, astrócitos e neurônios em todos os estágios de desenvolvimento, em decorrência da expressão de AXL nas células endoteliais da barreira hematoencefálica (MINER; DIAMOND, 2017; VAN DEN POL; MAO; YANG; ORNAGHI *et al.*, 2017). A infecção *in vitro* de células progenitoras neurais humanas induz morte celular associada à proliferação desequilibrada e crescimento atenuado (TANG; HAMMACK; OGDEN; WEN *et al.*, 2016). Em modelo murino, os fetos infectados mostraram anormalidades semelhantes às descritas em humanos (CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; FREITAS *et al.*, 2016; LI; XU; YE; HONG *et al.*, 2016; MINER; CAO; GOVERO; SMITH *et al.*, 2016).

Com relação à infecção congênita pelo ZIKV, danos mais graves estão relacionados à infecção no primeiro trimestre da gestação (CHIMELLI; AVVAD-PORTARI, 2018; DE NORONHA; ZANLUCA; BURGER; SUZUKAWA *et al.*, 2018), com dados semelhantes em estudos com camundongos infectados na primeira semana de gestação (MINER; CAO; GOVERO; SMITH *et al.*, 2016; YOCKEY; VARELA; RAKIB; KHOURY-HANOLD *et al.*, 2016). Alguns dos mecanismos associados à passagem transplacentária do ZIKV para o feto incluem: participação da via da autofagia para formação de microvesículas contendo o vírus; translocação placentária de células infectadas ou virions livres; e capacidade de infectar células placentárias pela alta expressão dos receptores de entrada Axl, Tyro3 e TIM1 (TEIXEIRA; PIETROBON; OLIVEIRA; OLIVEIRA

et al., 2020). Outros fatores também podem contribuir para o desfecho de infecção congênita do ZIKV. A obesidade gestacional, por exemplo, promove resposta imune antiviral placentária prejudicada, com diminuição da expressão dos fatores antivirais RIG-I, MDA-5 e IRF-3, e conseqüente comprometimento da via de sinalização do IFN tipo I na interface materno-fetal (BRANCO; DE OLIVEIRA; PEREIRA; ALBERCA *et al.*, 2023).

O ZIKV foi detectado em órgãos reprodutores (útero, vagina, testículos), tecido ocular (células ganglionares, nervo ótico e córnea), fluídos (lágrima, saliva, sêmen, urina, líquido amniótico), hepatócitos, células epiteliais, fibroblastos, células renais, células mononucleares do sangue periférico, neutrófilos, além do tecido placentário (NGONO; SHRESTA, 2018; PAZ-BAILEY; ROSENBERG; DOYLE; MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2018). Assim como, foi recuperado de tecidos fetais após infecção periférica materna, confirmando a transmissão materno-fetal (CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; FREITAS *et al.*, 2016; MINER; CAO; GOVERO; SMITH *et al.*, 2016).

1.3. Vacinas contra o ZIKV

Dada a eficácia e sucesso da vacina de vírus atenuado 17DD contra a febre amarela e o recente avanço dos testes clínicos da vacina de vírus atenuado tetravalente contra o DENV (Butantan-DV) (BUTANTAN, 2023), o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra o ZIKV é uma possibilidade real e diversas vacinas candidatas estão em vários estágios de desenvolvimento (POLAND; KENNEDY; OVSYANNIKOVA; PALACIOS *et al.*, 2018). Além disso, a infecção por ZIKV faz parte da lista de doenças prioritárias da OMS para pesquisa e desenvolvimento (WHO, 2023). Contudo, até o momento, não há vacinas profiláticas ou terapêuticas licenciadas contra infecções por ZIKV. Muito embora a pandemia de COVID-19 (*coronavirus disease* - COVID) seja uma tragédia, o que vimos foi que o investimento maciço levou ao desenvolvimento de mais de 100 vacinas em fase clínica em cerca de um ano (WHO, 2021). Para ZIKV, os estudos clínicos somam somente 16 formulações vacinais (WHO, 2020). Devemos considerar que a contingência da

COVID-19 foi para qualquer idade e sexo, quando para a ZIKV, foi perigosamente a transmissão vertical e SCZ.

As proteínas de superfície são as mais antigênicas e frequentemente consideradas como os melhores candidatos para imunização, sendo a proteína E a principal indutora de anticorpos neutralizantes contra a infecção pelo ZIKV (ALAM; ALI; AHAMAD; MALIK *et al.*, 2016; HASAN; MILLER; SAPPARAPU; FERNANDEZ *et al.*, 2017; SAPPARAPU; FERNANDEZ; KOSE; BIN CAO *et al.*, 2016). Diversos estudos iniciais de vacinas contra ZIKV foram desenvolvidos visando o uso das proteínas completas prM/M e E para geração de resposta vacinal ótima e proteção contra a infecção de camundongos e primatas não humanos adultos (ABBINK; LAROCCA; DE LA BARRERA; BRICAULT *et al.*, 2016; DOWD; KO; MORABITO; YANG *et al.*, 2016; LAROCCA; ABBINK; PERON; ZANOTTO *et al.*, 2016; PARDI; HOGAN; PELC; MURAMATSU *et al.*, 2017). No entanto, outros estudos têm direcionado suas formulações para fragmentos de domínios de proteína E do ZIKV, particularmente EDIII, permitindo assim identificar regiões importantes na proteína E mais eficazes e seguras para o desenvolvimento de vacinas (TAI; HE; WANG; SUN *et al.*, 2018; ZHU; LI; AFRIDI; ZU *et al.*, 2018). Além disso, para alguns flavivírus, a remoção de regiões de ancoragem da proteína E, como as porções TM, é capaz de melhorar a imunogenicidade vacinal (LÓPEZ-CAMACHO; ABBINK; LAROCCA; DEJNIRATTISAI *et al.*, 2018; MACIEL; CRUZ; CORDEIRO; DA MOTTA *et al.*, 2015).

As vacinas candidatas para ZIKV incluem aquelas baseadas em vírus inativados ou vírus atenuados, vetores virais, partículas semelhantes a vírus, vacinas de subunidades, vacinas gênicas de RNA mensageiro (mRNA) e vacinas de DNA (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020; POLAND; KENNEDY; OVSYANNIKOVA; PALACIOS *et al.*, 2018; POLAND; OVSYANNIKOVA; KENNEDY, 2019).

A vacina de mRNA expressando as proteínas prM e E foi capaz de proteger camundongos e primatas não humanos contra cepas heterólogas de ZIKV (PARDI; HOGAN; PELC; MURAMATSU *et al.*, 2017). Vacinas de DNA direcionadas para as mesmas proteínas da cepa brasileira de ZIKV, bem como uma vacina de vírus inativado purificado, também foram capazes de conferir

proteção completa contra a infecção em camundongos (LAROCCA; ABBINK; PERON; ZANOTTO *et al.*, 2016) e macacos *rhesus* (ABBINK; LAROCCA; DE LA BARRERA; BRICAULT *et al.*, 2016). Resultados similares foram observados com vacinas construídas com base na cepa da Polinésia Francesa, com proteção correlacionada à atividade neutralizante do soro (DOWD; KO; MORABITO; YANG *et al.*, 2016). Entretanto, nestes estudos não foi demonstrado se essa proteção evita alterações congênitas ou se promove resposta protetora de longa duração.

Estudos subsequentes, utilizando diferentes plataformas vacinais, demonstraram proteção contra a infecção congênita do ZIKV em camundongos, capazes de prevenir a transmissão vertical, dano placentário e alterações fetais (LAROCCA; MENDES; ABBINK; PETERSON *et al.*, 2019; RICHNER; JAGGER; SHAN; FONTES *et al.*, 2017; SHAN; MURUATO; JAGGER; RICHNER *et al.*, 2017; TAI; HE; WANG; SUN *et al.*, 2018; ZHU; LI; AFRIDI; ZU *et al.*, 2018). Contudo, algumas lacunas permanecem em aberto, quanto à manutenção dos títulos de anticorpos neutralizantes a longo prazo. Assim como, avaliação da proteção materna na prole, para prevenir danos neuropsicomotores e estudos dos parâmetros de resposta imune celular.

Grande progresso tem sido feito no desenvolvimento de vacinas contra o ZIKV desde o surto em 2015, com dezenas de formulações vacinais candidatas em desenvolvimento pré-clínico (POLAND; OVSYANNIKOVA; KENNEDY, 2019). De acordo com a OMS, 16 candidatas vacinais estão em ensaios clínicos de Fase 1, e apenas 2 formulações vacinais encontram-se em fase clínica II de testagem (WHO, 2020).

Dentre as principais vacinas candidatas contra ZIKV em fase I de testes, as formulações com resultados clínicos mais avançados consistem em vacinas de DNA (POLAND; OVSYANNIKOVA; KENNEDY, 2019). As vacinas de DNA produzidas pela *Inovio Pharmaceuticals* (EUA) e pelo *National Institutes of Health* (NIH, EUA), chamadas de VRC-ZKADNA090-00VP e VRC-ZKADNA085-00-VP, respectivamente, codificam as proteínas prM e E da cepa de ZIKV da Polinésia Francesa (H/PF/2013). Estudos exploratórios mostraram que estas vacinas foram imunogênicas em camundongos BALB/c e C57BL/6, induzindo a produção de títulos elevados de anticorpos neutralizantes. O efeito na redução

de viremia após desafio de infecção estão sendo avaliados em primatas (macaco-rhesus) (DOWD; KO; MORABITO; YANG *et al.*, 2016; GAUDINSKI; HOUSER; MORABITO; HU *et al.*, 2018). Adicionalmente, a administração desta vacina de DNA previamente à concepção também mostrou eficácia contra a infecção congênita em camundongos (JAGGER; DOWD; CHEN; DESAI *et al.*, 2019) e macaco-rhesus (VAN ROMPAY; KEESLER; ARDESHIR; WATANABE *et al.*, 2019).

