

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GABRIEL AUGUSTO PIRES DE SOUZA

AVALIAÇÃO DE PLATAFORMAS VACINAIS EXPERIMENTAIS CONTRA O *Zika virus* UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA

Alfenas/MG
2018

GABRIEL AUGUSTO PIRES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE PLATAFORMAS VACINAIS EXPERIMENTAIS CONTRA O *Zika*
virus UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA**

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

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Alfenas/MG
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Souza, Gabriel Augusto Pires de
S729a Avaliação de plataformas vacinais experimentais contra o Zika virus
utilizando nanopartículas de albumina sérica bovina / Gabriel Augusto Pires
de Souza -- Alfenas/MG, 2018.
59 f. : il. --

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Virus da Dengue. 2. Albumina Sérica. 3. Vacinas. 4. Nanopartículas.
I. Coelho, Luiz Felipe Leomil. II. Título.

CDD- 616.91852



GABRIEL AUGUSTO PIRES DE SOUZA

“AVALIAÇÃO DE PLATAFORMAS VACINAIS EXPERIMENTAIS CONTRA O *Zika virus*
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 25 de janeiro de 2019.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Luiz Felipe L. Coelho

Dr. Rafael Kroon Campos
Instituição: UTMB

Assinatura: Rafael Kroon Campos

Prof. Dr. Ivo Santana Caldas
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Ivo Santana Caldas

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, mãe, pai e irmão por toda a confiança, pelos valores que me foram ensinados, bem como pelo apoio imensurável para continuar a buscar pelos meus objetivos.

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

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pela sua paciência e dedicação, assim como pelos ensinamentos e conselhos. E o mais importante: por ser um exemplo de competência e profissionalismo. Muito obrigado por toda a confiança depositada em mim.

À Prof. Dra. Betânia Paiva Drumond (UFMG), por nos ceder à cepa do vírus e à linhagem de células Vero, bem como por ter nos presenteado com alguns suprimentos para biologia molecular. Agradecimentos também a sua aluna, Lívia Sacchetto Pengo, por toda ajuda na produção e titulação do vírus e à ambas, por estarem sempre disponíveis quando surgia alguma dúvida em relação ao protocolo.

À Prof. Dra. Livia Maria Rosatto Moda (UNIFAL-MG), por nos ceder a faloidina e por todo o auxílio durante a aquisição das imagens de microscopia confocal. E a diversos outros bons professores pelos quais passei ao longo da pós-graduação, seja ao longo das disciplinas, utilizando seus laboratórios ou em conversas que enriqueceram o trabalho. Muito obrigado.

À Dra. Alessandra da Silva Orfanó (FioCruz – MG), pelo processamento das amostras e aquisição das imagens para a microscopia eletrônica de varredura, mostrando-se muitíssimo atenciosa e gentil.

A todos os meus colegas do Laboratório de Vacinas: Ezequiel Salvador, Gabriela Vizotto, Fernanda Roza, Igor Godinho, Pedro Henrique Cruvinel, Renato Fróes e Stella Souza por estarem sempre à disposição para ajudar, seja nos finais de semana ou nos feriados. Muito obrigado por terem se dedicado tanto ao sucesso desse trabalho, em um trabalho de equipe surpreendente e inigualável. Muitíssimo obrigado por tudo isso e também pelas brincadeiras e risos, vocês fazem com que

eu me lembro que estar ao lado de pessoas grandiosas, faz você sentir que também pode ser grandioso. Um agradecimento também àqueles que passaram pelo laboratório e deixaram seus legados minuciosamente anotados em seus cadernos-ata e que me auxiliaram muito quando surgiam dúvidas, em especial, à Raíssa Prado e à Natália Ingrid.

Aos técnicos, auxiliares e funcionários da UNIFAL-MG, que colocaram sua ajuda à disposição nos momentos necessários. Em especial à auxiliar de limpeza Valdenise, por todo o carinho, por estar sempre à disposição para ajudar, por toda a vidraria lavada e pelas deliciosas trufas que me salvavam quando eu precisava de um docinho no meu dia.

E por fim, agradecimentos também à FAPEMIG e ao CNPq, como órgãos de fomento à pesquisa, bem como à CAPES, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV) é considerado um *Flavivirus* emergente e foi associado a epidemias em ilhas na região do Oceano Pacífico e em vários países das Américas. Paralelamente, manifestações graves como a microcefalia e síndrome de Guillain-Barré tiveram a sua incidência aumentada durante estes surtos e contribuíram para o estabelecimento de um estado de emergência pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A partir de então, o desenvolvimento de uma vacina eficaz para prevenir infecções causadas pelo ZIKV tornou-se uma prioridade, uma vez que não há vacinas para o ZIKV em estágios avançados de desenvolvimento, o que, fortalece a necessidade de testar plataformas alternativas. Estudos preliminares do nosso grupo mostraram que as nanopartículas de albumina sérica bovina são sistemas promissores de vacinas para antígenos microbianos. Portanto, devido à falta de vacinas disponíveis para o ZIKV e aos resultados anteriormente obtidos pelo nosso grupo, este estudo teve como objetivo caracterizar e avaliar a capacidade de nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA-NPs) associadas ao vírus inativado em induzir a produção de anticorpos específicos contra o ZIKV. Ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar a citotoxicidade da formulação e também para avaliar a taxa de interiorização de nanopartículas por célula permissiva ao ZIKV. Finalmente, os animais foram imunizados com as nanopartículas contendo ZIKV inativado encapsulado (NPZ) ou uma mistura composta de BSA-NPs e ZIKV (NP+ZIKV). Anticorpos IgG anti-ZIKV produzidos foram mensurados no soro dos animais imunizados por ELISA. Os resultados indicam que a plataforma nanométrica NPZ possui morfologia esférica irregular de 226.1 ± 3.4 nm de diâmetro e -15.9 ± 1.0 mV de carga superficial. A detecção de genoma de viral em NPZ indica a presença do encapsulamento do ZIKV nas nanopartículas, com porcentagem de eficiência média de encapsulamento de 96%. Ensaios *in vitro* mostram que as nanopartículas foram interiorizadas pelas células VERO, sem qualquer citotoxicidade significativa. Camundongos imunizados com NPZ não demonstraram produção significativa de anticorpos IgG totais específicos, enquanto o grupo de animais imunizados com NP+ZIKV mostraram uma produção significativa de IgG total e IgG1 anti-ZIKV em relação aos animais imunizados apenas com o ZIKV inativado. Os dados evidenciam o potencial adjuvante das BSA-NPs na elaboração de uma vacina eficaz contra o ZIKV. Futuros estudos deverão ser conduzidos para determinar se os anticorpos produzidos possuem ação neutralizante e se estes anticorpos são capazes de proteger animais susceptíveis da infecção pelo ZIKV.

Palavras-chave: *Zika virus*. Albumina sérica bovina. Vacinas. nanopartículas.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an emerging Flavivirus that has caused epidemic outbreaks in islands in the Pacific region and several countries of the Americas. In parallel, severe manifestations such as microcephaly and Guillain-Barré syndrome have increased in incidence during the ZIKV outbreak. This scenario contributed to the establishment of a state of emergency by the World Health Organization (WHO). Therefore, finding an effective vaccine to prevent ZIKV infections is a priority, since there are no vaccines for ZIKV in advanced stages of development. This strengthens the need to test alternative vaccine platforms to prevent ZIKV infections. Preliminary studies from our group have been showed that bovine serum albumin nanoparticles are promising systems for delivery microbial antigens. Therefore, due to the lack of available vaccines for ZIKV and results previously obtained by our group, this study aims to evaluate if bovine serum albumin nanoparticles (BSA-NPs) associated to inactivated ZIKV are able to induce the production of specific antibodies against the virus. In vitro assays were performed to evaluate the cytotoxicity of the formulation and also to evaluate the uptake rate of nanoparticles by permissive cells. Finally, mice were immunized with the nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ) or immunized with BSA-NPs mixed with inactivated ZIKV (NP+ZIKV). Anti-ZIKV IgG antibodies were measured in the blood of immunized animals by ELISA. The results indicate that NPZ nanometer platform has 226.1 ± 3.4 nm in diameter and -15.9 ± 1.0 mV of surface charge. Electron Scanning Microscopy indicates that this nanoparticle has an irregular spherical morphology. Detection of the viral genome in nanoparticles suggests the presence of ZIKV in the formulation and a high percentage of encapsulation efficiency (96%). The nanoparticles are uptaken by VERO cells, without any significant cytotoxicity. Mice immunized with nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ) did not show substantial output of total IgG antibodies against ZIKV. In contrast, mice immunized with inactivated ZIKV mixed with BSA nanoparticles (NP+ZIKV) showed a significant production of anti-ZIKV antibodies (Total IgG and IgG1). The data strengths the adjuvant potential of BSA-NPs in the elaboration of an effective vaccine against ZIKV. However, Future studies should be performed to determine whether the produced antibodies have neutralizing action and if these antibodies can protect susceptible animals to ZIKV infection

Keywords: *Zika virus*. bovine serum albumin, vaccines. nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Immunization schedule	34
Figura 2	- Thermal inactivation of ZIKV	36
Figura 3	- Scanning electron microscopy of NPZ	38
Figura 4	- Thermal stability test of ZIKV conjugated nanoparticles (NPZ).....	39
Figura 5	- Detection of ZIKV genome in NPZ	40
Figura 6	- Cell Viability Assay of nanoparticles	41
Figura 7	- Nanoparticle uptake in Vero cells determined by flow cytometry assay	42
Figura 8	- Confocal microscopy showing NPZ uptake by Vero cells at 1 and 24 hours.	43
Figura 9	- Figure 9: Antibody production in mice immunized with Nanoparticles	44
Figura 10	- Antibody production in mice immunized with Nanoparticles after infection	44

LISTA DE ABREVIATURAS

μL -	Microlitros
AmB -	Anfotericina B
BCA -	Ácido Bicinconínico
BSA -	Albumina sérica bovina
BSA-NPs -	Nanopartículas de BSA
cDNA -	DNA complementar
DAPI -	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC -	Células Dendríticas
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs -	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DLS -	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM -	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DENV -	Dengue virus
EE% -	Porcentagem de eficiência de encapsulamento
ELISA -	Ensaio de imunoadsorção enzimática
ENP(s) -	Nanopartícula(s) vazia(s)
FBS -	Soro Fetal Bovino
g -	Gramas
G -	Gravidade
IFNAR1 -	Cadeia alfa do receptor interferon alfa/beta
IgG -	Imunoglobulina G
kDa -	Quilodaltons
L -	Litros
Min -	Minutos
MFI -	Média da Intensidade de Fluorescência
mg -	Miligrama
mL -	Mililitros
mm -	Milímetros
MOI -	Multiplicidade de infecção
MTT -	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

mV -	Milivolts
MW -	Marcador de peso molecular
N.I -	Não infectado
N.C -	Controle Negativo
Nm -	Nanômetros
NP(s) -	Nanopartícula(s)
NPZ -	Nanopartícula de BSA associada ao ZIKV inativado
O.D -	Densidade óptica
P/E -	Penicilina e Estreptomicina
P.C -	Controle Positivo
PBS -	Tampão fosfato-salino
pH -	Potencial hidrogeniônico
PFU -	Unidades formadoras de placa
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
qPCR -	PCR em tempo real
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
rpm -	Rotações por minuto
RNA -	Ácido ribonucleico
RT -	Transcriptase reversa
WHO -	Organização Mundial da Saúde
WNV -	West Nile virus
WT -	Tipo selvagem
YFV -	Yellow Fever virus
ZIKV -	Zika virus
ZIKV_IN -	Zika virus inativado termicamente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	<i>Zika virus</i>	11
1.1.1	Histórico e epidemiologia	12
1.1.2	Transmissão	13
1.1.3	Patogênese e ciclo de multiplicação	14
1.1.4	Manifestações clínicas	16
1.1.5	Diagnóstico, tratamento e prevenção	17
1.2	NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA	20
1	INTRODUCTION	25
2	MATERIALS AND METHODS	28
2.1	PRODUCTION, TITRATION AND INACTIVATION OF <i>Zika virus</i>	28
2.2	PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BSA NANOPARTICLES:	29
2.2.1	Preparation and physical-chemical characterization of NPs	29
2.2.2	Scanning Electron Microscopy (SEM)	29
2.2.3	Thermal stability of NPZ	30
2.3	DETECTION OF THE VIRAL GENOME IN NPZ	30
2.3.1	Detection of the viral genome in the NPZ enzymatic degradation product	30
2.3.2	Quantification of ZIKV in the supernatant of NPZ by Real-time PCR (qPCR)	31
3	IN VITRO ANALYSIS	31
3.1	CELL VIABILITY ASSAY	31
3.2	NANOPARTICLE UPTAKE ASSAYS	32
3.2.1	Flow cytometry	32
3.2.2	Confocal microscopy analyzes	32
4	IN VIVO ANALYSIS:	33
4.1	Immunization protocol and ELISA assay for quantification of total IgG	33
5	RESULTS	35
5.1	THERMAL INACTIVATION OF ZIKV:	35
5.2	CHARACTERIZATION OF NPs	35
5.3	IN VITRO ANALYSES	39
5.4	IN VIVO ANALYSES	42
6	DISCUSSION	44

REFERENCES.....	50
ANEXO	56

1 INTRODUÇÃO

O *Zika virus* (ZIKV), embora tenha sido isolado pela primeira vez em 1947 só ganhou destaque recentemente, quando a arbovirose passou a ser considerada uma preocupação pelas autoridades de saúde mundial ao ser associada a desordens neuroimunológicas (WEAVER et al., 2016; YUN; LEE, 2017). Esse vírus pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, no qual estão inclusos também o *Dengue virus* (DENV), o *West Nile virus* (WNV) e *Yellow Fever virus* (YFV). Assim como os demais membros desse gênero, o ZIKV é um vírus envelopado e com genoma de RNA simples fita senso positiva (SHI; GAO, 2017).

1.1 *Zika virus*

O genoma viral do ZIKV tem, aproximadamente, 11 kilobases (Kb) sendo que a extremidade 5' do genoma possui um *Cap* de nucleotídeos metilados envolvidos no início da tradução do RNA viral. Já a extremidade 3' não é poliadenilada, mas forma uma estrutura de loop importante para a estrutura secundária específica do RNA e essencial para a replicação e tradução do genoma (MOGHADAM et al., 2016). O RNA viral codifica uma poliproteína que será posteriormente processada, tanto por proteínas virais quanto do hospedeiro, para dar origem à três proteínas estruturais – proteína do Capsídeo - C, proteína de Membrana - M e proteína do Envelope - E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (MOGHADAM et al., 2016; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

A proteína C formam o capsídeo protéico que tem formato icosaédrico e envolve o material genético. O capsídeo está envolvido por uma membrana lipídica, na qual estão inseridas as outras duas proteínas estruturais, a proteína E e a proteína M (SHI; GAO, 2017).

1.1.1 Histórico e epidemiologia

O *Zika virus* recebeu este nome, pois foi isolado do sangue de um macaco *Rhesus* febril em Abril de 1947 na Floresta de Zika, em Uganda, durante programas de vigilância da febre amarela e de identificação de novos agentes virais. No ano seguinte, em Janeiro de 1948, ZIKV foi isolado de mosquitos *Aedes africanus*, indicando que poderia se tratar de uma arbovirose (MOGHADAM et al., 2016). O primeiro isolamento a partir de humanos aconteceu em 1968, na Nigéria (ZHANG et al., 2016).

A partir de então se deu início a uma série de estudos sorológicos a respeito do ZIKV. Tais estudos revelaram uma distribuição geográfica ampla da infecção humana pelo vírus, mas confinada à linha do equador, se estendendo da África para a Ásia: República Centro-Africana, Egito, Gabão, Quênia, Nigéria, Senegal, Serra Leoa, Tanzânia, Uganda, Índia, Indonésia, Malásia, Paquistão, Filipinas, Tailândia e Vietnã (SONG et al., 2017; YUN; LEE, 2017).

Somente sessenta anos depois, em abril de 2007, foi registrado o primeiro surto de ZIKV fora do eixo África-Ásia. Ele ocorreu na Ilha de Yap, na Micronésia, Oceania. O surto estava associado a sintomas como febre, erupção cutânea, artralgia e conjuntivite, mas estudos sorológicos posteriores ao surto indicaram que cerca de 70% da população da ilha havia sido exposta recentemente ao ZIKV, sendo que apenas uma a cada cinco pessoas infectadas apresentaram sintomas, sem que complicações sérias fossem observadas (SONG et al., 2017; WEAVER et al., 2016; YUN; LEE, 2017; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

Após esse surto em Yap, foram registrados apenas alguns casos isolados e esporádicos de nativos ou viajantes infectados com ZIKV em países endêmicos no Sudeste Asiático (YUN; LEE, 2017). Até que em Outubro de 2013, um outro grande surto foi registrado no Pacífico, mais especificamente na Polinésia Francesa, onde *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são encontrados em muitas regiões. Estima-se que cerca de 28 mil pessoas foram afetadas pelo vírus nesse ano, representando aproximadamente 11% da população das ilhas da Polinésia Francesa (WEAVER et al., 2016). E, diferentemente dos surtos anteriores de ZIKV, observou-se um aumento de 20 vezes na incidência da síndrome de Guillain-Barré pela primeira vez durante esse surto (SONG et al., 2017; YUN; LEE, 2017).

No início de 2015, casos de Zika passam a serem confirmados em países da América Latina, como Brasil, Colômbia, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Paraguai, Suriname e Venezuela, e no final desse mesmo ano eram entre 44.0000 e 1.300.000 casos de suspeita de infecção por ZIKV em 14 dos 26 estados brasileiros (PETERSEN et al., 2016; YUN; LEE, 2017).

Um estudo recente trouxe evidências de que o ZIKV não veio diretamente da Polinésia Francesa para o Brasil, como se suspeitava anteriormente. A hipótese era da introdução do ZIKV no território nacional durante a Copa do mundo de 2014 ou em um evento de canoagem mundial que ocorreu em agosto do mesmo ano no Rio de Janeiro. Acredita-se que antes disso, o vírus migrou pela Oceania, depois para a Ilha de Páscoa - de onde foi levada para a América Central e Caribe. A entrada no Brasil foi no final de 2013, trazido por imigrantes ilegais vindos do Haiti e soldados brasileiros envolvidos em missões de paz no país caribenho (CAMPOS et al., 2018).

Foi no nordeste brasileiro que se observou, inicialmente, um aumento significativo nos casos de recém-nascidos com microcefalia e outras complicações que passaram a ser relatadas pelo Ministério da Saúde do Brasil, coincidentemente ao período do surto do ZIKV nessa região. Apenas em 2015, mais de 3.000 casos suspeitos, inclusive casos fatais, foram reportados, representando um aumento de mais de 20 vezes, se comparados aos anos anteriores. Mais tarde, autoridades da Polinésia Francesa também relataram um aumento nos casos de más formações de fetos e recém-nascidos durante os anos de 2014 e 2015 (CHAN et al., 2016).

1.1.2 Transmissão

Assim como ocorre com o DENV, o principal vetor de transmissão conhecido do ZIKV é o *Aedes aegypti*, assim como o *A. albopictus*. Estes mosquitos hematófagos são normalmente ativos durante o período diurno e estão amplamente distribuídos nas zonas tropicais e subtropicais do globo, sendo que o habitat do o *A. albopictus* pode se estender até as zonas temperadas (SONG et al., 2017). Contudo, muitos outros mosquitos do gênero *Aedes* são considerados vetores em potencial: *A. furcifer*, *A. vittatus*, *A. dalzieli*, *A. metallicus*, *A. hirsutus*, *A. unilinaetus*, *A. africanus*, *A. taylori*, *A. hensillican* e *A. luteocephalus*. Além dos mosquitos do gênero *Aedes*, o ZIKV já foi isolado ou detectado ocasionalmente de espécies de

mosquitos de outros gêneros, tais como: *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus*, e *Mansonia uniformis* (ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

A transmissão por esses vetores pode ocorrer dentro dois ciclos distintos: o ciclo selvagem e o urbano. O primeiro garante a manutenção do ZIKV entre primatas não humanos e mosquitos arbóreos nas florestas e que esporadicamente pode ser transmitido a de um primata não humano para humano. Já o ciclo urbano é caracterizado pela transmissão aos humanos por mosquitos vetores presentes nas cidades (SONG et al., 2017). Evidências recentes, sustentadas pela detecção do ZIKV por qPCR em macacos mortos nos estados de Minas Gerais e São Paulo, inicialmente coletados para investigações a respeito da Febre Amarela, sugerem que o ZIKV pode ter estabelecido um ciclo silvestre no Brasil (TERZIAN et al., 2018).

Formas de transmissão não vetoriais também têm sido relatadas para esse vírus, tem sido sugerido que a transmissão direta de humanos para humanos possa ocorrer de forma perinatal, sexual e através da amamentação ou por transfusão sanguínea. A transmissão sexual do ZIKV é suplementada pela detecção do vírus no sêmen do paciente, muitas vezes em altos títulos e transmissão do vírus entre ambos os sexos. O ZIKV também já foi detectado em urina, saliva e esfregaço nasofaríngeo, indicando potencialmente a facilidade da transmissão não-vetorial (SONG et al., 2017)

1.1.3 Patogênese e ciclo de multiplicação

O vírus é adquirido pelo mosquito durante o repasto sanguíneo, e, após a multiplicação do vírus no corpo do artrópode, ele atinge a glândula salivar deste. Desta forma, é possível que o ZIKV seja inoculado em um novo hospedeiro durante o próximo período de alimentação. A pele humana passa a ser então o primeiro local de replicação vira. Os fibroblastos dérmicos primários, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas demonstraram ser permissivos para a infecção e replicação do ZIKV (BARZON et al., 2016; HAMEL et al., 2015; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

Da pele, o vírus alcança o linfonodo drenante, onde é amplificado, resultando em viremia e disseminação hematogênica em tecidos periféricos e órgãos viscerais. Em seres humanos, o RNA de ZIKV é detectável em sangue tipicamente nos primeiros 10 dias após a infecção (BARZON et al., 2016; SHUAIB et al., 2016).

Acredita-se que o ZIKV entra na célula usando receptores de adesão, tais como a lectina DC-SIGN e muitos membros da família de receptores de fosfatidilserina (HAMEL et al., 2015; YUN; LEE, 2017). Esta etapa de adesão provavelmente precede uma interação específica da glicoproteína viral E com um receptor celular para obter acesso ao interior da célula através da rápida endocitose mediada por clatrina (YUN; LEE, 2017).

Após a endocitose pela célula permissiva, ocorre a formação dos endossomos, nos quais o baixo pH provoca alterações na conformação da glicoproteína E e desencadeia a fusão da membrana viral à membrana endossomal, liberando o RNA viral no citoplasma da célula hospedeira. O RNA viral direciona para a síntese da poliproteína em associação ao Retículo Endoplasmático (RE), que será posteriormente clivada por proteases tanto celulares quanto virais para gerar, em quantidades equimolares, as proteínas estruturais e não estruturais do vírus (YUN; LEE, 2017).

As proteínas não estruturais estão diretamente ou indiretamente envolvidas na replicação do RNA viral, que ocorre em compartimentos de membrana do RE induzidos pelo ZIKV. Uma ou outra ainda podem estar envolvidas na montagem do vírus ou ainda na evasão da imunidade inata (YUN; LEE, 2017).

Na montagem do vírus, duas glicoproteínas, a prM e a E, formam um heterodímero na membrana do RE e conduzem a ligação das proteínas C e do RNA no lúmen do RE, produzindo assim vírions imaturos que são caracterizados por 90 heterodímeros prM-E que sobressaem a membrana viral como 60 picos triméricos. As partículas virais passam então pela via secretora, na qual furinas ou proteases tipo furina residente em trans-Golgi clivam a prM em proteína M, uma etapa essencial para a maturação do vírus, pois gera grandes arranjos conformacionais, garantindo aos vírions maduros uma superfície lisa contendo homodímeros anti-paralelos de proteína E e proteínas M embebidos no envelope lipídico. Por fim, os vírions maduros ou parcialmente maduros, são transportados até a superfície da célula onde serão liberados por exocitose (BARZON et al., 2016; YUN; LEE, 2017).

1.1.4 Manifestações clínicas

Mesmo que o ZIKV tenha ganhado destaque recentemente pelas suas manifestações mais graves, como a Síndrome de Guillain–Barré e os casos de más formações em recém-nascidos, especialmente a microcefalia, a Zika, de forma geral, tem uma grande porcentagem de casos assintomáticos. Acredita-se que 80% dos casos de infecções pelo ZIKV sejam assintomáticas, mas quando se manifestam, os sintomas costumam aparecer após um período de incubação que varia de 2 a 14 dias após a inoculação do vírus no hospedeiro pela picada de mosquitos infectados (MOGHADAM et al., 2016; PETERSEN et al., 2016).

Os autores têm classificado a infecção por ZIKV em Febre do ZIKA e Infecção Congênita (CHAN et al., 2016). A Febre do Zika tem um amplo espectro de sintomas, variando de formas assintomáticas para uma doença febril autolimitada com sintomas similares à dengue, como: febre baixa (37.8-38.5 °C), conjuntivite bilateral, erupção cutânea maculopapular, dor de cabeça, dor retro-orbital e artrite/artralgia com edema das pequenas articulações das mãos e dos pés, mialgia, vertigem e astenia (CHAN et al., 2016; MOGHADAM et al., 2016).

Na infecção congênita a manifestação clínica mais comum é a microcefalia, uma condição neurológica em que o cérebro de um bebê não se desenvolve adequadamente, fazendo com que a cabeça seja menor do que o normal. Mas outras más formações podem ser observadas em recém-nascidos e fetos infectados, como baixo peso ao nascimento, anasarca, pele desnecessária no couro cabeludo, polihidrâmnio e artrogripose (MOGHADAM et al., 2016; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

Também são relatadas complicações neurológicas que abrangem síndromes polimediatárias, lesões cerebrais, disfunção do tronco encefálico e ausência de deglutição. E deficiências oftalmológicas como catarata, calcificações intraoculares, tamanhos de olho assimétricos, hipoplasia do nervo óptico, atrofia macular, coloboma da íris e subluxação dalente (CHAN et al., 2016; MOGHADAM et al., 2016).