Embora diversos estudos pré-clínicos tenham demonstrado resultados promissores na proteção da infecção congênita contra o ZIKV, ainda não se conhece o prosseguimento dos estudos clínicos. Os estudos disponíveis na literatura, nos permite identificar pontos a serem explorados e melhorados para a construção de uma vacina de alta eficácia. Desta forma, trabalhar com estratégias que possam ser otimizadas, permite transpor essas lacunas. Em conjunto, o sucesso das vacinas contra COVID-19, em sua maioria, vacinas de material genético, as quais somam 60 vacinas candidatas em estudos clínicos (WHO, 2023), demonstram o quão promissor são as vacinas de DNA tendo em vista os avanços no desenvolvimento de adjuvantes moleculares, vetores vacinais e sistemas de entrega para ácidos nucleicos.

1.4. Vacinas de DNA e adjuvantes para potencialização da resposta vacinal

As vacinas de DNA, são vetores de expressão que utilizam sinais de transcrição e as organelas das células eucarióticas transfectadas para expressão do antígeno *in situ*, normalmente sob controle de um promotor viral (ESTCOURT; MCMICHAEL; HANKE, 2004). Em vacinas de DNA o mais comumente utilizado é o promotor constitutivo do citomegalovírus humano (CMV), que é altamente ativo na maioria das células de mamíferos, transcrevendo níveis elevados de mRNA quando comparados a promotores celulares ou virais alternativos (WILLIAMS, 2013).

Em geral, as vacinas de DNA são baseadas em plasmídeos bacterianos que codificam sequências polipeptídicas de antígenos candidatos sem a necessidade de utilizar agentes patogênicos em seu processo de fabricação (LI;

PETROVSKY, 2016; RAJCÁNI; MOSKO; REZUCHOVÁ, 2005). Conseqüentemente, não há risco de patogenicidade, devido ao vírus incompletamente inativado ou por um vírus atenuado parcialmente revertido para sua forma virulenta (RAJCÁNI; MOSKO; REZUCHOVÁ, 2005). Evitando, assim, o risco das vacinas com organismos vivos atenuados, especialmente quando direcionadas ao público mais suscetível às infecções, como idosos, gestantes e neonatos.

As vacinas de DNA podem ser administradas por diferentes vias (intramuscular, subcutânea, mucosa ou intradérmica), sendo necessário ganhar acesso ao citoplasma das células no local da injeção. Assim, ocorre a transfecção nas células e tradução proteica, seguida da sua secreção ou processamento intracelular antigênico. Conseqüentemente, os antígenos podem ser apresentados via complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* – MHC) de classe I ou II (figura 3) (HOWARTH; ELLIOTT, 2004; KUTZLER; WEINER, 2008).

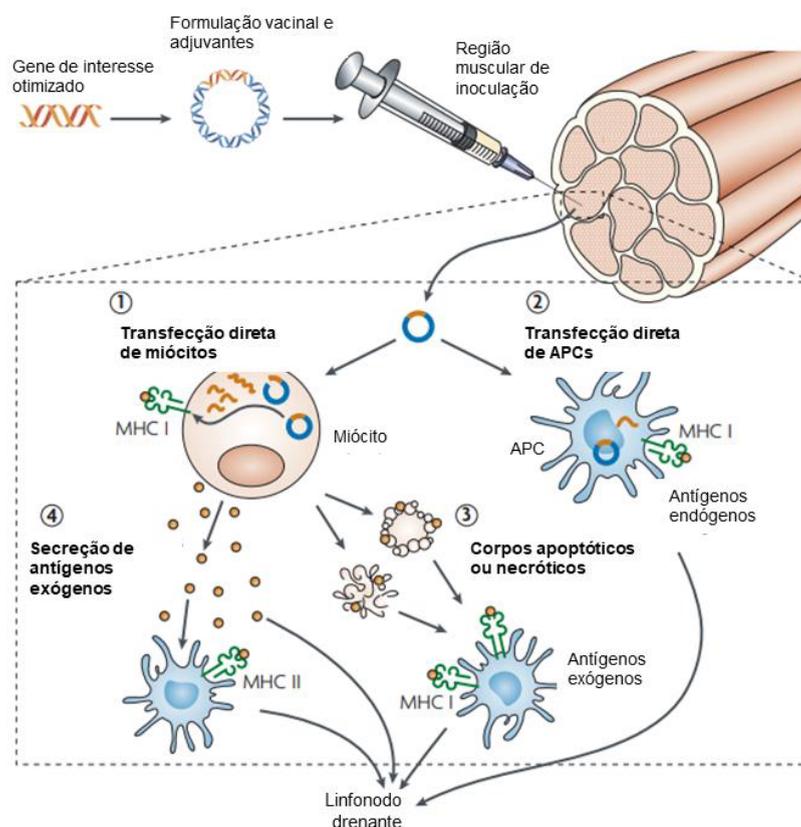


Figura 3. Mecanismos de ação das vacinas de DNA. A sequência gênica otimizada de interesse é inserida em um plasmídeo, purificada e depois entregue ao local de

inoculação. Utilizando a maquinaria celular do hospedeiro, o plasmídeo entra no núcleo das células somáticas (Ex: miócitos ou queratinócitos) (1) e células apresentadoras de antígeno (APCs) (2), onde se inicia a transcrição gênica, seguida da produção de proteínas no citoplasma e a consequente formação de antígenos (Ag) “estranhos” como proteínas ou cadeias de peptídeos. Os Ag endógenos derivados da vacina são apresentados por moléculas de MHC I, enquanto que Ag exógenos liberado de células apoptóticas (3) ou secretado para o meio extracelular (4) são capturados e processado pelas APCs e apresentado via MHC II. As APCs carregando o Ag vacinal migram para o linfonodo drenante onde ativam linfócitos T CD4+, T CD8+ e células B. O Ag secretado também pode ser reconhecido pelo receptor de célula B e apresentado ao T CD4+, conduzindo as respostas de anticorpos (Adaptado, (KUTZLER; WEINER, 2008).

A tecnologia de DNA recombinante permite manipulação molecular ampla no DNA do plasmídeo, que garante o redesenho rápido de antígenos para agentes patogênicos, como por exemplo, o vírus da influenza que exibe uma deriva antigênica constante (LI; PETROVSKY, 2016). As vacinas gênicas são fáceis de manipular e, portanto, de construção rápida, um atributo crítico para a fabricação de vacinas contra uma ameaça epidemiológica emergente. Como exemplo, pode-se citar a situação recente das vacinas desenvolvidas para SARS-CoV-2, sendo que as primeiras vacinas aprovadas / licenciadas, foram aquelas baseadas em material genético e vetores virais (WHO, 2021).

Soma-se a estas vantagens, o fato de que as vacinas de DNA não necessitam de transporte em cadeia fria ou logística complexa para armazenamento e administração, como ocorre com as vacinas gênicas de mRNA. Assim, despontam como estratégias de imunização do futuro por permitirem sua produção em grandes quantidades a um custo inferior (comparativamente às estratégias clássicas de produção de vacinas). Como também por permitirem mudanças em sua sequência vacinal capazes de influenciar qualitativamente e quantitativamente a sua eficácia (GURUNATHAN; KLINMAN; SEDER, 2000). Dentre tais mudanças, destacam-se a otimização do processamento e da apresentação antigênica (LIVINGSTON; NEWMAN; CRIMI; MCKINNEY *et al.*, 2001; VATAKIS; KOH; MCMILLAN, 2005), uso de sequências codificantes de proteínas fusionadas a epítomos de interesse (WOLKERS; TOEBES; OKABE; HAANEN *et al.*, 2002), diferentes métodos de entrega (*delivery*) (LI; PETROVSKY, 2016; LIU, 2011; SINGH; BRIONES; OTT; O'HAGAN, 2000) e introdução de adjuvantes moleculares/imunológicos (EGAN;

MEGATI; ROOPCHAND; GARCIA-HAND *et al.*, 2006; GURUNATHAN; KLINMAN; SEDER, 2000).

Outra vantagem das vacinas de DNA é a possibilidade de direcionar o antígeno recombinante expresso *in vivo* para diferentes compartimentos celulares, podendo tanto reter a proteína no interior da célula, quanto direcioná-la para a membrana ou secreção para o meio extracelular (HEGDE; BERNSTEIN, 2006). Desta forma, as vacinas de DNA possuem regiões de sequências líderes (também conhecidas como peptídeos sinais) que são usadas para direcionar diretamente o antígeno / epítipo codificado ao RE para apresentação via MHC ou para sua secreção no meio extracelular (RUSH; MITCHELL; GARSIDE, 2002). Portanto, a eficácia de vacinas de DNA pode variar a depender do patógeno alvo e da estratégia de construção adotada, a qual pode atuar na apresentação do antígeno ao sistema imunológico do hospedeiro e, conseqüentemente, influenciar a resposta vacinal induzida (HEGDE; BERNSTEIN, 2006).

1.4.1. Adjuvantes moleculares

Várias construções de vacinas de DNA com o intuito de potencializar a imunogenicidade foram documentadas, destacando-se o uso de adjuvantes moleculares que permitem a apresentação do antígeno endógeno pelas moléculas MHC-II, assim como a secreção de proteínas bem enoveladas. Dentre os quais, destacamos a proteína de associação à membrana lisossomal (*lysosomal associated membrane protein* – LAMP) e o peptídeo sinal de fator de plasminogênio tecidual (*tissue plasminogen activator signal peptide* – tPA-SP).