Complicações decorrentes da infecção por ZIKV têm sido relatadas, como desordens neuroimunológicas tal qual a Síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune em que o sistema imunológico ataca parte do sistema nervoso periférico,

causando formigamento, fraqueza muscular, paralisia e até mesmo a morte (SONG et al., 2017).

1.1.5 Diagnóstico, tratamento e prevenção

O diagnóstico definitivo da infecção por ZIKV necessita de confirmação laboratorial, uma vez que não existem manifestações clínicas, bioquímicas ou radiológicas que possam distinguir de forma confiável a febre do ZIKV de infecções causadas por outros arbovírus. Da mesma forma a infecção congênita não pode ser distinguida de outras causas infecciosas, tóxicas ou genéticas das anomalias (CHAN et al., 2016).

Contudo, os testes para detecção de ZIKV embora estejam em estado de desenvolvimento ainda não estão disponíveis e, por isso, o isolamento bem-sucedido de ZIKV em cultura é considerado o padrão-ouro do diagnóstico laboratorial de infecções virais, mas isso depende principalmente do tempo de coleta de amostras e da presença de cargas virais nos espécimes. O ZIKV tem sido isolado em células Vero e C6/36 inoculadas com amostras de soro, urina e/ou sêmen de pacientes infectados (CHAN et al., 2016; PETERSEN et al., 2016; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

A detecção molecular do vírus é feita por RT-qPCR, mas sofre com limitações da cinética da viremia. As amostras de sangue devem ser coletadas menos de uma semana após o início dos sintomas para aumentar a chance de detecção do ZIKV durante o período virêmico. Uma vez que o vírus ZIKV é excretado por mais tempo na urina, essas amostras podem ser testadas de forma útil até três semanas após o início. A RT-PCR também pode ser realizada no fluido amniótico, ainda que os valores preditivos positivos e negativos para infecção fetal ou desenvolvimento de patologia fetal sejam incertos (PETERSEN et al., 2016).

A IgM pode ser detectada por teste imunoenzimático já no início dos sintomas e pode durar mais de 2 meses, mas a detecção de anticorpos anti-ZIKV sofre com problemas de reações cruzadas com outros *flavivirus* (CHAN et al., 2016).

Quanto ao tratamento, assim como para os demais *flavivirus*, não existe qualquer terapia clinicamente aprovada para o tratamento específico para infecções por ZIKV (SHAN et al., 2016). Recomenda-se, portanto, uma série de cuidados de suporte que incluem principalmente repouso e ingestão de líquidos para prevenção

de desidratação, antipiréticos e analgésicos. A observação de coagulopatia ou falência multiorgânica são metas importantes dos cuidados ao paciente. Anti-histamínicos podem ser considerados para sintomas cutâneos. Os líquidos intravenosos, o oxigênio (conforme necessário) e o monitoramento dos sinais vitais são outras medidas de cuidados (SHUAIB et al., 2016).

Assim como não existem tratamentos aprovados e específicos contra o ZIKV, também não existem até o momento, vacinas disponíveis para a prevenção da doença (SILVA et al., 2018). Desse modo, a estratégia adotada é o controle do vetor, embora as estratégias de erradicação do *A. aegypti* tenham se mostrado ineficientes e o índice de infestação do mosquito na América seja consideravelmente alto (ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016). Outras medidas de prevenção recomendadas são o uso de repelente, ar condicionado, telas de janela/porta e remoção de detritos domésticos e recipientes de água, que fornecem locais de reprodução de mosquitos (SHUAIB et al., 2016).

Uma vez que não existem tratamentos específicos ou formas de prevenção eficientes contra ZIKV, o desenvolvimento de uma vacina que seja segura e eficaz é uma alta prioridade (CULSHAW.; MONGKOLSAPAYA; SCRETON, 2018). Vacinas efetivas foram aprovadas para outros *Flavivírus* intimamente relacionados ao ZIKV, mas a busca por candidatos vacinais para o ZIKV só foi iniciada com os surtos recentes, em que o vírus foi relacionado a desordens neuroimunológicas graves em adultos e recém-nascidos. Já foram descritas vacinas baseadas em DNA plasmidial, mRNA, vírus inativados e purificados, vírus quiméricos e atenuados, subunidade de proteína e de vetores virais. (PARDI et al., 2017; SHAN et al., 2016).

De qualquer forma, cada uma das abordagens vacinais possui suas vantagens e desvantagens. Por exemplo, uma vacina de subunidade poderia ser mais segura e ter um menor tempo de desenvolvimento antes do início do teste clínico se comparado a uma vacina de vírus atenuada. No entanto, a vacina da subunidade provavelmente exigiria várias doses para a indução imunidade protetoras. Enquanto uma vacina de vírus atenuada pode exigir apenas uma dose e provocar uma resposta imune mais rápida e robusta, levando a uma melhor proteção de longa duração (SHAN et al., 2016). Espera-se de uma vacina ideal que, além de segura, induza imunidade protetora após uma única imunização, independentemente do histórico sorológico anterior (PARDI et al., 2017).

Como as plataformas vacinais de DNA têm um excelente perfil de segurança e podem ser fabricadas rapidamente, elas foram uma das primeiras a serem empregadas por grupos de pesquisa nos setores público e privado. Duas vacinas baseadas em DNA que expressam as proteínas PrM e E de ZIKV estão em fase de teste em voluntários saudáveis. Os estudos pré-clínicos demonstraram que as vacinas preventivas e terapêuticas induziram altos títulos de anticorpos neutralizantes e os animais foram completamente protegidos contra os desafios com ZIKV (KIM et al., 2016)

Um novo candidato vacinal foi proposto por um grupo de pesquisa na Universidade da Pensilvânia, utilizando um RNA mensageiro (mRNA) que codifica as proteínas ZIKV prM e E encapsulado em nanopartículas lipídicas. Com uma dose única a vacina gerou uma resposta potente e durável de anticorpos neutralizantes em ratos e macacos Rhesus, além de proteger esses animais quando desafiados com o ZIKV. A eficácia protetora desta vacina de mRNA também foi confirmada por um grupo independente de pesquisa mostrando resultados promissores para futuros ensaios humanos (PARDI et al., 2017)

Uma vacina (ZPIV) de vírus inativado e purificado está sendo desenvolvida pelo *Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR)* e já se encontra em ensaios clínicos de fase 1, usando um isolado porto-riquenho (cepa: PRVABC59) propagado em células Vero, purificado e inativado por formalina (POLAND et al., 2018). Anteriormente, a administração de uma dose do ZIKV inativado e purificado junto de adjuvante foi suficiente para prevenir a viremia em camundongos BALB/c após o desafio com ZIKV quando administrado por via intramuscular, mas não pela via subcutânea (KIM et al., 2016).

Algumas outras vacinas têm alcançado as fases iniciais dos ensaios clínicos, como as vacinas desenvolvidas pelo *National Institutes of Health (USA)*, quem têm vacinas baseadas em DNA (VRC5288) na fase 1 e outras duas em estágios iniciais de pesquisa e desenvolvimento, baseadas no Vírus da estomatite vesicular vivo recombinante e no ZIKV vivo e atenuado (POLAND et al., 2018; RICHNER et al., 2018).

No Brasil, o Instituto Butantan tem uma vacina em fase 1 dos ensaios clínicos, baseada em um vetor de *Dengue virus* expressando proteínas precursoras de membrana e envelope. E outra em estudos iniciais, baseados em ZIKV purificado e inativado (POLAND et al., 2018).

Além disso, existem outras vacinas em fase 1 que utilizam plataformas de vírus inativados e purificados: A VLA1601, desenvolvida pela *ValNeva Emergent BioSolutions* e a TAK-426, sob responsabilidade da Takeda em parceria com a *Biomedical Advanced Research & Development Authority (BARDA)* (RICHNER et al., 2018).

Atualmente, uma das principais necessidades da vacinologia gira em torno do desenvolvimento de novos adjuvantes (imunostimulantes) e sistemas de entrega vacinais. Muitas das vacinas que estão em desenvolvimento são baseadas em subunidades purificadas, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos, componentes bem definidos que são geralmente bastante seguros. No entanto, frequentemente podem ser pouco imunogênicos e, portanto, requerem o uso de adjuvantes e sistemas de administração para induzir respostas imunes ideais (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012).

1.2 NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA

Ainda que a nanotecnologia não seja um conceito novo, ela tem ganhado um destaque significativo graças aos avanços na ciência dos materiais e nanoengenharia na última década, tornando-a especialmente atrativa para aplicações em biociência, como, por exemplo, na engenharia de tecidos, e como sistemas de entrega de fármacos (especialmente em terapias contra cânceres) ou antígenos específicos (como sistema de entrega vacinal) (CHOW; HO, 2013; KOUCHAKZADEH; SAFAVI, 2015).

As nanopartículas são definidas como dispersões particuladas ou partículas sólidas com um tamanho entre 10-1000nm que demonstram propriedades e funções únicas devido ao seu "efeito de tamanho" (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Propriedades adjuvantes de nanopartículas têm sido descritas em diversos estudos, porque podem co-entregar múltiplos agentes em uma única plataforma biocompatível com absorção e eficiência aprimoradas em comparação com o tratamento convencional (como por exemplo, vacinas padrão) (CHOW; HO, 2013; SINGH et al., 2007). Uma das principais hipóteses sobre por que as formulações com nanopartículas são eficazes no desenvolvimento de vacinas é que as NPs proporcionam liberação controlada e lenta de antígenos, criando um depósito no local da administração e fornecendo

proteção potencial *in vivo* (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007; MANOLOVA et al., 2008).

Nesse contexto, as nanopartículas poliméricas têm sido muito exploradas, os antígenos são encapsulados, adsorvidos ou dispersos na matriz polimérica de nanoesferas, dendrímeros e micelas uma vez que as nanopartículas poliméricas permitem o encapsulamento de moléculas bioativas, as protegendo contra a degradação enzimática e hidrolítica e transportando para tecidos específicos, células e compartimentos celulares (MOHANRAJ; CHEN, 2006; NITTA; NUMATA, 2013).

Mais do que a forma no desenvolvimento dessas nanopartículas poliméricas é possível adotar estratégias que aumentem sua funcionalidade ao promover alterações de suas propriedades físico-químicas, como o tamanho de partícula. É muito importante determinar o tamanho da nanopartícula, pois ele pode influenciar a distribuição *in vivo*, o destino biológico, a toxicidade e a capacidade de direcionamento dos sistemas de nanopartículas (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Por exemplo, foi relatado que as nanopartículas menores (25 nm) são transportadas através do sistema linfático com mais facilidade do que as partículas maiores (100 nm) e se acumulam nas células dendríticas residentes no linfonodo (ZOLNIK et al., 2010).

Além do tamanho, outras propriedades físico-químicas, como a carga, podem ser manipuladas para benefícios terapêuticos desejados (ZOLNIK et al., 2010). A carga da superfície de uma nanopartícula geralmente caracterizada pelo seu potencial zeta que reflete o potencial elétrico das partículas e é influenciado pela composição da partícula e pelo meio em que está disperso. As nanopartículas com um potencial zeta acima de +30 mV e menor que -30 mV mostraram-se estáveis em suspensão, uma vez que a carga superficial impede a agregação das partículas. Esse potencial pode também ser usado para determinar se um material ativo carregado é encapsulado no centro da nanocápsula ou adsorvido na superfície (MOHANRAJ; CHEN, 2006).

A escolha dos componentes da matriz polimérica é importante para se modular as características de liberação e de degradação da partícula, pois eles controlam e mantêm a liberação do antígeno durante o transporte e no local de localização, de modo a aumentar a sua eficácia (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Os biopolímeros que compõe a matriz das nanopartículas biodegradáveis podem ser naturais, como proteínas e carboidratos, ou de origem sintética (ELZOGHBY; SAMY;

ELGINDY, 2012). Biomateriais naturais apresentam méritos de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade, enquanto a estrutura bem definida de polímeros sintéticos exibe propriedades cinéticas de degradação bem definidas e refinadas, assim como propriedades mecânicas (NITTA; NUMATA, 2013).

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

Pensando nessa série de vantagens, encontrou-se na albumina um potencial interessante para a produção de uma matriz polimérica natural, pois além das vantagens já apresentadas para as nanopartículas proteicas (biodegradável, metabolizada em produtos inócuos), essa proteína é considerada não-imunogênica, fácil de purificar e é solúvel em água, o que garante a facilidade de entrega por injeção e, portanto, um candidato ideal para a preparação de nanopartículas (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012).

A albumina é uma proteína plasmática (35-50 g/L de soro humano) com um peso molecular de 66,5kDa e tempo de meia-vida médio de 19 dias, ela é altamente estável em uma faixa de pH entre 4 a 9, podendo ser aquecida a 60°C por até dez horas sem efeitos deletérios (KOUCHAKZADEH; SAFAVI, 2015). A albumina também pode ser solubilizada em 40% etanol e apresenta capacidade de ligação a vários fármacos, bem como capacidade de emulsificação, gelificação (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; RODRIGUES et al., 2013).

As nanopartícula construídas a partir dessa proteína já vêm sendo utilizadas pela indústria farmacêutica como carreadora de fármacos, especialmente contra câncer, pois apresentam propriedades como biodegradabilidade, ausência de toxicidade e imunogenicidade, fazendo delas candidatas ideais para entrega de drogas e antígenos (CHOW; HO, 2013; KOUCHAKZADEH; SAFAVI, 2015; YU et al., 2014).

Em resultados do nosso próprio grupo, o potencial das nanopartículas de albumina sérica (NP-BSA) em atuarem como sistema de entrega de antígenos e

ativação do sistema imunológico contra microrganismos já tem sido descrito para *Dengue vírus* e para *Pseudomonas aeruginosa* (SOUZA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2012).

O uso dessas nanopartículas como novos sistemas vacinais para a dengue mostrou uma ativação da resposta imune em camundongos imunizados com BSA-NPs contendo os quatro sorotipos inativados adsorvidos à sua superfície (SILVA et al., 2012). Essa formulação foi capaz de induzir uma elevada produção de anticorpos IgG anti-dengue nos camundongos, contudo, estes anticorpos possuíam fraca capacidade neutralizante para todos os quatro sorotipos de DENV, além de induzirem uma elevada expressão de IL-10 e baixa de IFN- γ .

Com relação ao estudo da prevenção de infecção causada por *P. aeruginosa* pelo uso das formulações de nanopartículas de albumina sérica, os resultados demonstraram a presença de uma resposta imune protetora contra modelo murino pulmonar de inflamação causada cepa não patogênica (RODRIGUES et al., 2013) e cepa patogênica PA14 (SOUZA et al., 2018). Estes resultados indicam o potencial desta plataforma em atuar como sistemas de entrega de antígenos e ativação do sistema imunológico.

Buscando caracterizar o efeito pró-inflamatório das nanopartículas de a fim de estabelece-las como uma nova plataforma vacinal para doenças infecciosas, nosso grupo demonstrou o potencial adjuvante dessas nanopartículas usando modelos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos indicam uma atividade pró-inflamatória das NP-BSA após a inoculação na pele de camundongos, confirmando desta forma, o potencial adjuvante dessas nanopartículas (SILVA et al., 2018).

Desse modo, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de nanopartículas de BSA associadas ao ZIKV inativado, seja ele encapsulado ou administrado juntamente com as nanopartículas, em atuar como um promissor sistema de liberação de antígeno em uma vacina experimental para a doença.

EVALUATION OF EXPERIMENTAL VACCINE PLATFORMS AGAINST *Zika virus* USING BOVINE SERUM ALBUMIN NANOPARTICLES

Gabriel Augusto Pires de Souza¹, Gabriela Oliveira Vizotto Ribeiro¹, Pedro Henrique Cruvinel da Silva¹, Ezequiel Aparecido Salvador¹, Fernanda Roza de Oliveira¹, Igor Pereira Godinho¹, Renato Fróes Goulart de Castro¹, Alessandra da Silva Orfano², Luiz Cosme Cotta Malaquias¹, Luiz Felipe Leomil Coelho¹

1. Institute of Biomedical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Federal University of Alfenas, Minas Gerais, Brazil.
2. Laboratory of Medical Entomology, René Rachou Research Centre–FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.F.L.C (e-mail: luiz.coelho@unifal-mg.edu.br)

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an emerging *Flavivirus* that has caused epidemic outbreaks in islands in the Pacific region and several countries of the Americas. In parallel, severe manifestations such as microcephaly and Guillain-Barré syndrome have increased in incidence during the ZIKV outbreak. This scenario contributed to the establishment of a state of emergency by the World Health Organization (WHO). Therefore, finding an effective vaccine to prevent ZIKV infections is a priority, since there are no vaccines for ZIKV in advanced stages of development. This strengthens the need to test alternative vaccine platforms to prevent ZIKV infections. Preliminary studies from our group have been showed that bovine serum albumin nanoparticles are promising systems for delivery microbial antigens. Therefore, due to the lack of available vaccines for ZIKV and results previously obtained by our group, this study aims to evaluate if bovine serum albumin nanoparticles (BSA-NPs) associated to inactivated ZIKV are able to induce the production of specific antibodies against the virus. *In vitro* assays were performed to evaluate the cytotoxicity of the formulation and also to evaluate the uptake rate of nanoparticles by permissive cells. Finally, mice were immunized with the nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ) or immunized with BSA-NPs mixed with inactivated ZIKV (NP+ZIKV). Anti-ZIKV IgG antibodies were measured in the blood of immunized animals by ELISA. The results indicate that NPZ nanometer platform has 226.1 ± 3.4 nm in diameter and -15.9 ± 1.0 mV of surface charge. Electron Scanning Microscopy indicates that this nanoparticle has an irregular spherical morphology. Detection of the viral genome in nanoparticles suggests the presence of ZIKV in the formulation and a high percentage of encapsulation efficiency (96%). The nanoparticles are uptaken by VERO cells, without any significant cytotoxicity. Mice immunized with nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ) did not show substantial output of total IgG antibodies against ZIKV. In contrast, mice immunized with inactivated ZIKV mixed with BSA nanoparticles (NP+ZIKV) showed a significant production of anti-ZIKV antibodies (Total IgG and IgG1). The data strengths the adjuvant potential of BSA-NPs in the elaboration of an effective vaccine against ZIKV. However, Future studies should be performed to determine whether the produced antibodies have neutralizing action and if these antibodies can protect susceptible animals to ZIKV infection.

Keywords: *Zika virus*, bovine serum albumin, vaccines, nanoparticles.

1 INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to Flaviviridae family and *Flavivirus* genus. This virus was first isolated in the Zika Forest, Uganda in 1947 (WEAVER et al., 2016; YUN; LEE, 2017). ZIKV is an enveloped virus with approximately 50 nanometers in diameter and with a single-stranded positive RNA genome (SHI; GAO, 2017).

The virus is transmitted to humans by hematophagous mosquitoes mainly those belonging to the *Aedes* genus (PETERSEN et al., 2016). The infection was restricted in endemic areas of Africa and Asia for several decades. Individuals infected by ZIKV in these areas showed a self-limited febrile disease. However, in 2007, sixty years after its discovery, the virus was responsible for an outbreak in Micronesia (WEAVER et al., 2016; YUN; LEE, 2017).

At the beginning of 2015, Zika cases increase in Latin American countries and at the end of 2015, it was detected 1,300,000 cases of suspected ZIKV infection in Brazil (PETERSEN et al., 2016; YUN; LEE, 2017). More than 80% of infected individuals are asymptomatic. The symptomatic disease usually manifests as a self-limiting febrile illness with symptoms very similar to dengue (JAMALI et al., 2016). The high rate of ZIKV infection in Brazil was established as one of the leading causes of an increase in cases of newborns with microcephaly in the Brazilian Northeast. In 2015, more than 3,000 suspected cases of microcephaly, including fatal cases, were reported. These cases represented an increase of more than 20 times compared to previous years and ZIKV infection was indicated as one of the risk factors for microcephaly development. Later, authorities in French Polynesia also reported an increase in cases of the poor fetal and newborn formation during an outbreak of ZIKV in 2014 and 2015 (CHAN et al., 2016).

Since ZIKV was considered a risk for the development of microcephaly, the search for an effective and safe vaccine has become a high priority for the WHO. Currently, some vaccines have been tested on pre-clinical models, such as the ZPIV vaccine. This vaccine was developed by the Walter Reed Army Research Institute (WRAIR) using a purified and formalin-inactivated Puerto Rican ZIKV strain (PRVABC59) (POLAND et al., 2018). The VRC5288 vaccine is based on DNA and it

is in development by the National Institutes of Health (USA) (POLAND et al., 2018; et al., 2018). Two other vaccines using inactivated and purified viruses (VLA1601 and TAK-426), were developed by ValNeva Emergent BioSolutions and a partnership by Takeda and Advanced Biomedical Research and Development Authority (BARDA)(RICHNER et al., 2018).

Many of the vaccines that are under development or phase I trials are based on purified subunits, recombinant proteins or other microbial components that are generally safe. However, these antigens could be poorly immunogenic and therefore needs the use of adjuvants and/or delivery systems to induce optimal immune responses (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012). Currently, one of the primary needs of vaccinology is the development of new adjuvants (immunostimulants) and new delivery systems.

Polymeric nanoparticles based on biodegradable polymers have been widely explored as new vaccine platforms due to their ability to stimulate the immune system and provide sustained antigen release after vaccine administration (AKAGI; BABA; AKASHI, 2012). Several studies have been describing adjuvant properties of NPs. Once they can co-deliver multiple agents in a single biocompatible platform which can improved absorption and efficiency compared to conventional treatment (CHOW; HO, 2013; SINGH et al., 2007) NPs can provide controlled and slow release of antigens, creating a depot at the site of administration and also providing potential protection against antigen degradation *in vivo* (DOBROVOLSKAIA; MCNEIL, 2007; MANOLOVA et al., 2008).

Albumin is a plasmatic protein (35-50 g/L human serum) with a molecular weight of 66.5 kDa and a mean half-life of 19 days (KOUCHAKZADEH; SAFAVI, 2015). It exhibits stability at different pHs (4 to 9), solubility in 40% ethanol and can be heated at 60 °C for up to 10 hours without deleterious effects. The albumin is also a biodegradable and non-toxic protein (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012a, 2012b). In this context, protein nanoparticles appear as a promising alternative and albumin is an ideal protein to constitute the polymer matrix of nanoparticles used in antigen and drug delivery systems

Our group has been evaluating the potential of biodegradable bovine serum albumin nanoparticles to act as an antigen delivery system for two target diseases: 1)

Dengue and 2) infections caused by *P. aeruginosa*. Data from these studies indicated the potential of this platform to act as antigen delivery systems and also to induce activation of the immune system (SILVA et al., 2018, SOUZA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2013; SILVA et al., 2012). Therefore, this work aims to evaluate the potential of BSA-NPs associated with inactivated ZIKV to act as a promising antigen delivery system for ZIKV vaccine development.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 PRODUCTION, TITRATION AND INACTIVATION OF *Zika virus*

The *Zika virus* strain (BRPE243/2015) used in this study was isolated from serum of a patient with an acute maculopapular rash in Pernambuco State, Brazil, during the 2015 outbreak. The ZIKV strain was kindly provided by Dra. Betânia Paiva Drumond (Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais).

ZIKV was inoculated into Vero cell monolayers (MOI: 0.01) cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 1% Fetal Bovine Serum (FBS) and antibiotics Penicillin (10^4 UI/L), Streptomycin (10 mg/L) – P/E – and amphotericin B – AmB – (2 mg/L). Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. After 5-6 days of infection and the development of the characteristic cytopathic effect, the cell supernatant was collected, clarified by centrifugation at 1200 G for 3 min at 4 °C. The supernatant was collected and stored at -80 °C. Viral titer was determined by counting the number of plaque forming units (PFU) using a monolayer of Vero cells cultured in 6-well tissue culture plates after fixation with 10% PBS-formaldehyde and Violet Crystal staining. The viral titer was calculated by the number of viral plaques detected multiplied by the inverse of the dilution.

The produced ZIKV was submitted to a thermal inactivation in a water bath at 72°C for 10 min (MÜLLER et al., 2016). The loss of its infectivity was determined by the inability of this virus to produce a cytopathic effect in Vero cells. Therefore, Vero cells were cultured in 96-well tissue culture plates and inoculated with the inactivated ZIKV (ZIKV_IN) and infectious ZIKV as a positive control. As a negative control, the cells were cultured with DMEM medium supplemented with 1% FBS, (P/E) and AmB.

After 5 days of infection, cells were fixed with 10% PBS-Formaldehyde solution and also stained with Violet Crystal. One hundred microliters of 1% SDS solution in Saline Phosphate Buffer (PBS) was then added to each well of the plate. The plate was kept under stirring for 24 hours at room temperature. After complete dissolution of the Violet Crystal, the optical density was read in a microplate reader (Anthos Zenyth 200rt) at a wavelength of 570 nm.

2.2 PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BSA NANOPARTICLES:

2.2.1 Preparation and physical-chemical characterization of NPs

Bovine serum albumin empty nanoparticles (ENPs) or nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ) were obtained by the addition of ethanol dropwise (ethanol: water ratio 1.5:1) in a solution of bovine serum albumin (Sigma, USA) (2% w/v) in deionized water (Rodrigues et al., 2013). In this study, was evaluated the production of NPs with different concentrations of inactivated virus (PFU) (3.95×10^3 , 7.9×10^3 and 1.58×10^4 PFU/mg of BSA) and also DMEM 1% SFB (for ENPs), before the coacervation step. The crosslinking was done with the addition of 40 μ L of 25% glutaraldehyde to the opalescent solution, keeping it under stirring for 2 h. Subsequently, the solution is subjected to centrifugation at 6700 G for 15 minutes. The supernatants of NPZ were collected after centrifugation and used to perform ZIKV quantification by Real-time PCR (qPCR). The pellet was resuspended in sterile PBS pH 7.4 at the final concentration of 10 mg/mL. Particle size, distribution (PDI) and zeta potential were determined by the Dynamic Light Scattering technique (DLS - Malvern Instruments Ltda. Zetasizer Nano ZS - UK) at the Laboratory of Drug Release Systems of Federal University of Alfenas. The samples were diluted in PBS pH 7.4 (1:10) and submitted to analyzes using a red laser source ($\lambda = 633$ nm) at 25 °C in triplicate.