O uso do LAMP em modelos vacinais de DNA têm demonstrado alta imunogenicidade, devido a sua capacidade de atingir compartimentos endossômicos especializados, denominados MIIC (sítios de formação do complexo peptídeo:MHC-II) e promover, assim, o tráfego do antígeno para as moléculas de MHC-II, possibilitando o aumento da ativação de linfócitos T CD4+ (KLEIJMEER; OSSEVOORT; VAN VEEN; VAN HELLEMOND *et al.*, 1995; RUFF; GUARNIERI; STAVELEY-O'CARROLL; SILICIANO *et al.*, 1997). Vacinas

de DNA baseadas em LAMP têm sido descritas para DENV (LU; RAVIPRAKASH; LEAO; CHIKHLIKAR *et al.*, 2003), vírus do papiloma humano (CHEN; WANG; HUNG; PARDOLL *et al.*, 2000; WU; GUARNIERI; STAVELEY-O'CARROLL; VISCIDI *et al.*, 1995), vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MARQUES; CHIKHLIKAR; DE ARRUDA; LEAO *et al.*, 2003; ROWELL; RUFF; GUARNIERI; STAVELEY-O'CARROLL *et al.*, 1995; RUFF; GUARNIERI; STAVELEY-O'CARROLL; SILICIANO *et al.*, 1997) e YFV (MACIEL; CRUZ; CORDEIRO; DA MOTTA *et al.*, 2015). Em modelo para HIV, nosso grupo de pesquisa, demonstrou que a estratégia é imunogênica em camundongos gestantes e neonatos, inclusive quando administrada por via de mucosa (GOLDONI; MACIEL; RIGATO; PIUBELLI *et al.*, 2011; RIGATO; MACIEL; GOLDONI; PIUBELLI *et al.*, 2010; RIGATO; MACIEL; GOLDONI; PIUBELLI *et al.*, 2012). Além disso, essa estratégia também foi capaz de induzir precocemente a geração de células T auxiliares foliculares (*T follicular helper cells* – T_{FH}) e células B de centro germinativo (CG) com eficiente resposta humoral pela imunização neonatal (TEIXEIRA; OLIVEIRA; PIETROBON; SALLES *et al.*, 2022).

A sequência líder tPA-SP promove alto nível de expressão das proteínas codificadas pelo DNA vacinal e as direciona para a via de secreção celular, sendo capaz de induzir resposta humoral e celular intensa e sustentada (DELOGU; LI; REPIQUE; COLLINS *et al.*, 2002). A sequência tPA-SP tem sido amplamente utilizada em modelos de vacinas de DNA para DENV (COSTA; AZEVEDO; PAES; SARGES *et al.*, 2007; COSTA; PAES; BARRETO; PINHÃO *et al.*, 2006), influenza A (LUO; TAO; LI; ZHOU *et al.*, 2008), JEV (ASHOK; RANGARAJAN, 2002), tuberculose (KOU; XU; ZHAO; LIU *et al.*, 2017), HIV (WANG; SONG; LI; CHEN *et al.*, 2011) e ZIKV (LÓPEZ-CAMACHO; ABBINK; LAROCCA; DEJNIRATTISAI *et al.*, 2018).

Além das moléculas LAMP e tPA supracitadas, outros adjuvantes moleculares incluem a associação com moléculas imunoestimuladoras, citocinas, motivos CpG não metilados, ligantes de receptores semelhantes a Toll (*Toll like receptors* – TLR), entre outros (KUTZLER; WEINER, 2008; LIU, 2011).

1.4.2. Formulações adjuvantes sintéticas

Um adjuvante é essencialmente uma substância adicionada à vacina visando estimular e aumentar a magnitude e a durabilidade da resposta imunológica. Entre os diversos adjuvantes com segurança e eficácia comprovadas para uso em humanos, sais de alumínio (comumente conhecido como Alum), permanecem como o mais amplamente utilizado (PULENDRAN; SARUNACHALAM; O'HAGAN, 2021).

Estes sais, principalmente em forma de oxihidróxido ou hidroxifosfato de alumínio, atuam como um método de *delivery* do antígeno vacinal, por favorecer a formação de precipitados com sua deposição no local da injeção e a manutenção de uma concentração antigênica local elevada por um período de tempo. Assim, a adsorção dos antígenos ao Alum aumenta sua captação e apresentação pelas células apresentadoras de antígenos (*antigen presenting cells* – APCs), impulsionando a ativação da resposta imune (HOGENESCH, 2002; SHI; ZHU; XIA; LIANG *et al.*, 2019). Do ponto de vista imunológico, o Alum também estimula a ativação do inflamassoma NLRP3, resultando na produção de IL-1 β e IL-18, com consequente inflamação local e recrutamento de APCs (REINKE; THAKUR; GARTLAN; BEZBRADICA *et al.*, 2020). Além disso, quantidades substanciais de estudos demonstraram que os adjuvantes à base de sais de alumínio estimulam as respostas imunes de perfil Th2, com mínima ou nenhuma resposta Th1. Assim como o uso do Alum está associado a produção elevada de anticorpos (HOGENESCH, 2002; SOKOLOVSKA; HEM; HOGENESCH, 2007).

Uma outra formulação adjuvante bem estabelecida, segura e aprovada para uso em humanos é o MF59, que se baseia em uma emulsão de óleo em água, composto por gotículas do óleo esqualeno (componete orgânico e biocompatível), estabilizado em tampão aquoso (PULENDRAN; SARUNACHALAM; O'HAGAN, 2021). A administração intramuscular de MF59 ativa macrófagos e DCs, produzindo quimiocinas e estimulando o recrutamento de outras populações celulares para o local da injeção, intensificando o processo inflamatório local e drenagem dos antígenos para os linfonodos (O'HAGAN; OTT; DE GREGORIO; SEUBERT, 2012).

No contexto de infecções virais ou por patógenos intracelulares, o desenvolvimento de resposta vacinal do tipo Th1 é um objetivo a ser alçado. O uso de formulações ligantes de TLR são particularmente atrativos, entre eles o composto conhecido como MPLA (do inglês *monophosphoryl lipid A*), também aprovado para uso em humanos, atua como agonista de TLR 4 favorecendo o processo inflamatório e levando ao aumento da resposta vacinal Th1. Trata-se de um composto extraído de lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella minnesota*, quimicamente modificado para redução de toxicidade e assegurar segurança (CASELLA; MITCHELL, 2008). O MPLA é geralmente adicionado a outros aditivos de vacina que melhoram a entrega 'mecânica' do antígeno, sendo conhecido como “sistemas adjuvantes” (*adjuvant systems* – AS: AS01, AS02 e AS04). AS04 foi associado com o menor risco de eventos adversos e é uma formulação de MPLA e Alum (FACCIOLÀ; VISALLI; LAGANÀ; DI PIETRO, 2022; GARÇON; CHOMEZ; VAN MECHELEN, 2007).

Adicionalmente, outros ligantes de TLR tem demonstrado efeito adjuvante vacinal. Agonistas de TLR7/8 e TLR9 foram capazes de induzir fortemente resposta imune Th1 e elevar a produção de IFN tipo I, IL-12, TNF- α e IL-1 β . (FACCIOLÀ; VISALLI; LAGANÀ; DI PIETRO, 2022).

Nos últimos anos vários nanocarreadores surgiram como plataformas para entrega direcionada de antígenos e o desenvolvimento de biomateriais vem revolucionando os novos estudos de formulações adjuvantes.

1.5. Métodos de entrega de vacinas de DNA

Apesar dos avanços atuais no desenho de vacinas de mRNA e DNA, atingir imunogenicidade elevada e duradoura ainda permanece como um dos principais desafios. Isso porque, vacinas baseadas em ácidos nucleicos na sua forma “nua”, ou seja, livre de qualquer composto adicional à formulação que proporcione sua entrada na célula hospedeira, possuem limitações, como por exemplo: i) meia-vida curta devido à degradação por nucleases e remoção pelo sistema endotelial reticular e ii) as moléculas de DNA precisam superar e atravessar múltiplas barreiras celulares e subcelulares para garantir a expressão da proteína alvo (KUTZLER; WEINER, 2008; ZHANG; HONG; CHEN; WANG,

2017). Estes fatores podem resultar em carga antigênica insuficiente que é, em grande parte, devido à absorção limitada do material genético vacinal pelas células hospedeiras, especialmente pelas APCs. Para facilitar uma absorção eficiente, a via e o mecanismo de entrega do material genético são importantes e devem ser considerados para o processo de desenvolvimento vacinal.

Ácidos nucleicos por si só (nus) são incapazes de atravessar livremente a membrana celular por sofrer repulsões eletrostáticas em pH fisiológico, uma vez que compartilham da mesma carga elétrica negativa que a membrana plasmática. A fim de transpor estas limitações, diversas abordagens para entrega de material genético tem sido amplamente estudadas em modelos celulares *in vitro* e *in vivo*, as quais estão divididas em três grandes categorias: métodos físicos, biológicos e químicos (FUS-KUJAWA; PRUS; BAJDAK-RUSINEK; TEPER *et al.*, 2021).

Os sistemas físicos utilizam força mecânica para promover a entrada do ácido nucleico na célula. Em vacinas de DNA, destaca-se o método de eletroporação, que consiste na aplicação de pulsos elétricos no momento da injeção, os quais estimulam a permeabilidade da membrana celular e descritos por aumentar a resposta vacinal em modelos animais para diversas doenças infecciosas (SARDESAI; WEINER, 2011). Para ZIKV, esta abordagem também promoveu aumento da imunogenicidade em estudos pré clínicos (DOWD; KO; MORABITO; YANG *et al.*, 2016; LEE; LIM; LEE; KIM *et al.*, 2021; ZOU; XIE; LUO; SHAN *et al.*, 2018) e clínicos (TEBAS; ROBERTS; MUTHUMANI; REUSCHEL *et al.*, 2021).