2.2.2 Scanning Electron Microscopy (SEM)

NPZ were fixed with fixative solution (4% Paraformaldehyde, 0.1M Sodium Cacodylate, 1% Glutaraldehyde and 1mM Calcium Chloride) for 2 hours and washed with PBS for 3 times to remove excess of fixative solution. Then, the nanoparticles were placed to adhere to Poly-lysine (sigma)-treated coverslip overnight at room temperature. After adhesion, the sample was dehydrated in increasing series of acetone (30-100%) and subjected to drying in critical point equipment (Emitech K850). The sample was mounted in an appropriate sample port and metalized with gold particles using the Emitech K550 metallizer. The visualization and documentation were done using the JSM5600 Scanning microscope at Laboratory of Medical Entomology, René Rachou Research Centre–FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil.

2.2.3 Thermal stability of NPZ

The nanoparticle solution (10 mg/mL) was incubated at 4°C, 25°C and 60°C for 1, 2, 4 and 7 days. NPZ size and potential were measured using DLS after incubation at the desired time. The incubated samples were then centrifuged at 6,700 G for 15 min and the supernatant was used to quantify proteins by Bicinchoninic Acid Solution (BCA) method.

2.3 DETECTION OF THE VIRAL GENOME IN NPZ

2.3.1 Detection of the viral genome in the NPZ enzymatic degradation product

Enzymatic degradation of the NPZ matrix was performed by adding proteinase K (200 µg/mL) to 10 mg of NPZ in PBS. The reaction was incubated at 37°C under shaking (180 rpm) overnight. The absorbance of the reaction was measured on a microplate reader (Anthos Zenyth 200rt) at 565 nm to confirm the enzymatic degradation of NPZ (LANGER et al., 2008).

The enzymatic degradation product obtained was subjected to viral RNA extraction using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, USA) following the manufacturer's instructions. The viral RNA target was converted to cDNA using Firescript RT-PCR Kit (Solis Biodyne) and Random Primers. The cDNA was used as template to amplify ZIKV genome using the primers described by Xu et al (2016) (FWD: 5' AGGATCATAGGTGATGAAGAAAAGT 3'; REV: 5' CCTGACAACACTAAGATTGGTGC 3') Amplification was performed on a thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700 - Thermo Fisher Scientific) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 seconds, annealing at 50 °C for 10 seconds and 72 °C for 1 minute. Amplified PCR products were run on a 1.5% agarose gel stained with Gel Red nucleic acid fluorescent dye as indicated by the manufacturer (Biotium, USA).

2.3.2 Quantification of ZIKV in the supernatant of NPZ by Real-time PCR (qPCR)

The quantification of remaining ZIKV in the supernatant of formed NPZ was used to calculate the percentage of encapsulation efficiency (EE%). After centrifugation of the produced NPZ, the supernatant was collected and diluted in 1:10 in sterile water. The RNA was extracted from diluted supernatant using the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, USA). The viral RNA target was converted to cDNA and amplified using a one-step reaction reverse transcription Real-time PCR kit (GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System, Promega) following the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide primers (FWD: 5' GGAAGTCCTAGAGATGCAAGAC 3'; REV: 5' ATCAATTGGCTTCACAACGC 3') and a TaqMan probe (5' /56-FAM/TGGGATAGG/ZEN/CTCAAACGAATGGCA/3IABkFQ/3) were designed using the OligoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com>) using a NS5 sequence of BRPE243/2015 ZIKV strain as template. EE% was calculated according to the following equation, in which Z_i represents the amount of ZIKV before coacervation step and Z_s is the amount of ZIKV in the supernatant.

$$EE\% = \left[\left(\frac{Z_i \times Z_s}{Z_i} \right) \times 100 \right]$$

3 IN VITRO ANALYSIS

3.1 CELL VIABILITY ASSAY

Cell viability was assessed by MTT method [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. In this test, 6×10^3 cells were seeded per well in 96-well plates. After 24 hours of incubation, NPZ and ENP were added to a final concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Glutaraldehyde (0.25%) and Triton-X (1%) was also added to its respective wells as positive controls for cytotoxicity. The culture was incubated at 37 °C in an incubator at 5% CO₂ for 48 h. After it was added 10 μL of MTT dye (5 mg/mL) and the cells were incubated again for an additional 4-h period.

Then, the medium was carefully removed and added 100 μL of DMSO for solubilization of formazan crystals. The plates were shaken for 5 min and absorbance for each sample was measured in a spectrophotometric microplate reader at 570 nm.

3.2 NANOPARTICLE UPTAKE ASSAYS

3.2.1 Flow cytometry

Vero cells were plated in 24-well tissue culture plates (2×10^5 cells/well) and incubated at 37 °C, 5% CO_2 in a CO_2 incubator for 24 h to form a confluent monolayer. Subsequently, 200 μL of the NPZ and ENPs (10 mg/mL) was added to their respective wells and incubated for 1, 4, 6, 12 and 24 hours. The cells were washed two times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and then, 200 μL of trypsin (10 mg/mL) was added and the plate incubated for 5 min at 37 °C. Detached cells were collected and 500 μL of DMEM 5% SFB was added to inactivate trypsin. Cells were centrifuged at 1200 G for additional 5 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in PBS and centrifuged again as described above. Finally, the cells were resuspended in DMEM medium and data were acquired using a Guava EasyCyte Mini flow cytometer (Guava Technologies).

3.2.2 Confocal microscopy analyzes

Vero cells were plated on coverslips in 6-well tissue culture plates (5×10^5 cells/well) and incubated at 37 °C, 5% CO_2 in a CO_2 incubator for 24 h to form a confluent monolayer. Culture medium was replaced by 5% DMEM containing 0.5 mg/mL of NPZ and incubated for 1 and 24 hours. To remove free nanoparticles, cells were washed two times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Cells were fixed with 10% formaldehyde in PBS, for 15 min. Thereafter, cells were stained with Tetramethylrhodamine (TRITC) (Rhodamine Phalloidin Conjugate – Molecular Probes) for 20 minutes and washed several times with PBS. Finally, cells were stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (SIGMA, USA) for 10 min at room temperature and then washed with PBS. The slides were mounted on a drop of glycerol and viewed under a Nikon C2+ confocal microscope system using the 60x objective.

4 IN VIVO ANALYSIS:

4.1 Immunization protocol and ELISA assay for quantification of total IgG

All five to six-week-old female C57Bl/6 mice used were maintained with free access to food and water and all experimental protocols were approved by the local Animal Experimentation Ethics Committee (12/2016). Mice (n=4/group) were immunized via the subcutaneous route using 100 μ L (10 mg/mL) of NPs (NPZ or ENPs), 100 μ L of ENPs (10 mg/mL) mixed with 10^3 pfu of ZIKV on days 0, 7 and 14. Additional mice were inoculated with 100 μ L of PBS or 100 μ L ZIKV_IN (10,000 pfu/mL) (LAROCCA et al., 2016) (Figure 1). Fourteen days after the last immunization (at day 28), the blood of the mouse was collected by the submandibular vein and the sera were separated for ELISA. Forty four days after the last immunization, the animals were infected with 9×10^5 PFU of ZIKV by intraperitoneal (i.p) route. Eight days after infection the blood was collected and the sera were separated for ELISA.

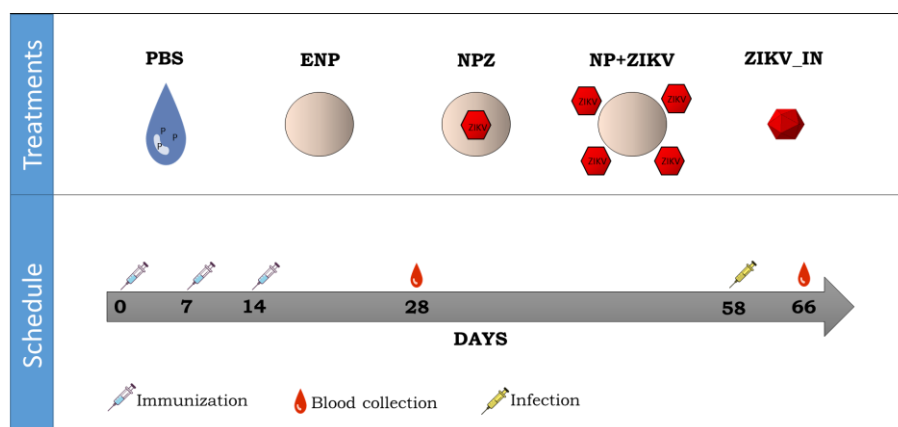


Figure 1: Immunization schedule. Female mice (5-6 weeks age) were immunized with the respective treatments (PBS, ENP, NPZ, NP+ZIKV and ZIKV_IN) (n=4/group) on days 0, 7 and 14. Fourteen days after last immunization (at day 28) the blood was collected and serum separated for ELISA to detect the production of total anti-IgG and IgG1. Forty-four days after the last immunization, the animals were infected with 9×10^5 PFU of ZIKV by i.p route and 8 days after infection the blood was collected and the sera were also separated for ELISA.

The immunogenicity of all formulations were measured by measuring ZIKV specific antibodies levels in the serum. The quantification of IgG antibodies in the immunized animals was done using 96-well microtiter plates coated with ZIKV (500 PFU/well). An anti-murine IgG (Sigma, USA) conjugated with horseradish-peroxidase was used for the IgG total quantification. For specific IgG1 quantification, it was used an anti-murine IgG1 (Sigma, USA), conjugated with horseradish-peroxidase.

5 RESULTS

5.1 THERMAL INACTIVATION OF ZIKV:

The loss of infectivity of ZIKV_IN was confirmed after infection of Vero cells. It was observed that ZIKV_IN did not induce the cytopathic effect in Vero cells after 5 days of infection. In contrast, Vero cells inoculated with infectious ZIKV showed the classical cytopathic effect (Figure 2A and 2B).

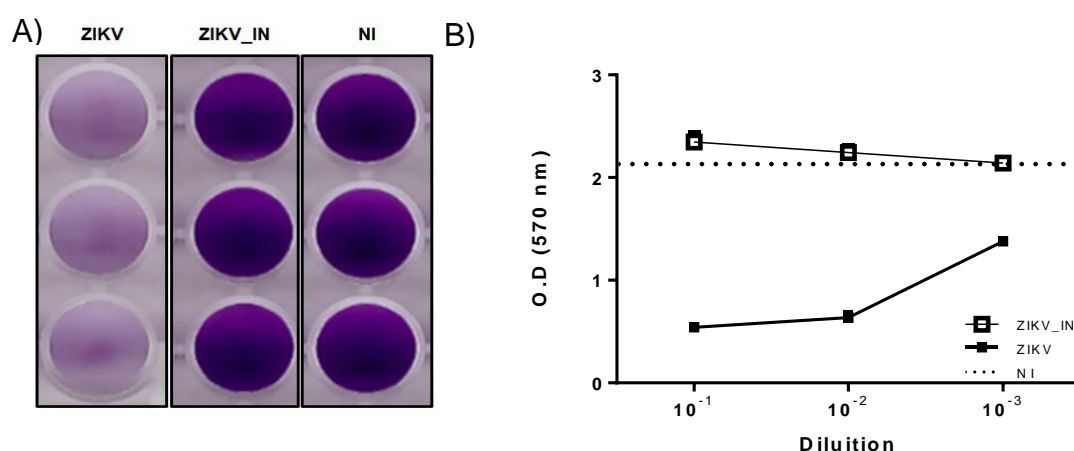


Figure 2: Thermal inactivation of ZIKV. Inactivated ZIKV (ZIKV_IN) and infectious ZIKV (ZIKV) were used to infect Vero cells at 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} dilutions. Uninfected Vero cells (NI) were used as a negative control. A) Vero cells monolayers fixed and stained with crystal violet. The absence of cytopathic effect indicates the inactivation of the virus (ZIKV_IN). B) The graph shows a relation between the optical densities (O.D) of each group at different dilutions of the virus. ZIKV_IN O.D is represented by the open square and the ZIKV O.D by the closed square. O.D of uninfected cells is represented by the dotted line.

5.2 CHARACTERIZATION OF NPs

DLS analysis showed that the synthesized nanoparticles have different sizes according to the amount of virus added to reaction before the coacervation step. Empty Nanoparticles (ENPs) had an average diameter of 197.6 ± 0.8 nm. This size was very similar to that observed on nanoparticles produced with the lower concentration of ZIKV_IN (3.95×10^4 PFU/mg of BSA) (Formulation 2). The formulation that uses 7.9×10^4 PFU/mg of BSA had an average size of 226.1 ± 3.4 nm (Formulation 3) and the formulation that use 1.58×10^5 PFU/mg of BSA had a mean size of 393.1 ± 3.0 nm (Formulation 4) (Table 1).