Métodos biológicos para transfecção celular, estão entre os veículos mais utilizados na terapia genética e se baseiam no uso de vetores virais não patogênicos que carregam o material genético de interesse, tais como adenovírus, vírus adeno-associado e retrovírus. Adenovírus, por exemplo, são particularmente atrativos por induzir expressão antigênica robusta e imunogenicidade, explorado em vacinas candidatas para diversas doenças infecciosas (SAKURAI; TACHIBANA; MIZUGUCHI, 2022). No cenário atual da pandemia de COVID-19, as vacinas licenciadas produzidas pela *Janssen / Johnson & Johnson* e Universidade de Oxford / Astrazeneca, utilizaram adenovírus humano (subtipo 26 – Ad26) e adenovírus de chimpanzé (ChAdY25

– ChadOx-1), respectivamente (EMARY; GOLUBCHIK; ALEY; ARIANI *et al.*, 2021; SADOFF; GRAY; VANDEBOSCH; CÁRDENAS *et al.*, 2021). Estas mesmas estratégias também foram empregadas em modelo vacinal contra ZIKV (LÓPEZ-CAMACHO; ABBINK; LAROCCA; DEJNIRATTISAI *et al.*, 2018; SALISCH; STEPHENSON; WILLIAMS; COX *et al.*, 2021).

Uma vez que os vírus são sistemas biológicos evoluídos que naturalmente obtêm acesso eficiente às células hospedeiras, os vetores virais permitem que o cassete do gene terapêutico alvo seja substituído parcialmente no genoma viral. Apesar desses pontos fortes únicos, este sistema lida com problemas inerentes, como o tamanho limitado de ácidos nucleicos que podem ser empacotados e entregues, possível recombinação aleatória, citotoxicidade e imunogenicidade (SUNG; KIM, 2019; THOMAS; EHRHARDT; KAY, 2003). Adicionalmente, os custos elevados de produção em larga escala, controle de qualidade e necessidade de infraestrutura laboratorial associada a biossegurança, têm estimulado e direcionado pesquisas para sistemas de entrega não virais.

Os métodos químicos para transfecção celular são sistemas relativamente seguros, exibem propriedades físico-químicas facilmente ajustáveis e podem ser produzidos em larga escala (BONO; PONTI; MANTOVANI; CANDIANI, 2020). Esta abordagem é principalmente mediada por lipídeos ou polímeros catiônicos, os quais consistem em moléculas de carga positiva (catiônicos) e que interagem eletrostaticamente com resíduos de fosfato carregados negativamente (aniônicos) presentes em ácidos nucleicos (DNA e RNA) e membranas celulares. A combinação destes compostos leva à formação de complexos (lipoplexos ou poliplexos, quando no uso de lipídeos ou polímeros, respectivamente) contendo ácidos nucleicos condensados (figura 4). Permitindo assim, que superem a repulsão eletrostática da membrana celular e, tornando-os capazes de serem endocitados (CHEN; ZHAO; RUIZ; ZHANG, 2022; ZHI; BAI; YANG; CUI *et al.*, 2018).

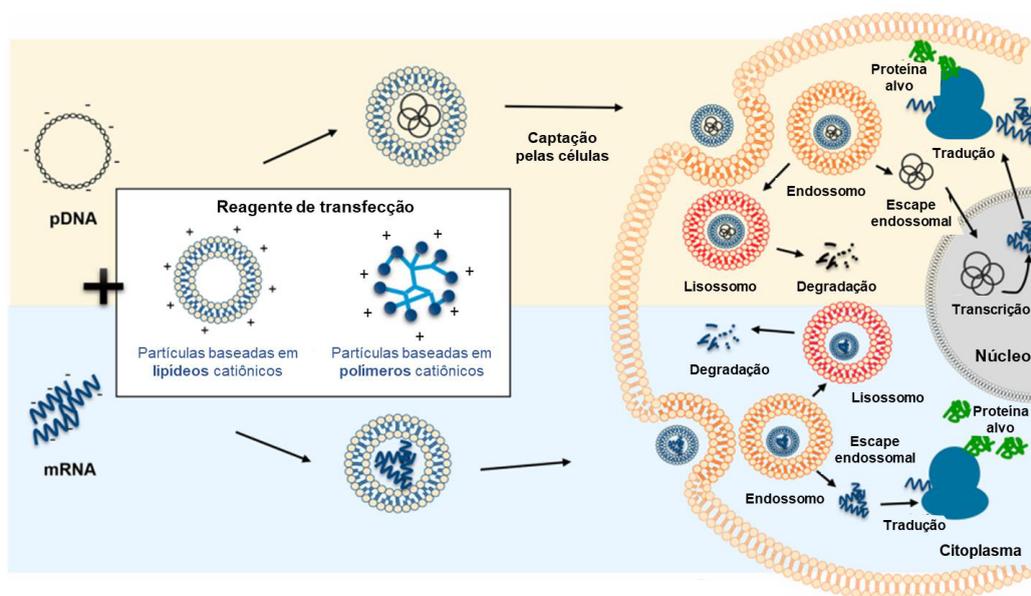


Figura 4. Mecanismo de transfecção celular mediado por sistemas catiônicos. Lipídeos e / ou polímeros de carga positiva (cátions) se ligam eletrostaticamente aos ácidos nucleicos de carga negativa (ânions) formando complexos estáveis positivos capazes de serem endocitados pelas células. Intracelularmente, este material genético é direcionado para as vias de síntese proteica para expressão da proteína alvo codificada. (Adaptado (MORADIAN; ROCH; LENDLEIN; GOSSEN, 2020).

As nanopartículas lipídicas (*lipids nanoparticles* – LNPs) são amplamente utilizadas em modelos de vacinas gênicas baseadas em mRNA. Neste processo o material genético é encapsulado em LNPs que permitem a regulação da meia-vida e imunogenicidade *in vivo* e aumentam a eficiência da entrega, captação e expressão nas células-alvo (HOU; ZAKS; LANGER; DONG, 2021; PARDI; HOGAN; PORTER; WEISSMAN, 2018). Vale ressaltar que este sistema corresponde às primeiras vacinas gênicas aprovadas para uso em humanos, direcionadas ao SARS-CoV-2 (ANDERSON; ROUPHAEL; WIDGE; JACKSON *et al.*, 2020; POLACK; THOMAS; KITCHIN; ABSALON *et al.*, 2020). No contexto de infecção pelo ZIKV, têm sido propostas várias formulações candidatas baseadas em mRNA carregado por LNPs (BOLLMAN; NUNNA; BAHL; HSIAO *et al.*, 2023; MEDINA-MAGÜES; GERGEN; JASNY; PETSCH *et al.*, 2021; PARDI; HOGAN; PELC; MURAMATSU *et al.*, 2017; RICHNER; JAGGER; SHAN; FONTES *et al.*, 2017).

Já os carreadores poliméricos oferecem vantagens semelhantes e emergem como tecnologias inovadoras. A diversidade elevada de moléculas e

capacidade de personalização das cadeias de polímeros aumentam suas eficiências terapêuticas. Contribuindo assim, para a liberação sustentada de ácidos nucleicos e direcionamento para tecidos ou células-alvos (TAKEMOTO; MIYATA; NISHIYAMA; KATAOKA, 2014). Essas vantagens são particularmente atraentes para o desenvolvimento de modelos vacinais de DNA.

Existe uma variedade de formulações poliméricas que podem ser usadas como sistema de entrega de ácidos nucleicos, como por exemplo microinjeções, hidrogeis, micelas, partículas de polímeros livres (lineares ou ramificadas) e nanopartículas (NPs) elaboradas com polímeros (CHEN; ZHAO; RUIZ; ZHANG, 2022). Neste sentido, escovas de polímero (tradução livre do inglês *polymer brushes*) são estruturas macromoleculares únicas com cadeias de polímeros densamente ligadas e têm demonstrado resultados satisfatórios em modelos *in vitro* (QU; LI; MA; CHEN *et al.*, 2019).

1.5.1. Nanopartículas de escovas de polímeros para entrega de ácidos nucleicos

As escovas de polímero, como o próprio nome sugere, são compostas por cadeias de polímeros que conectam sua extremidade a uma superfície, dando-lhes o aspecto de uma escova. Uma de suas principais propriedades é a chamada densidade de enxerto (tradução livre do inglês para *grafting density*), que corresponde ao número de cadeias de polímeros aderidas à superfície em uma determinada área (NERI-CRUZ; TEIXEIRA; GAUTROT, 2023). A densidade de enxerto controla o aspecto morfológico, mas principalmente assegura propriedades físico-químicas únicas que as tornam particularmente atraentes para diversas aplicações biomédicas, incluindo os complexos de ácidos nucleicos para absorção celular (NERI-CRUZ; TEIXEIRA; GAUTROT, 2023; QU; LI; MA; CHEN *et al.*, 2019).

As escovas de polímeros podem ser modificadas a fim de atribuir ganho de função (processo nomeado de funcionalização), alterando parâmetros como densidades de enxerto, configurações químicas, formas e espessura. Também permitem não apenas a adição de grupos químicos às suas cadeias, mas também a sua funcionalização com moléculas bioativas, como peptídeos,

proteínas e até mesmo anticorpos (NERI-CRUZ; TEIXEIRA; GAUTROT, 2023). Podem ser geradas *in situ* por uma variedade de técnicas de polimerização, incluindo a polimerização por radical de transferência de átomo (*atom transfer radical polymerization* – ATRP), que tem sido empregada devido à sua natureza versátil e robusta (tolerância ao oxigênio, ampla gama de monômeros polimerizáveis) (KRISHNAMOORTHY; HAKOBYAN; RAMSTEDT; GAUTROT, 2014; ZOPPE; ATAMAN; MOCNY; WANG *et al.*, 2017).

O uso de NPs como potenciais adjuvantes de vacinas tem sido amplamente explorado. Por exemplo, NPs de sílica têm aplicação biomédica e em sistemas de entrega de fármacos, por apresentar uma grande área de superfície, volume de poros e degradabilidade controlada, alta biossegurança *in vivo*, citocompatibilidade, biodistribuição e excreção (HU; WANG; ZHI; JIANG *et al.*, 2011; L; H; J; JE, 2021; LI; XU; WANG; GAUTROT, 2021). A associação de NPs de sílica funcionalizadas (recobertas) com escovas de polímero já demonstrou o controle da liberação dos polímeros e sua viabilidade em modelos de entrega de genes (L; H; J; JE, 2021). Assim, escovas de polímero podem regular a liberação de materiais genéticos após a entrada citosólica, permitindo, a expressão gênica por períodos prolongados e eficácia terapêutica sustentada (RAYNOLD; LI; D.; CHANG *et al.*, 2021).