Table 1: Characterization of serum albumin nanoparticles produced with different concentrations of inactivated ZIKV

Form.	PFU/MG of BSA	Average size (nm)	Zeta Potential* (mV)	PDI
1	0	197.6 ± 0.8 ^a	-16.3 ± 0.9 ^d	0.185 ± 0.012 ^e
2	3,95x10 ³	210,3 ± 1.9 ^a	-17.2 ± 0.7 ^d	0.144 ± 0.019 ^{e, f}
3	7,9x10 ³	226.1 ± 3.4 ^b	-15.9 ± 1.0 ^d	0.166 ± 0.021 ^{e, f}
4	1,58x10 ⁴	393.1 ± 3.0 ^c	-16.7 ± 1.1 ^d	0.228 ± 0,023 ^{e, g}

*Zeta potential (mV) at pH 7.4.

Means followed by the same letters do not differ among the experimental groups ($P \leq 0.05$) by Tukey's test.

The mean Zeta potential of the nanoparticles was -16.3 ± 0.9 for ENPs, -17.2 ± 0.7 mV for formulation 2 (3.95×10^4 PFU/mg of BSA), -15.9 ± 1.0 mV for formulation 3 (7.9×10^4 PFU/mg of BSA) and -16.7 ± 1.1 mV for formulation 4 (1.58×10^5 PFU/mg of BSA). (Table 1). Statistical analysis did not indicate any significant difference between zeta potential values in any of these formulations (Table 1).

The mean polydispersion index (PDI) for ENPs was 0.185 ± 0.012 . PDI for formulation 2 was 0.144 ± 0.019 and for formulation 3 it was observed a PDI of 0.166 ± 0.021 , with no statistical difference between them. The PDI for formulation 4 was 0.228 ± 0.023 . (Table 1).

Regarding the size and zeta potential observed in all formulations, it was noted that formulation 2 has a size similar to ENP (Formulation 1). The formulation 4 has a size very similar to submicron particles. Therefore, these two formulations were excluded from for the subsequent analysis. Scanning electron microscopy images of the nanoparticles produced in formulation 3 revealed their irregular spherical shape (Figure 3).

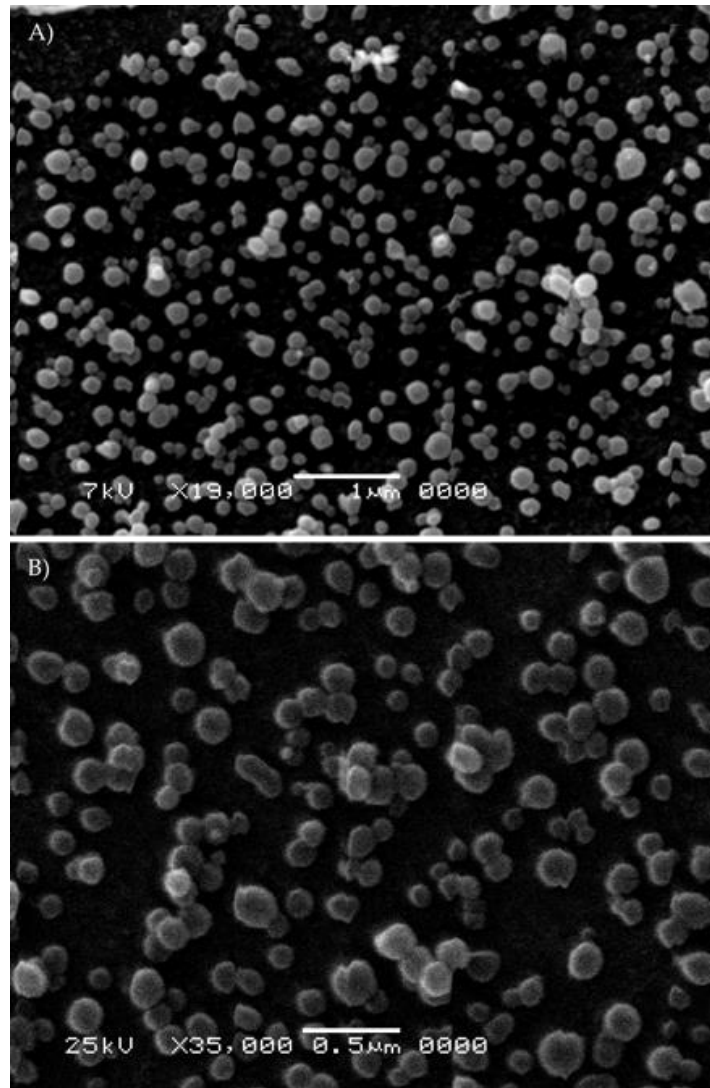


Figure 3: Scanning electron microscopy of Formulation 3. Nanoparticles were produced by the coacervation technique and with 7.9×10^3 PFU/mg of BSA. Their visualization and documentation were done using the Scanning Microscope JSM5600. A) NPZ observed at 7kV and in a 19k-fold increase; B) NPZ observed at 25 kV and in a 35k-fold increase.

To evaluate the stability of nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ) at different temperatures, the nanoparticles were incubated at 4°C, 25°C and 50°C at different times. Regarding the NPZ size, the nanoparticles incubated at 25°C and 50°C did not show significant variations until seven days of incubation. However, the nanoparticles incubated at 4°C showed an increase in their average size after seven

days of incubation. (Figure 4A). The zeta potential of the NPZ showed no significant difference between the surface charges of the nanoparticles at any of the temperatures tested (Figure 4B).

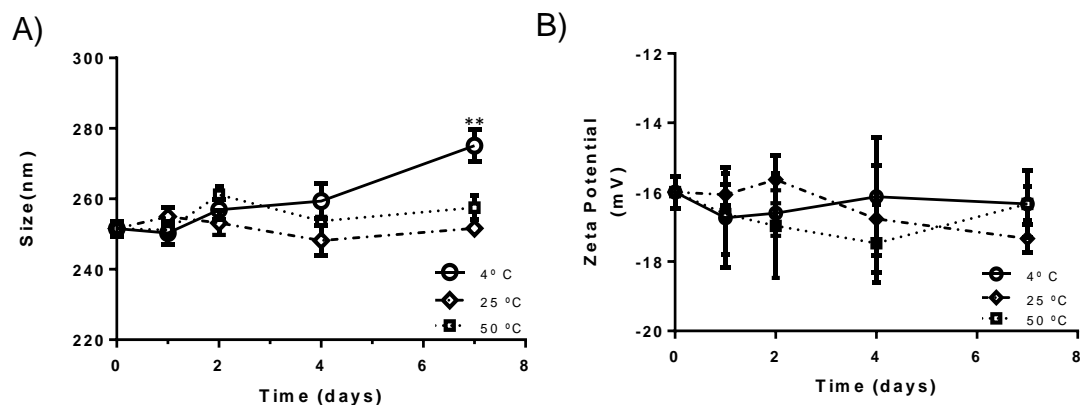


Figure 4: Thermal stability test of nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ). A) Mean size of NPZ incubated for 7 days at temperatures of 4°C, 25°C and 50°C. B) Zeta potential of NPZ incubated for 7 days at temperatures of 4°C, 25°C and 50°C. The open circle represents the NPZ incubated at 4 °C, the lozenge represents the NPZ incubated at 25 °C and the square represents the NPZ incubated at 50 °C. ** ($p < 0.05$).

The detection of the viral genome in the product of the enzymatic degradation of NPZ by conventional PCR was adopted as a strategy for showing the encapsulation of ZIKV in NPZ. The product of this amplification was then subjected to agarose gel electrophoresis. The amplification of a fragment of the expected size of 110 base pairs suggests the presence of the viral genome in the NPZ (Figure 5A). The quantification of remaining ZIKV in the supernatant of formed NPZ by (qPCR) is used to calculate the percentage of encapsulation efficiency (EE%). The results showed a high rate of EE% (96%).

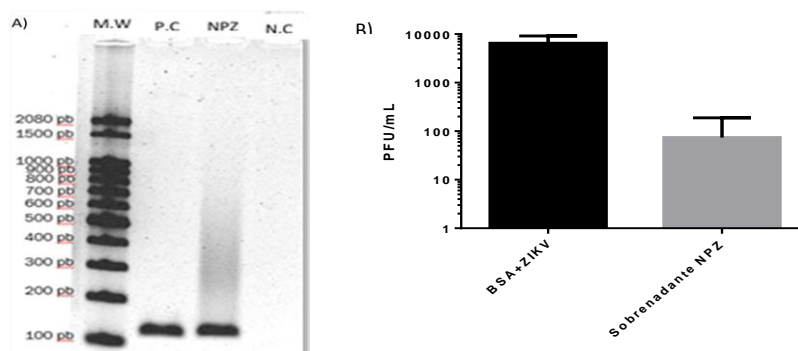


Figure 5: Detection of ZIKV genome in NPZ A) Produced NPZ were submitted to enzymatic digestion and the product was used to detect ZIKV genome by standard RT-PCR. M.W: Standard molecular weight ranging from 100 to 2080 base pairs (bp); P.C: positive control, ZIKV; NPZ: amplified cDNA obtained from enzymatic degradation of NPZ; N.C: negative control; B) Quantification (PFU/mL) in the supernatant of NPs by RT-qPCR.

5.3 *IN VITRO* ANALYSES

The cytotoxic activity of NPs was tested in Vero cells and as shown in Figure 5, treatment of cells with 500 $\mu\text{g/mL}$ of NPs (NPZ and ENP) did not induce significant cytotoxicity after 48 hours of treatment (Figure 6). These cells were also treated with low concentrations of nanoparticles (250 $\mu\text{g/mL}$ - 7.8 $\mu\text{g/mL}$) and no cytotoxic activity was detected at these concentrations (data not shown). As expected, the positive controls for cytotoxic (Glutaraldehyde 0,25% and Triton-X 1%) decrease the OD of treated cells. The supernatant of Vero cells incubated with NPZ for 5 days had no detectable viral load by qPCR (data not showed).

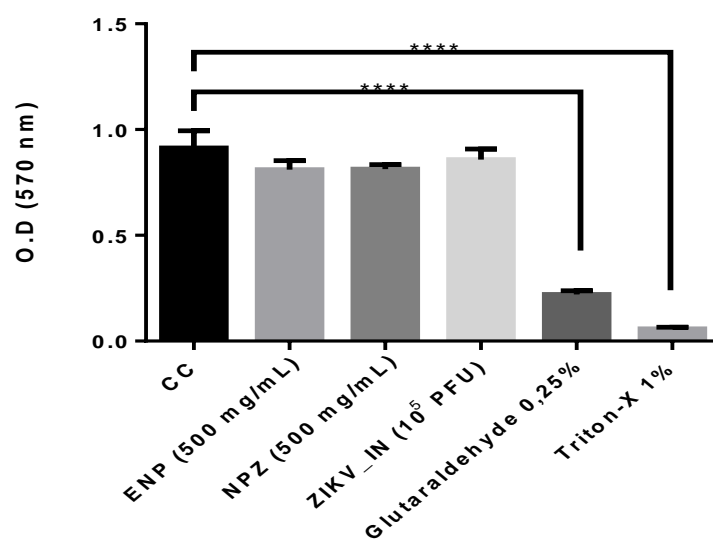


Figure 6: Cell Viability Assay of Nanoparticles on VERO cells. The graph shows the optical density (O.D) at 570 nm of each group – Cell Control (CC), empty nanoparticle (ENP), nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ), inactivated ZIKV (ZIKV_IN), Glutaraldehyde 0,25% and Triton-X 1% were used as positive controls for cytotoxicity. *** $p \leq 0.001$.

The nanoparticles uptake rate by permissive cells to ZIKV was also evaluated. BSA nanoparticles produced with glutaraldehyde as cross-link agent have an intrinsic fluorescent signal (YANG et al., 2016) and could be easily used in a microscope and flow cytometer assays. NPZ or empty nanoparticles (ENP) were incubated with Vero cells for several times. A similar rate of internalization of both NPs (ENP and NPZ) was observed in early and late times. In the first hour, 56% of cells were positive for both NPs. After 24 hours of treatment almost 95% of the cells were positive for both NPs. (Figure 7 A). There was also observed a time-dependent increase in the mean fluorescence intensity (MFI) in ENPs and NPZ treated cells (Figure 7B, 7C and 7D).

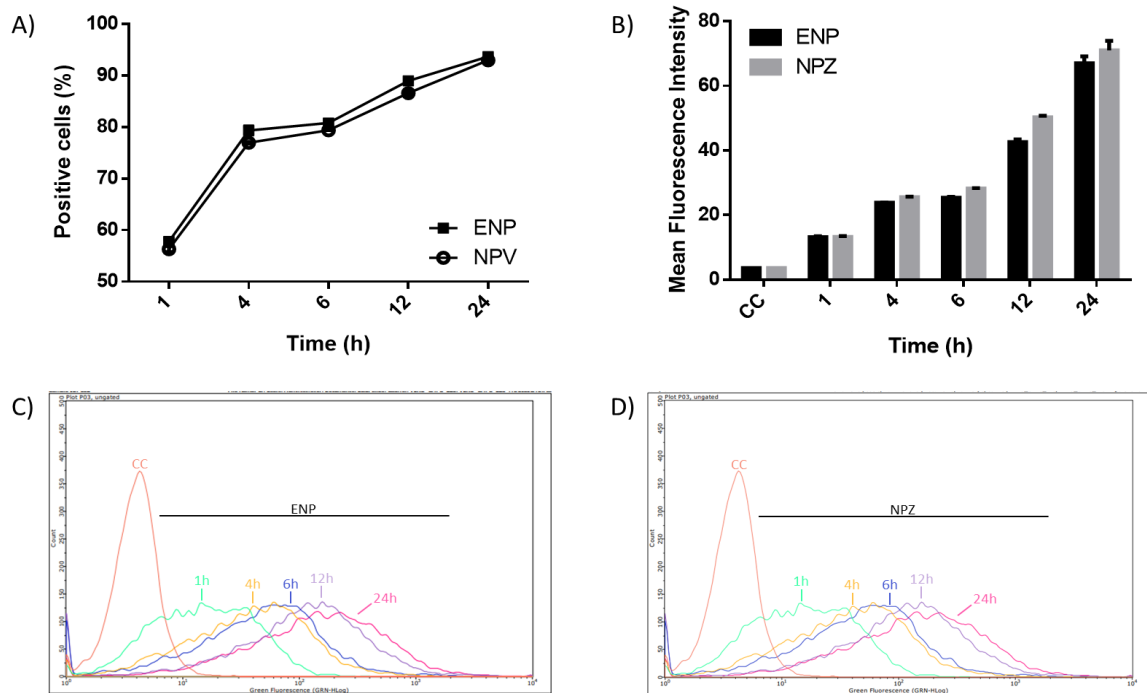


Figure 7: Nanoparticle uptake in Vero cells determined by flow cytometry assay. Particle uptake in VERO cells determined by flow cytometry assay. The VERO cells were incubated several times with nanoparticles and uptake efficiency was assessed by measuring the number of positive cells (A) and the mean fluorescence intensity (B, C and D) in a flow cytometer.

Confocal microscopy images of Vero cells treated with nanoparticles containing encapsulated ZIKV (NPZ) showed co-localization of NPZ (green) with actin (red) in both times (1 and 24 hours). However, the signal is more intense after 24h of incubation (Figure 8).

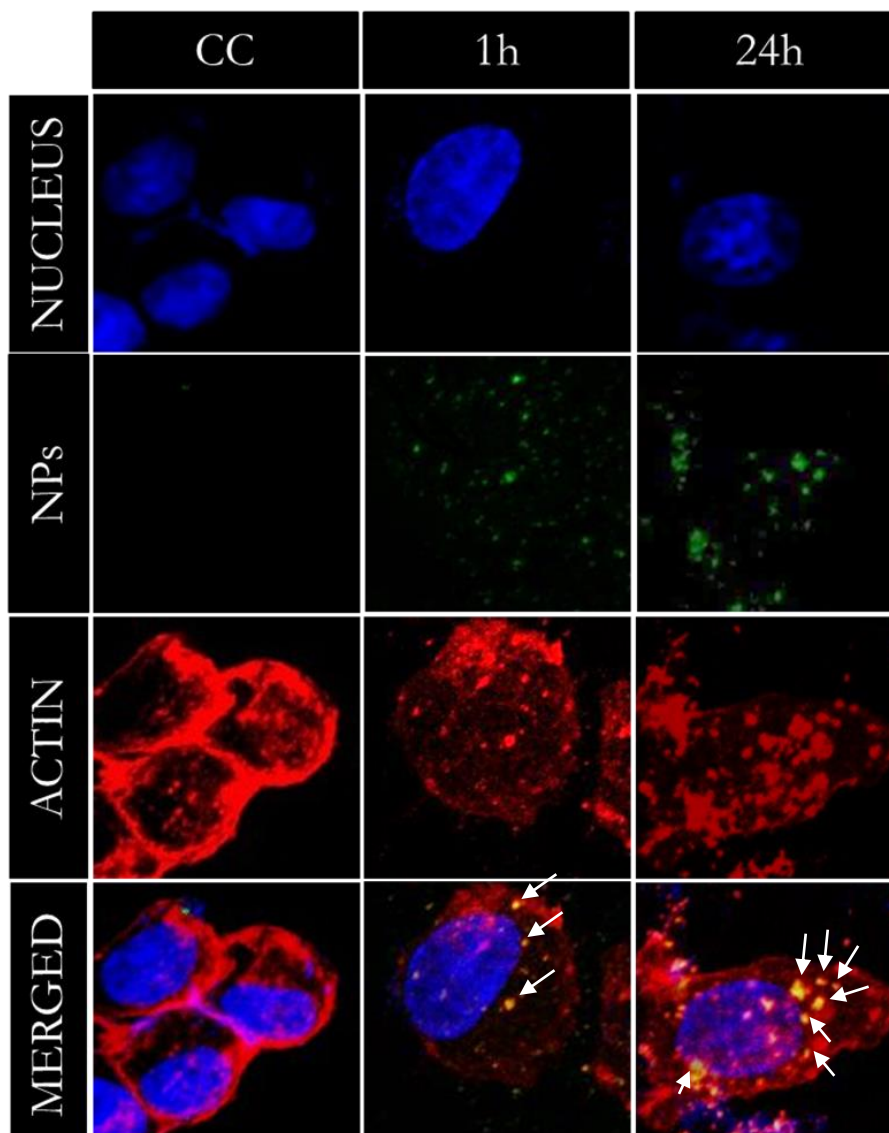


Figure 8: Confocal microscopy showing NPZ uptake by Vero cells at 1 and 24 hours. Nuclei were stained with DAPI (Blue), NPZ (green) and Actin with TRITC (red). The white arrow shows the co-localization of the actin with the NPZ (white arrows).

5.4 *IN VIVO* ANALYSES

The immunogenicity of the formulations was tested in a murine model by measuring ZIKV specific antibody levels in the sera of mice immunized with nanoparticles. Only animals immunized with NPZ showed significant production of anti-ZIKV Total IgG and IgG1 antibodies if compared to the others groups (Figure 9).

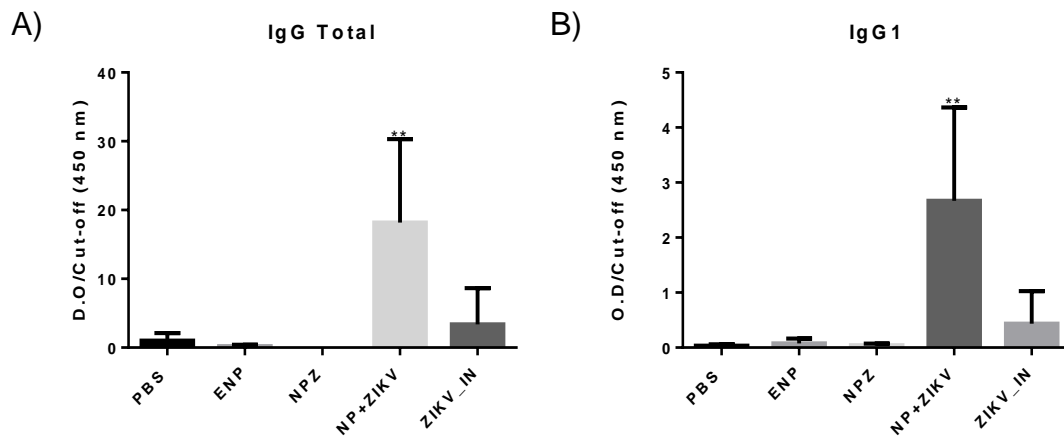


Figure 9: Antibody production in mice immunized with nanoparticles. C57Bl/6 mice (n=4/group) were vaccinated according to the indicated schedule and the sera were collected 2 weeks after the last immunization. A) Total IgG antibodies against ZIKV. B) IgG1 antibodies against ZIKV. ** represent a significant difference ($P \leq 0.05$) between the columns (PBS vs NP+ZIKV). Data are representative of two independent experiments.

Eight days after infection, it is possible to observe that the animals immunized with NP+ZIKV maintained the higher levels of antibody production in comparison to the other groups. Additionally, mice immunized with ZIKV_IN also showed significant production of total anti-ZIKV IgG after infection (Figure 10). However, there is a significant difference in antibody production between NP+ZIKV and ZIKV_IN.

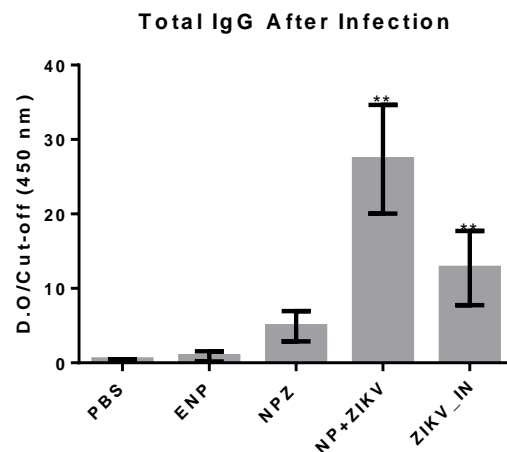


Figure 10: Antibody production in mice immunized with Nanoparticles after infection. C57Bl/6 mice (n=4/group) were vaccinated according to the indicated schedule and infected with ZIKV. The sera were collected eight days after infection. ** represent a significant difference ($P \leq 0.05$) (PBS vs NP+ZIKV; PBS vs ZIKV_IN; NP+ZIKV vs ZIKV_IN).

6 DISCUSSION

Since the beginning of the search for a vaccine against ZIKV, the vaccines that used inactivated virus were the most promising (ABBINK et al., 2016; LAROCCA et al., 2016; SUMATHY et al., 2017). These vaccines have safety advantages since the inactivation process eliminates virus replication while maintaining the antigenicity of the structural proteins. However, its immunogenicity is lower than that of live attenuated viral vaccines, requiring booster doses for inducing immunity (BARZON et al., 2016).

Inactivation by formalin requires an extra purification step for the elimination of toxic compounds (ABBINK et al., 2016; LAROCCA et al., 2016). Müller et al. (2016), suggest that ZIKV can be inactivated if subjected to temperatures above 60°C for a few minutes. Thermal inactivation of ZIKV strain used in this study was confirmed by the absence of a cytopathic effect after infection of VERO cells (Figure 2A). Therefore, inactivated ZIKV was used to produce NPs containing these viruses. The coacervation method for BSA nanoparticles by ethanol generates NPs ranging from 140 to 300 nm (STORP et al., 2012). The DLS and SEM analysis showed that produced nanoparticles have an expected zeta potential, size and morphology, described for BSA nanoparticles.

As shown in Table 1, three different concentrations of ZIKV_IN were tested in nanoparticles production. The diameter of NPZ increased significantly as more viruses were added before the coacervation step. It is crucial to determine the size of the nanoparticle, since this parameter may influence the *in vivo* distribution, biological activity and toxicity (MOHANRAJ; CHEN, 2006). For example, smaller nanoparticles (25 nm) are transported through the lymphatic system more easily than larger particles (100 nm). Particles that have a size between 100 nm and 1 µm are favorably phagocytosed by antigen presenting cells such as dendritic cells which subsequently can enter into the lymphatic capillaries (PITAKSUTTEEPONG, 2005). This event results in the accumulation of NPs in the lymph node resident dendritic cells (ZOLNIK et al., 2010).

Another critical parameter is the surface charge of a nanoparticle, characterized by its zeta potential. Zeta potential reflects the electrical potential of the particles and is influenced by the composition of the particle and the medium in which

it is dispersed. Nanoparticles with a zeta potential above +30 mV or below -30 mV were more stable in suspension, as the surface charge prevents particle aggregation (MOHANRAJ; CHEN, 2006). The zeta potential value found for all formulations was around -16 mV (Table 1). This result corroborates with that observed for BSA nanoparticles in pH 7.2 to 7.4 (YEON et al., 2011). It was established that positively charged NPs interact in a non-specific manner with the negatively charged phospholipid components of the cell membrane (VERMA; STELLACCI, 2010). In contrast, negatively charged nanoparticles may represent a strategy for better targeting of NPs because they eliminate the non-specificity of the charge-load interaction. Negatively charged NPs can bind to cells using specific interactions, such as, for example, cellular receptors. (VOIGT; CHRISTENSEN; SHASTRI, 2014; IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011).

Nanoparticles of smaller size (~ 200 nm) are described as advantageous for passive binding to the target tissue due to their increased permeability and retention. (JITHAN et al., 2011). Since the formulation 3 has an average intermediate size (226.1 ± 3.4), this formulation was used for the in vitro and in vivo experiments.

The scanning electron microscopy of NPZ showed a spherical and irregular morphology of NPZ (Figure 3). This shape can be advantageous because the spherical particles can move freely in the organism while particles with irregular geometry are much more likely to be retained by splenic filtration (CHAMPION; KATARE; MITRAGOTRI, 2007).

BSA is a very robust protein due to physical-chemical properties. It is stable at a range of pH and temperature (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012a, 2012b). The stability of BSA-NPs was confirmed in this study since our data showed high stability of NPZ incubated at 25 °C and 50°C for seven days (Figure 4). In a long period of incubation (seven days) only NPZ incubated at 4 °C showed a significant variation in their size (Figure 4). This could be due to the BSA aggregation at relatively low temperatures and low protein concentrations previously described by HONDA et al. (2000).