Entre os diversos polímeros catiônicos propostos como candidatos para entrega de ácidos nucleicos, o polímero poli(dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA), têm sido particularmente atraente, devido às propriedades únicas de ligação à ácidos nucleicos. NPs de sílica funcionalizadas com escovas de PDMAEMA alcançaram eficiência elevada para a entrega de pequenos RNAs e DNAs. Assim como, demonstraram um desempenho excepcional para a entrega de pequenos RNAs, alcançando efeito *knockdown* eficiente, mesmo após uma única transfecção celular, seguida de cultura de longo prazo (LI; WU; QU; RIBADENEYRA *et al.*, 2019; RAYNOLD; LI; D.; CHANG *et al.*, 2021). A otimização da arquitetura, composição e tamanho das escovas de polímero são parâmetros importantes para promover interação eficiente com ácidos nucleicos e assegurar a transfecção celular (figura 5).

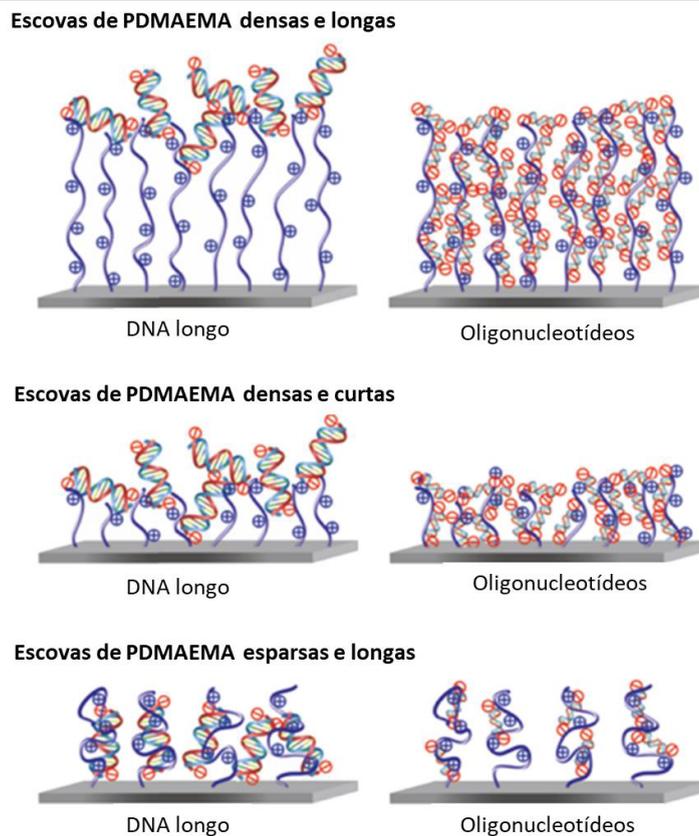


Figura 5. Interação entre escovas de polímeros e ácidos nucleicos de tamanhos distintos. Representação esquemática da interação entre oligonucleotídeos (RNAs de 10 a 22 pares de base - pb) ou DNAs longos (75 a 100 pb) e escovas de polímero de PDMAEMA com arquiteturas distintas (alta *versus* baixa densidade de enxerto; cadeias longas *versus* curtas). (Adaptado (QU; LI; MA; CHEN *et al.*, 2019).

1.6. Justificativa e hipótese do trabalho

Nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos de modelo experimental *in vivo* em camundongos para vacinas de DNA há mais de uma década, com foco em modelos de imunização materna e neonatal, assim como estudos de avaliação imunológica na interação materno-fetal. Diante do cenário de epidemia de ZIKV no início deste projeto, nós trabalhamos no desenvolvimento de uma vacina de DNA direcionada ao ZIKV em colaboração com os pesquisadores Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana e Dr. Roberto Dias Lins Neto (Instituto Aggeu Magalhães – IAM, Fiocruz Pernambuco), os quais possuem experiência em pesquisa de arboviroses, desenhos vacinais e produção de proteínas construídas computacionalmente.

A partir dos inúmeros estudos de vacinas de DNA candidatas contra ZIKV e outros flavivírus, disponíveis na literatura, foi possível identificar pontos para otimizar a fim de potencializar a resposta vacinal e favorecer o desenvolvimento de imunidade de longa duração.

As formulações vacinais aqui propostas foram submetidas à otimização através de várias abordagens para assegurar imunogenicidade adequada, incluindo: adição de adjuvantes moleculares, modulação na sequência das proteínas virais alvos e associação com sistemas de *delivery*.

Neste sentido, também trabalhamos em colaboração com o professor Julien Gautrot, da *Queen Mary University of London* – QMUL (Londres, Reino Unido) no desenvolvimento de NPs policatiônicas, baseadas em escovas de polímero, como sistema de entrega vacinal. O grupo de pesquisa do professor Gautrot tem sido pioneiro no uso de escovas poliméricas para *delivery* de ácidos nucleicos. Este projeto foi resultado do período de estágio no exterior contemplado na modalidade de Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BEPE / FAPESP nº2021/12476-6).

Assim, a hipótese desta tese foi que a otimização da formulação vacinal baseada em DNA, quanto ao desenho racional das sequências virais e vetores de expressão, somada a sistemas adjuvantes e de entrega poderiam potencializar a resposta vacinal a longo prazo, por induzir aumento da expressão dos antígenos vacinais e, conseqüentemente, títulos elevados de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV de longa duração.

Esta tese trará, portanto, os dados experimentais que suportam sua hipótese, incluindo os dados produzidos durante período de doutorado sanduíche.

2. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho nos permitem concluir que:

- A modulação das regiões de ancoramento da proteína do envelope, o direcionamento para via de secreção proteica e associação com adjuvantes para entrega do DNA vacinal, foram fatores chaves para assegurar imunogenicidade efetiva e duradoura, com resposta de longa duração em camundongos adultos.
- Nanocarreadores policatiônicos baseados em escovas poliméricas de PDMAEMA com cadeias longas e esparsas (baixa densidade de enxerto) foram capazes de formar complexos estáveis com pDNA e promover sua entrega intracelular e expressão proteica *in vitro*, sugerindo uma ferramenta inovadora para *delivery* de vacinas de DNA.
- O desenho racional e as diferentes estratégias de otimização da construção vacinal de DNA contra ZIKV, foram cruciais para o sucesso vacinal. Assim como, oferecem subsídios para o desenvolvimento de vacinas gênicas direcionadas a outros patógenos (exemplo: desenvolvimento de *delivery* para diferentes tipos vacinais).

REFERÊNCIAS

- ABBINK, P.; LAROCCA, R. A.; DE LA BARRERA, R. A.; BRICAULT, C. A. *et al.* Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science**, 353, n. 6304, p. 1129-1132, 09 2016.
- ALAM, A.; ALI, S.; AHAMAD, S.; MALIK, M. Z. *et al.* From ZikV genome to vaccine: in silico approach for the epitope-based peptide vaccine against Zika virus envelope glycoprotein. **Immunology**, 149, n. 4, p. 386-399, Dec 2016.
- ANDERSON, E. J.; ROUPHAEL, N. G.; WIDGE, A. T.; JACKSON, L. A. *et al.* Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. **N Engl J Med**, 383, n. 25, p. 2427-2438, Dec 17 2020.
- ASHOK, M. S.; RANGARAJAN, P. N. Protective efficacy of a plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein fused to tissue plasminogen activator signal sequences: studies in a murine intracerebral virus challenge model. **Vaccine**, 20, n. 11-12, p. 1563-1570, Feb 2002.
- BAYER, A.; LENNEMANN, N. J.; OUYANG, Y.; BRAMLEY, J. C. *et al.* Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**, 19, n. 5, p. 705-712, May 2016.
- BLACKMON, K.; EVANS, R.; FERNANDES, M.; LANDON, B. *et al.* Neurodevelopment in normocephalic children with and without prenatal Zika virus exposure. **Arch Dis Child**, 107, n. 3, p. 244-250, Mar 2022.
- BOLLMAN, B.; NUNNA, N.; BAHL, K.; HSIAO, C. J. *et al.* An optimized messenger RNA vaccine candidate protects non-human primates from Zika virus infection. **NPJ Vaccines**, 8, n. 1, p. 58, Apr 20 2023.
- BONO, N.; PONTI, F.; MANTOVANI, D.; CANDIANI, G. Non-Viral in Vitro Gene Delivery: It is Now Time to Set the Bar! **Pharmaceutics**, 12, n. 2, Feb 21 2020.
- BRAGA, C.; MARTELLI, C. M. T.; SOUZA, W. V.; LUNA, C. F. *et al.* Seroprevalence of Dengue, Chikungunya and Zika at the epicenter of the congenital microcephaly epidemic in Northeast Brazil: a population-based survey. **MedRxiv**, 2023.
- BRANCO, A. C. C. C.; DE OLIVEIRA, E. A.; PEREIRA, N. Z.; ALBERCA, R. W. *et al.* Obesity Induces an Impaired Placental Antiviral Immune Response in Pregnant Women Infected with Zika Virus. **Viruses**, 15, n. 2, Jan 23 2023.
- BUTANTAN. Butantan's dengue vaccine has 79.6% efficacy, partial results from 2-year follow-up show. <https://butantan.gov.br/noticias/butantan%27s-dengue-vaccine-has-79.6-efficacy-partial-results-from-2-year-follow-up-show>. Acesso em 29 de maio de 2023. 2023.

CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. **Cell Mol Life Sci**, 65, n. 20, p. 3231-3240, Oct 2008.

CHEN, C. H.; WANG, T. L.; HUNG, C. F.; PARDOLL, D. M. *et al.* Boosting with recombinant vaccinia increases HPV-16 E7-specific T cell precursor frequencies of HPV-16 E7-expressing DNA vaccines. **Vaccine**, 18, n. 19, p. 2015-2022, Apr 2000.

CHEN, G.; ZHAO, B.; RUIZ, E. F.; ZHANG, F. Advances in the polymeric delivery of nucleic acid vaccines. **Theranostics**, 12, n. 9, p. 4081-4109, 2022.

CHIMELLI, L.; AVVAD-PORTARI, E. Congenital Zika virus infection: a neuropathological review. **Childs Nerv Syst**, 34, n. 1, p. 95-99, 01 2018.

CHOUIN-CARNEIRO, T.; VEGA-RUA, A.; VAZEILLE, M.; YEBAKIMA, A. *et al.* Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 3, p. e0004543, Mar 2016.

COSTA, S. M.; AZEVEDO, A. S.; PAES, M. V.; SARGES, F. S. *et al.* DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. **Virology**, 358, n. 2, p. 413-423, Feb 2007.

COSTA, S. M.; PAES, M. V.; BARRETO, D. F.; PINHÃO, A. T. *et al.* Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. **Vaccine**, 24, n. 2, p. 195-205, Jan 2006.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; FREITAS, B. C. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, 534, n. 7606, p. 267-271, 06 2016.

DAI, L.; SONG, J.; LU, X.; DENG, Y. Q. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host Microbe**, 19, n. 5, p. 696-704, May 2016.

DE ARAÚJO, T. V. B.; RODRIGUES, L. C.; DE ALENCAR XIMENES, R. A.; DE BARROS MIRANDA-FILHO, D. *et al.* Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **Lancet Infect Dis**, 16, n. 12, p. 1356-1363, Dec 2016.

DE ARAÚJO, T. V. B.; XIMENES, R. A. A.; MIRANDA-FILHO, D. B.; SOUZA, W. V. *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **Lancet Infect Dis**, 18, n. 3, p. 328-336, Mar 2018.

DE NORONHA, L.; ZANLUCA, C.; BURGER, M.; SUZUKAWA, A. A. *et al.* Zika Virus Infection at Different Pregnancy Stages: Anatomopathological Findings,

Target Cells and Viral Persistence in Placental Tissues. **Front Microbiol**, 9, p. 2266, 2018.

DELOGU, G.; LI, A.; REPIQUE, C.; COLLINS, F. *et al.* DNA vaccine combinations expressing either tissue plasminogen activator signal sequence fusion proteins or ubiquitin-conjugated antigens induce sustained protective immunity in a mouse model of pulmonary tuberculosis. **Infect Immun**, 70, n. 1, p. 292-302, Jan 2002.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 46, n. 5, p. 509-520, Sep 1952.

DOWD, K. A.; KO, S. Y.; MORABITO, K. M.; YANG, E. S. *et al.* Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. **Science**, 354, n. 6309, p. 237-240, 10 2016.

DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, 360, n. 24, p. 2536-2543, Jun 2009.

EGAN, M. A.; MEGATI, S.; ROOPCHAND, V.; GARCIA-HAND, D. *et al.* Rational design of a plasmid DNA vaccine capable of eliciting cell-mediated immune responses to multiple HIV antigens in mice. **Vaccine**, 24, n. 21, p. 4510-4523, May 2006.

EMARY, K. R. W.; GOLUBCHIK, T.; ALEY, P. K.; ARIANI, C. V. *et al.* Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. **Lancet**, 397, n. 10282, p. 1351-1362, Apr 10 2021.

ESTCOURT, M. J.; MCMICHAEL, A. J.; HANKE, T. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. **Immunol Rev**, 199, p. 144-155, Jun 2004.

FACCIOLÀ, A.; VISALLI, G.; LAGANÀ, A.; DI PIETRO, A. An Overview of Vaccine Adjuvants: Current Evidence and Future Perspectives. **Vaccines (Basel)**, 10, n. 5, May 22 2022.

FAIÇAL, A. V.; DE OLIVEIRA, J. C.; OLIVEIRA, J. V. V.; DE ALMEIDA, B. L. *et al.* Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus. **BMJ Paediatr Open**, 3, n. 1, p. e000486, 2019.

FUS-KUJAWA, A.; PRUS, P.; BAJDAK-RUSINEK, K.; TEPER, P. *et al.* An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells. **Front Bioeng Biotechnol**, 9, p. 701031, 2021.

GARÇON, N.; CHOMEZ, P.; VAN MECHELEN, M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. **Expert Rev Vaccines**, 6, n. 5, p. 723-739, Oct 2007.

GAUDINSKI, M. R.; HOUSER, K. V.; MORABITO, K. M.; HU, Z. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. **Lancet**, 391, n. 10120, p. 552-562, 02 2018.

GIOVANNONI, F.; BOSCH, I.; POLONIO, C. M.; TORTI, M. F. *et al.* AHR is a Zika virus host factor and a candidate target for antiviral therapy. **Nat Neurosci**, 23, n. 8, p. 939-951, 08 2020.

GOLDONI, A. L.; MACIEL, M.; RIGATO, P. O.; PIUBELLI, O. *et al.* Mucosal and systemic anti-GAG immunity induced by neonatal immunization with HIV LAMP/gag DNA vaccine in mice. **Immunobiology**, 216, n. 4, p. 505-512, Apr 2011.

GRANT, A.; PONIA, S. S.; TRIPATHI, S.; BALASUBRAMANIAM, V. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host Microbe**, 19, n. 6, p. 882-890, Jun 2016.

GRISCHOTT, F.; PUHAN, M.; HATZ, C.; SCHLAGENHAUF, P. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. **Travel Med Infect Dis**, 14, n. 4, p. 313-330, 2016 Jul-Aug 2016.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D. M.; SEDER, R. A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. **Annu Rev Immunol**, 18, p. 927-974, 2000.

HADDOW, A. D.; SCHUH, A. J.; YASUDA, C. Y.; KASPER, M. R. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 2, p. e1477, 2012.

HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; EKCHARIYAWAT, P. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, 89, n. 17, p. 8880-8896, Sep 2015.

HASAN, S. S.; MILLER, A.; SAPPARAPU, G.; FERNANDEZ, E. *et al.* A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. **Nat Commun**, 8, p. 14722, Mar 2017.

HASAN, S. S.; SEVVANA, M.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nat Struct Mol Biol**, 25, n. 1, p. 13-20, 01 2018.

HEGDE, R. S.; BERNSTEIN, H. D. The surprising complexity of signal sequences. **Trends Biochem Sci**, 31, n. 10, p. 563-571, Oct 2006.

HOGENESCH, H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. **Vaccine**, 20 Suppl 3, p. S34-39, May 31 2002.

HOU, X.; ZAKS, T.; LANGER, R.; DONG, Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nat Rev Mater**, 6, n. 12, p. 1078-1094, 2021.

HOWARTH, M.; ELLIOTT, T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. **Immunol Rev**, 199, p. 27-39, Jun 2004.

HU, Y.; WANG, J.; ZHI, Z.; JIANG, T. *et al.* Facile synthesis of 3D cubic mesoporous silica microspheres with a controllable pore size and their application for improved delivery of a water-insoluble drug. **J Colloid Interface Sci**, 363, n. 1, p. 410-417, Nov 01 2011.

HUGHES, R. A.; HADDEN, R. D.; GREGSON, N. A.; SMITH, K. J. Pathogenesis of Guillain-Barré syndrome. **J Neuroimmunol**, 100, n. 1-2, p. 74-97, Dec 1999.

JAGGER, B. W.; DOWD, K. A.; CHEN, R. E.; DESAI, P. *et al.* Protective Efficacy of Nucleic Acid Vaccines Against Transmission of Zika Virus During Pregnancy in Mice. **J Infect Dis**, 220, n. 10, p. 1577-1588, 10 2019.

KLEIJMEER, M. J.; OSSEVOORT, M. A.; VAN VEEN, C. J.; VAN HELLEMOND, J. J. *et al.* MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. **J Immunol**, 154, n. 11, p. 5715-5724, Jun 1995.

KOU, Y.; XU, Y.; ZHAO, Z.; LIU, J. *et al.* Tissue plasminogen activator (tPA) signal sequence enhances immunogenicity of MVA-based vaccine against tuberculosis. **Immunol Lett**, 190, p. 51-57, 10 2017.

KRISHNAMOORTHY, M.; HAKOBYAN, S.; RAMSTEDT, M.; GAUTROT, J. E. Surface-initiated polymer brushes in the biomedical field: applications in membrane science, biosensing, cell culture, regenerative medicine and antibacterial coatings. **Chem Rev**, 114, n. 21, p. 10976-11026, Nov 12 2014.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch Virol**, 152, n. 4, p. 687-696, 2007.

KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nat Rev Genet**, 9, n. 10, p. 776-788, Oct 2008.

L, C.; H, Y.; J, C.; JE, G. Cationic polymer brush-coated bioglass nanoparticles for the design of bioresorbable RNA delivery vectors. **European Polymer Journal**, 156, 2021.

LAROCCA, R. A.; ABBINK, P.; PERON, J. P.; ZANOTTO, P. M. *et al.* Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, 536, n. 7617, p. 474-478, 08 2016.

LAROCCA, R. A.; MENDES, E. A.; ABBINK, P.; PETERSON, R. L. *et al.* Adenovirus Vector-Based Vaccines Confer Maternal-Fetal Protection against

Zika Virus Challenge in Pregnant IFN- α β R. **Cell Host Microbe**, 26, n. 5, p. 591-600.e594, 11 2019.

LEBOV, J. F.; ARIAS, J. F.; BALMASEDA, A.; BRITT, W. *et al.* International prospective observational cohort study of Zika in infants and pregnancy (ZIP study): study protocol. **BMC Pregnancy Childbirth**, 19, n. 1, p. 282, Aug 2019.

LEE, Y. H.; LIM, H.; LEE, J. A.; KIM, S. H. *et al.* Optimization of Zika DNA vaccine by delivery systems. **Virology**, 559, p. 10-14, Jul 2021.

LI, C.; XU, D.; YE, Q.; HONG, S. *et al.* Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, 19, n. 5, p. 672, Nov 2016.

LI, D.; WU, L.; QU, F.; RIBADENEYRA, M. C. *et al.* Core-independent approach for polymer brush-functionalised nanomaterials with a fluorescent tag for RNA delivery. **Chem Commun (Camb)**, 55, n. 94, p. 14166-14169, Dec 07 2019.

LI, D.; XU, L.; WANG, J.; GAUTROT, J. E. Responsive Polymer Brush Design and Emerging Applications for Nanotheranostics. **Adv Healthc Mater**, 10, n. 5, p. e2000953, 03 2021.

LI, L.; PETROVSKY, N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. **Expert Rev Vaccines**, 15, n. 3, p. 313-329, 2016.

LIU, M. A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. **Immunol Rev**, 239, n. 1, p. 62-84, Jan 2011.

LIVINGSTON, B. D.; NEWMAN, M.; CRIMI, C.; MCKINNEY, D. *et al.* Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines. **Vaccine**, 19, n. 32, p. 4652-4660, Sep 2001.

LOPES MOREIRA, M. E.; NIELSEN-SAINES, K.; BRASIL, P.; KERIN, T. *et al.* Neurodevelopment in Infants Exposed to Zika Virus In Utero. **N Engl J Med**, 379, n. 24, p. 2377-2379, Dec 13 2018.

LU, Y.; RAVIPRAKASH, K.; LEAO, I. C.; CHIKHLIKAR, P. R. *et al.* Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, 21, n. 17-18, p. 2178-2189, May 2003.

LUO, M.; TAO, P.; LI, J.; ZHOU, S. *et al.* Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice. **J Virol Methods**, 154, n. 1-2, p. 121-127, Dec 2008.

LÓPEZ-CAMACHO, C.; ABBINK, P.; LAROCCA, R. A.; DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 2441, 06 2018.

MACIEL, M.; CRUZ, F. A. S.; CORDEIRO, M. T.; DA MOTTA, M. A. *et al.* A DNA vaccine against yellow fever virus: development and evaluation. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, n. 4, p. e0003693, Apr 2015.

MARBÁN-CASTRO, E.; VAZQUEZ GUILLAMET, L. J.; PANTOJA, P. E.; CASELLAS, A. *et al.* Neurodevelopment in Normocephalic Children Exposed to Zika Virus in Utero with No Observable Defects at Birth: A Systematic Review with Meta-Analysis. **Int J Environ Res Public Health**, 19, n. 12, Jun 14 2022.

MARQUES, E. T.; CHIKHLIKAR, P.; DE ARRUDA, L. B.; LEAO, I. C. *et al.* HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. **J Biol Chem**, 278, n. 39, p. 37926-37936, Sep 2003.

MARQUES, V. M.; SANTOS, C. S.; SANTIAGO, I. G.; MARQUES, S. M. *et al.* Neurological Complications of Congenital Zika Virus Infection. **Pediatr Neurol**, 91, p. 3-10, Feb 2019.

MARTINS, M. M.; ALVES DA CUNHA, A. J. L.; ROBAINA, J. R.; RAYMUNDO, C. E. *et al.* Fetal, neonatal, and infant outcomes associated with maternal Zika virus infection during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, 16, n. 2, p. e0246643, 2021.

MEDIN, C. L.; ROTHMAN, A. L. Zika Virus: The Agent and Its Biology, With Relevance to Pathology. **Arch Pathol Lab Med**, 141, n. 1, p. 33-42, Jan 2017.

MEDINA-MAGÜES, L. G.; GERGEN, J.; JASNY, E.; PETSCH, B. *et al.* mRNA Vaccine Protects against Zika Virus. **Vaccines (Basel)**, 9, n. 12, Dec 10 2021.

MINER, J. J.; CAO, B.; GOVERO, J.; SMITH, A. M. *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, 165, n. 5, p. 1081-1091, May 2016.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host Microbe**, 21, n. 2, p. 134-142, Feb 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. 2023a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Pernambuco registrou mais de 6,2 mil casos prováveis de dengue este ano. <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias-para-os-estados/pernambuco/2023/maio/pernambuco-registrou-mais-de-6-2-mil-casos-provaveis-de-dengue-este-ano>>. Acesso em 7 de junho de 2023. 2023b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022. 2023c.

MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; POPOVIĆ, M. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, 374, n. 10, p. 951-958, Mar 2016.

MOORE, C. A.; STAPLES, J. E.; DOBYNS, W. B.; PESSOA, A. *et al.* Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA Pediatr**, 171, n. 3, p. 288-295, Mar 2017.

MOORE, D. L.; CAUSEY, O. R.; CAREY, D. E.; REDDY, S. *et al.* Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. **Ann Trop Med Parasitol**, 69, n. 1, p. 49-64, Mar 1975.

MORADIAN, H.; ROCH, T.; LENDLEIN, A.; GOSSEN, M. mRNA Transfection-Induced Activation of Primary Human Monocytes and Macrophages: Dependence on Carrier System and Nucleotide Modification. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 4181, Mar 06 2020.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clin Microbiol Rev**, 29, n. 3, p. 487-524, Jul 2016.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect**, 20, n. 10, p. O595-596, Oct 2014.

NERI-CRUZ, C. E.; TEIXEIRA, F. M. E.; GAUTROT, J. E. A guide to functionalisation and bioconjugation strategies to surface-initiated polymer brushes. **Chem Commun (Camb)**, May 17 2023.

NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annu Rev Immunol**, 36, p. 279-308, 04 2018.

O'HAGAN, D. T.; OTT, G. S.; DE GREGORIO, E.; SEUBERT, A. The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. **Vaccine**, 30, n. 29, p. 4341-4348, Jun 19 2012.

OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; LEPARC-GOFFART, I. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**, 19, n. 9, Mar 2014.

OLSON, J. G.; KSIAZEK, T. G.; SUHANDIMAN; TRIWIBOWO. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 75, n. 3, p. 389-393, 1981.

PAHO/WHO. Pan American Health Organization/World Health Organization. Zika-epidemiological report Brazil. March 2017. Washington, DC. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&id=35221&Itemid=270 (=en (Acesso em 8 de maio, 2018). 2017.

PAHO/WHO. Pan American Health Organization. Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas: cumulative cases,

2015–2018. Washington, DC. Jan 4, 2018. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=43296(=en (Acesso em 8 de maio, 2018). 2018.

PARDI, N.; HOGAN, M. J.; PELC, R. S.; MURAMATSU, H. *et al.* Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. **Nature**, 543, n. 7644, p. 248-251, 03 2017.

PARDI, N.; HOGAN, M. J.; PORTER, F. W.; WEISSMAN, D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. **Nat Rev Drug Discov**, 17, n. 4, p. 261-279, Apr 2018.

PATTNAIK, A.; SAHOO, B. R.; PATTNAIK, A. K. Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. **Vaccines (Basel)**, 8, n. 2, May 2020.

PAZ-BAILEY, G.; ROSENBERG, E. S.; DOYLE, K.; MUNOZ-JORDAN, J. *et al.* Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Final Report. **N Engl J Med**, 379, n. 13, p. 1234-1243, Sep 2018.

PINGEN, M.; BRYDEN, S. R.; PONDEVILLE, E.; SCHNETTLER, E. *et al.* Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, 44, n. 6, p. 1455-1469, 06 2016.

POLACK, F. P.; THOMAS, S. J.; KITCHIN, N.; ABSALON, J. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **N Engl J Med**, 383, n. 27, p. 2603-2615, Dec 31 2020.

POLAND, G. A.; KENNEDY, R. B.; OVSYANNIKOVA, I. G.; PALACIOS, R. *et al.* Development of vaccines against Zika virus. **Lancet Infect Dis**, Jan 2018.

POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; KENNEDY, R. B. Zika Vaccine Development: Current Status. **Mayo Clin Proc**, 94, n. 12, p. 2572-2586, 12 2019.

PRATA-BARBOSA, A.; MARTINS, M. M.; GUASTAVINO, A. B.; CUNHA, A. J. L. A. Effects of Zika infection on growth. **J Pediatr (Rio J)**, 95 Suppl 1, p. 30-41, 2019 Mar - Apr 2019.

PULENDRAN, B.; S ARUNACHALAM, P.; O'HAGAN, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. **Nat Rev Drug Discov**, 20, n. 6, p. 454-475, Jun 2021.

QU, F.; LI, D.; MA, X.; CHEN, F. *et al.* A Kinetic Model of Oligonucleotide-Brush Interactions for the Rational Design of Gene Delivery Vectors. **Biomacromolecules**, 20, n. 6, p. 2218-2229, 06 10 2019.

RAJCÁNI, J.; MOSKO, T.; REZUCHOVÁ, I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? **Rev Med Virol**, 15, n. 5, p. 303-325, 2005 Sep-Oct 2005.

RANA, J.; SLON CAMPOS, J. L.; LECCESE, G.; FRANCOLINI, M. *et al.* Role of Capsid Anchor in the Morphogenesis of Zika Virus. **J Virol**, 92, n. 22, 11 2018.

RAYNOLD, A. A. M.; LI, D.; CHANG, L. *et al.* Competitive Binding and Molecular Crowding Regulate the Cytoplasmic Interactome of Non-Viral Polymeric Gene Delivery Vectors. **Nature Communications**, 2021.

REINKE, S.; THAKUR, A.; GARTLAN, C.; BEZBRADICA, J. S. *et al.* Inflammasome-Mediated Immunogenicity of Clinical and Experimental Vaccine Adjuvants. **Vaccines (Basel)**, 8, n. 3, Sep 22 2020.

RICHNER, J. M.; JAGGER, B. W.; SHAN, C.; FONTES, C. R. *et al.* Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. **Cell**, 170, n. 2, p. 273-283.e212, Jul 2017.

RIGATO, P. O.; MACIEL, M.; GOLDONI, A. L.; PIUBELLI, O. *et al.* Immunization of neonatal mice with LAMP/p55 HIV gag DNA elicits robust immune responses that last to adulthood. **Virology**, 406, n. 1, p. 37-47, Oct 2010.

RIGATO, P. O.; MACIEL, M.; GOLDONI, A. L.; PIUBELLI, O. G. *et al.* Maternal LAMP/p55gagHIV-1 DNA immunization induces in utero priming and a long-lasting immune response in vaccinated neonates. **PLoS One**, 7, n. 2, p. e31608, 2012.

ROWELL, J. F.; RUFF, A. L.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. *et al.* Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. **J Immunol**, 155, n. 4, p. 1818-1828, Aug 1995.

RUFF, A. L.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K.; SILICIANO, R. F. *et al.* The enhanced immune response to the HIV gp160/LAMP chimeric gene product targeted to the lysosome membrane protein trafficking pathway. **J Biol Chem**, 272, n. 13, p. 8671-8678, Mar 1997.

RUSH, C.; MITCHELL, T.; GARSIDE, P. Efficient priming of CD4+ and CD8+ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways. **J Immunol**, 169, n. 9, p. 4951-4960, Nov 2002.

SADOFF, J.; GRAY, G.; VANDEBOSCH, A.; CÁRDENAS, V. *et al.* Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. **N Engl J Med**, 384, n. 23, p. 2187-2201, Jun 10 2021.

SAKURAI, F.; TACHIBANA, M.; MIZUGUCHI, H. Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases. **Drug Metab Pharmacokinet**, 42, p. 100432, Feb 2022.

SALISCH, N. C.; STEPHENSON, K. E.; WILLIAMS, K.; COX, F. *et al.* A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase 1 Study of Ad26.ZIKV.001, an Ad26-Vectored Anti-Zika Virus Vaccine. **Ann Intern Med**, 174, n. 5, p. 585-594, May 2021.

SAPPARAPU, G.; FERNANDEZ, E.; KOSE, N.; BIN CAO *et al.* Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. **Nature**, 540, n. 7633, p. 443-447, 12 2016.

SARDESAI, N. Y.; WEINER, D. B. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. **Curr Opin Immunol**, 23, n. 3, p. 421-429, Jun 2011.

SHAN, C.; MURUATO, A. E.; JAGGER, B. W.; RICHNER, J. *et al.* A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. **Nat Commun**, 8, n. 1, p. 676, 09 2017.

SHI, S.; ZHU, H.; XIA, X.; LIANG, Z. *et al.* Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. **Vaccine**, 37, n. 24, p. 3167-3178, May 27 2019.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends Biochem Sci**, 42, n. 6, p. 443-456, 06 2017.

SIMPSON, D. I. Zika virus infection in man. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 58, p. 335-338, Jul 1964.

SINGH, M.; BRIONES, M.; OTT, G.; O'HAGAN, D. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 2, p. 811-816, Jan 2000.

SOKOLOVSKA, A.; HEM, S. L.; HOGENESCH, H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. **Vaccine**, 25, n. 23, p. 4575-4585, Jun 06 2007.

SUNG, Y. K.; KIM, S. W. Recent advances in the development of gene delivery systems. **Biomater Res**, 23, p. 8, 2019.

TAI, W.; HE, L.; WANG, Y.; SUN, S. *et al.* Critical neutralizing fragment of Zika virus EDIII elicits cross-neutralization and protection against divergent Zika viruses. **Emerg Microbes Infect**, 7, n. 1, p. 7, Jan 2018.

TAKEMOTO, H.; MIYATA, K.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Bioresponsive polymer-based nucleic acid carriers. **Adv Genet**, 88, p. 289-323, 2014.

TANG, H.; HAMMACK, C.; OGDEN, S. C.; WEN, Z. *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, 18, n. 5, p. 587-590, 05 2016.

TEBAS, P.; ROBERTS, C. C.; MUTHUMANI, K.; REUSCHEL, E. L. *et al.* Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. **N Engl J Med**, 385, n. 12, p. e35, Sep 16 2021.

TEIXEIRA, F. M. E.; OLIVEIRA, L. M.; PIETROBON, A. J.; SALLES, É. *et al.* LAMP-1 Chimeric to HIV-1 p55Gag in the Immunization of Neonate Mice Induces an Early Germinal Center Formation and AID Expression. **Vaccines (Basel)**, 10, n. 8, Aug 03 2022.

TEIXEIRA, F. M. E.; PIETROBON, A. J.; OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, L. M. D. S. *et al.* Maternal-Fetal Interplay in Zika Virus Infection and Adverse Perinatal Outcomes. **Front Immunol**, 11, p. 175, 2020.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. A. C.; DE OLIVEIRA, W. K.; NUNES, M. L. *et al.* The Epidemic of Zika Virus-Related Microcephaly in Brazil: Detection, Control, Etiology, and Future Scenarios. **Am J Public Health**, 106, n. 4, p. 601-605, Apr 2016.

THOMAS, C. E.; EHRHARDT, A.; KAY, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nat Rev Genet**, 4, n. 5, p. 346-358, May 2003.

TRIPATHI, S.; BALASUBRAMANIAM, V. R.; BROWN, J. A.; MENA, I. *et al.* A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLoS Pathog**, 13, n. 3, p. e1006258, 03 2017.

VAN DEN POL, A. N.; MAO, G.; YANG, Y.; ORNAGHI, S. *et al.* Zika Virus Targeting in the Developing Brain. **J Neurosci**, 37, n. 8, p. 2161-2175, Feb 2017.

VAN ROMPAY, K. K. A.; KEESLER, R. I.; ARDESHIR, A.; WATANABE, J. *et al.* DNA vaccination before conception protects Zika virus-exposed pregnant macaques against prolonged viremia and improves fetal outcomes. **Sci Transl Med**, 11, n. 523, 12 2019.

VATAKIS, D. N.; KOH, Y. T.; MCMILLAN, M. CD4+ T cell epitope affinity to MHC II influences the magnitude of CTL responses elicited by DNA epitope vaccines. **Vaccine**, 23, n. 20, p. 2639-2646, Apr 2005.

VESNAVER, T. V.; TUL, N.; MEHRABI, S.; PARISSONE, F. *et al.* Zika virus associated microcephaly/micrencephaly-fetal brain imaging in comparison with neuropathology. **BJOG**, 124, n. 3, p. 521-525, Feb 2017.

WANG, J. Y.; SONG, W. T.; LI, Y.; CHEN, W. J. *et al.* Improved expression of secretory and trimeric proteins in mammalian cells via the introduction of a new trimer motif and a mutant of the tPA signal sequence. **Appl Microbiol Biotechnol**, 91, n. 3, p. 731-740, Aug 2011.

WHO. World Health Organization (2017) Zika Virus Microcephaly and Guillain-Barre Syndrome. Geneva, Switzerland. 2017.

WHO. World Health Organization. Zika: the continuing threat. 97: 6-7 p. 2019.

WHO. World Health Organization. WHO vaccine pipeline tracker. https://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/. 2020.

WHO. World Health Organization. COVID-19 vaccine tracker and landscape. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>. 2021.

WHO. World Health Organization. Zika epidemiology update - February 2022. 2022.

WHO. World Health Organization. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts <<https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>>. Acesso em 11 de maio de 2023. 2023.

WILLIAMS, J. A. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. **Vaccines (Basel)**, 1, n. 3, p. 225-249, Jun 2013.

WOLKERS, M. C.; TOEBES, M.; OKABE, M.; HAANEN, J. B. *et al.* Optimizing the efficacy of epitope-directed DNA vaccination. **J Immunol**, 168, n. 10, p. 4998-5004, May 2002.

WONG, P. S.; LI, M. Z.; CHONG, C. S.; NG, L. C. *et al.* Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. **PLoS Negl Trop Dis**, 7, n. 8, p. e2348, 2013.

WU, T. C.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; VISCIDI, R. P. *et al.* Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 25, p. 11671-11675, Dec 1995.

XIMENES, R. A. A.; MIRANDA-FILHO, D. B.; MONTARROYOS, U. R.; MARTELLI, C. M. T. *et al.* Zika-related adverse outcomes in a cohort of pregnant women with rash in Pernambuco, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, 15, n. 3, p. e0009216, 03 2021.

YOCKEY, L. J.; VARELA, L.; RAKIB, T.; KHOURY-HANOLD, W. *et al.* Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. **Cell**, 166, n. 5, p. 1247-1256.e1244, Aug 2016.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C.; MOSIMANN, A. L.; SANTOS, G. I. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 110, n. 4, p. 569-572, Jun 2015.

ZHANG, M.; HONG, Y.; CHEN, W.; WANG, C. Polymers for DNA Vaccine Delivery. **ACS Biomater Sci Eng**, 3, n. 2, p. 108-125, Feb 13 2017.

ZHANG, X.; JIA, R.; SHEN, H.; WANG, M. *et al.* Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. **Viruses**, 9, n. 11, 11 2017.

ZHI, D.; BAI, Y.; YANG, J.; CUI, S. *et al.* A review on cationic lipids with different linkers for gene delivery. **Adv Colloid Interface Sci**, 253, p. 117-140, Mar 2018.

ZHU, X.; LI, C.; AFRIDI, S. K.; ZU, S. *et al.* E90 subunit vaccine protects mice from Zika virus infection and microcephaly. **Acta Neuropathol Commun**, 6, n. 1, p. 77, 08 2018.

ZOPPE, J. O.; ATAMAN, N. C.; MOCNY, P.; WANG, J. *et al.* Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: State-of-the-Art, Opportunities, and Challenges in Surface and Interface Engineering with Polymer Brushes. **Chem Rev**, 117, n. 3, p. 1105-1318, Feb 08 2017.

ZOU, J.; XIE, X.; LUO, H.; SHAN, C. *et al.* A single-dose plasmid-launched live-attenuated Zika vaccine induces protective immunity. **EBioMedicine**, 36, p. 92-102, Oct 2018.