The presence of ZIKV into NPZ was confirmed by detecting the viral genome in the product of the enzymatic degradation of NPZ (Figure 5A) and also by a drastic reduction of viral genome in the supernatant of NPZ (Figure 5B).

Vero cells have a high safety profile and are widely used as an approved substrate for the production of human viral vaccines. These cells also are permissive to ZIKV infection (NIKOLAY et al., 2018). The uptake rate of both nanoparticles (ENP and NPZ) by Vero cells reached 93%, without any difference between the ENP and NPZ treated cells. (Figure 7A). Typically, the nanomaterial's interactions with cell membranes are influenced by the nanoparticles chemical properties, such as surface charge and also by nanoparticle shape and size (VERMA; STELLACCI, 2010). The data suggest that the presence of the ZIKV antigens did not influence the internalization of NPZ and indicate that these NPs are excellent carriers of antigens since internalization seems to be mediated by the interactions of NP with cellular receptors. Albumin endocytosis in kidney cell lines or astrocytes is mediated by the membrane megalin glycoprotein. This receptor is a member of the low-density lipoprotein receptor family that acts through a clathrin-dependent process (FRANCIS, 2010). Besides, other receptors are responsible for the recycling of albumin in several cell lines, such as glycoproteins (gp18, gp30 and gp60, secreted protein acidic cysteine (SPARC)) and the neonatal Fc receptor (LARSEN et al., 2016). Another study showed that the uptake of NPs by neutrophils adherent to the activated endothelium is dependent on Fcγ receptors (WANG et al., 2014).

The increase in MFI was observed for both NPs (ENP and NPZ) treated cells. This data strengthens the idea that the antigen does not influence the internalization of the NPs by ZIKV permissive cells ZIKV (Figure 7B). Most studies of the cellular uptake and transport of nanoparticles have been performed using fluorescently labelled nanoparticles and confocal microscopy (IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011). The BSA nanoparticles produced in this study do not require fluorescence labeling as they exhibit intrinsic fluorescence as previously described by YANG et al. (2016). Confocal microscopy and flow cytometric analysis showed the higher fluorescence intensity of NPZ signal on cells after 24h incubation. The confocal microscopy images showed a co-localization of NPZ with actin (Figure 8). Actin filaments are involved in intracellular trafficking, including membrane fission at

endocytosis, membrane stretching at the Golgi complex and maturation of endosomes (TANABE et al., 2011). Therefore, actin proteins could be involved in the intracellular traffic of BSA-NPs.

The immunogenicity of experimental vaccine platforms based on BSA-NPs and inactivated ZIKV was tested on C57BL/6 mice. C57BL/6 mice have been used as small animal model for ZIKV pathogenesis studies (usually using anti-IFNAR1 monoclonal antibody) (BRADLEY; NAGAMINE, 2017; MORRISON; DIAMOND, 2017) or for the evaluation of new vaccines and antivirals. C57BL/6 mice immunized with the Ad5. ZIKV-Efl expressing ZIKV Ectodomain from protein E showed a high production of neutralizing antibodies and partial protection (50%) in seven-day-old pups after virulent ZIKV intraperitoneal challenge (KIM et al., 2016). The DNA plasmid vaccine (ZIKV M-E protein) proposed by LAROCCA and collaborators (2016) have similar results. This vaccine induces production of neutralizing antibodies on C57BL/6, Balb/c and SJL mice and complete protection against challenge after a single dose of vaccine. Neutralizing antibodies were also obtained after immunization of C57BL/6 mice with a vaccine based on another adenovirus vector (Pard et al., 2017). A Nanoparticle-replicon-based vaccine was able to induce the production of anti-protein E specific IgG and a CD8+ T response on immunized mice (CHAHAL et al., 2017).

After the immunization protocol, the ELISA results showed production of total IgG and IgG1 anti-ZIKV in NP+ZIKV immunized mice. The immunized mice were infected with ZIKV and eight days after infection it was observed significant antibodies levels on NP+ZIKV and ZIKV_IN groups. This result is essential to strengths the adjuvant potential of the BSA nanoparticles described in previous studies (SILVA et al., 2018, SOUZA et al., 2008). Silva and colleagues (2018) showed that mice immunized with recombinant non-structural protein 1 (rNS1) from *Dengue virus 1* and BSA-NPs showed a high seroconversion rate if compared to animals immunized only with rNS1. The same pattern was observed in this study since NP+ZIKV immunized mice showed a more significant antibody production. Besides the considerable expression of antibodies in the NP+ZIKV immunized mice, it was necessary to verify if these antibodies could have neutralizing activity.

Neutralizing antibodies have essential roles in the protection against infection by many flaviviruses. These antibodies are the main responsible for the immunity of licensed YFV and tick-borne encephalitis virus (TBEV) vaccines (ZHAO et al., 2016). Several antibodies recognize conformational domains on ZIKV E protein have been described (FERNANDEZ; DIAMOND, 2017). STETTLER et al. (2016) showed that antibodies against domain I and II (EDI/EDII) of ZIKV E protein had a modest or no neutralizing activity. However, antibodies against domain III of this same protein (EDIII) or conformational epitopes on infectious virus had a high neutralization activity. These antibodies are good therapeutic agent candidates due to a high neutralizing activity and also due to the reduction of tissue pathology, placental and fetal infection and mortality in infected mice (STETTLER et al. 2016).

Besides the importance of C57BL/6 mice to evaluate new vaccine platforms, no disease signs and none to few viral RNA were detected in tissues of wild-type C57BL/6, BALB/c or CD-1 mice infected with African and Asian ZIKV isolates, including strains from French Polynesia, Brazil or Puerto Rico (ROSSI et al., 2016). Biochemical analysis showed that ZIKV NS5 protein promotes degradation of human STAT2 (a transcription factor involved in type I IFN receptor signaling) (GRANT et al., 2016). The lack of a functional STAT2 leads to an inhibition of type-I interferon production and downstream signaling. However, ZIKV NS5 did not promote degradation of mouse STAT2 (GRANT et al., 2016), which may explain why immunocompetent strains of mice are generally resistant to ZIKV infection (MORRISON; DIAMOND 2017). Therefore, several groups evaluated the capacity of mice with innate immune deficiencies to support ZIKV replication and disease (MORRISON; DIAMOND 2017). Mice (A129 and C57BL/6) lacking the type I Interferon receptor (*Ifnar1*) after subcutaneous, intraperitoneal, or intravenous inoculation of different strains developed a severe disease with clinical symptoms such as hind limb weakness, paralysis and death, (ROSSI et al., 2016).

Therefore, BSA-NPs mixed with inactivated ZIKV can induce anti-ZIKV antibodies. This result indicates that BSA-NPs has a biotechnological relevance to the rational design of vaccine formulations based on albumin nanocarriers. However, future studies should be carried out to evaluate the neutralizing activity of these

antibodies and also to verify the potential of this formulation to induce a protective response in an animal model of ZIKV infection.

REFERENCES

ABBINK P.A. L. et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science**, Cambridge, v. 353, n. 6304, p. 1129–1132, 2017.

AKAGI, T.; BABA, M.; AKASHI, M. Biodegradable nanoparticles as vaccine **adjuvants and delivery systems** : regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. **Polymers in Nanomedicine**, Japan, v. 247, p. 31–64, 2012.

BARZON, L. et al. Zika virus: from pathogenesis to disease control. **FEMS Microbiology Letters**, Wrexham, v. 363, n. 18, p. 1–17, 2016.

BRADLEY, M. P.; NAGAMINE, C. M. Animal models of Zika virus. **Comparative Medicine**, Maryland, v. 67, n. 3, p. 242–252, 2017.

CAMPOS, L.T. et al. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. **International Journal of Genomics**, London, v. 2018, p. 1–9, 2018.

CHAHAL, J. S. et al. An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8+ T cell responses in a mouse model. **Scientific Reports**, England v. 7, n. 1, p. 252, 2017.

CHAMPION, J. A.; KATARE, Y. K.; MITRAGOTRI, S. Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. **Journal of Controlled Release**, Japan, v. 121, p. 3–9, 2007.

CHAN, J. F. W. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: an unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, United Kingdom, v. 72, n. 5, p. 507–524, 2016.

CHOW, E. K.; HO, D. Cancer nanomedicine : from drug delivery to imaging. **Bioengineering**, United Kingdom, v. 5, n. 216, p. 1–12, 2013.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The immunology of Zika Virus. **F1000Research**, United Kingdom, v. 7, p. 203, 2018.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotech**, United Kingdom, v.2 , p. 469–478, 2007.

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

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, Netherlands, v. 161, n. 1, p. 38–49, 2012b.

FERNANDEZ, E.; DIAMOND, M. S. Vaccination strategies against Zika virus. **Current Opinion in Virology**, Netherlands, v. 23, p. 59–67, 2017

FRANCIS, G. L. Albumin and mammalian cell culture : implications for biotechnology applications. **Cytotechnology**, Netherlands, v. 62, p. 1–16, 2010.

GRANT, A. et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. **Cell**, United States, p. 882–890, 2016

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, United States, v. 89, n. 17, p. 8880-8896, 2015.

HONDA, K. et al. Studies on thermal aggregation of BSA as a drug carrier. **Chem. Pharm. Bull**, Japan, v. 48, p. 464–466, 2000.

IVERSEN, T. G.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. **Nano Today**, Netherlands, v. 6, n. 2, p. 176–185, 2011.

JAMALI, M. S. R. et al. Zika virus: a review of literature. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Netherlands, v. 6, n. 12, p. 989–994, 2016.

JITHAN, A. V et al. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. **Int J Pharm Investig**, China, v. 1, n. 2, p. 119–125, 2011.

KIM, E. et al. Preventative Vaccines for Zika Virus Outbreak: Preliminary Evaluation. **EbioMedicine**, Netherlands, v. 13, p. 315–320, 2016.

KOUCHAKZADEH, H.; SAFAVI, M. S. Efficient delivery of therapeutic agents by using targeted albumin nanoparticles. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, Netherlands, v. 98, p. 121-143, 2015.

LANGER, K. et al. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. **Int J Pharm**, China, v. 347, p. 109–117, 2008.

LAROCCA, R. A. et al. Vaccine protection against zika virus from Brazil. **Nature**, United Kingdom, v. 536, n. 7617, p. 474–478, 2016.

LARSEN, M. T. et al. Albumin-based drug delivery : harnessing nature to cure disease. **Molecular and Cellular Therapies**, United States, p. 1–12, 2016.

MANOLOVA, V. et al. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. **European Journal of Immunology**, United Kingdom, v. 38, n. 5, p. 1404–1413, 2008.

MOGHADAM, S. R. J. et al. Zika virus: A review of literature. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Netherlands, v. 6, n. 12, p. 989-994, 2016.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Nigeria, v. 8, n. 5, p. 561–573, 2006.

MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **Journal of virology**, United States, v. 91, n. 8, p. 9-17, 2017.

MÜLLER, J. A. et al. Inactivation and environmental stability of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, United States, v. 22, n. 9, p. 1685–1687, 2016.

NIKOLAY, A. et al. Propagation of brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using vero and BHK cells. **Vaccine**, Netherlands, v. 36, n. 22, p. 3140–3145, 2018.

NITTA, S., NUMATA, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tis-sue. **Int. J. Mol. Sci**, Switzerland, v,14, 1629–1654, 2013.

PARDI, N. et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. **Nature reviews Drug discovery**, United Kingdom, v. 17, n. 4, p. 261–279, 2017.

PETERSEN, E. et al. Rapid spread of Zika virus in the americas - implications for public health preparedness for mass gatherings at the 2016 Brazil olympic games. **International Journal of Infectious Diseases**, Netherlands, v. 44, p. 11–15, 2016.

PITAKSUTTEEPONG, T. Nanoparticles : a vaccine adjuvant for subcutaneous administration. **Naresuan University Journal**, Thailand, v. 13, n. 2, p. 53–62, 2005.

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

RICHNER, J. M. et al. Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. **Cell**, United States, v. 170, n. 2, p. 273–283, 2018.

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

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

SHAN, C. et al. Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine. **ACS Infectious Diseases**, United States, v. 2, n. 3, p. 170–172, 2016.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural biology of the Zika virus. **Trends in Biochemical Sciences**, Netherlands, v. 25, p. 1–14, 2017.

SHUAIB, W. et al. Re-emergence of Zika virus: a review on pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention. **AMJMED**, United States, v. 129, n.8, p. 879, 2016.

SILVA, E. F. et al. A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice. **Journal of Nanobiotechnology**, United Kingdom, v. 10, n. 1, p. 13, 2012.

SILVA, N. I. O. et al. Bovine serum albumin nanoparticles induce histopathological changes and inflammatory cell recruitment in the skin of treated mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, France, v. 107, p. 1311–1317, 2018

SINGH, M. et al. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. **Expert Rev Vaccines**, United Kingdom, v. 6, n.5, p. 797–808, 2007.

SOUZA M. M. S. et al. Serum albumin nanoparticles vaccine provides protection against a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge. **Vaccine**, Netherlands, v. 36, n. 43, p. 6408–6415, 2018.

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

STETTLER, K. et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, United States, v. 353, n. 6301, p. 823-826, 2016.

STORP, B. V. et al. Albumin nanoparticles with predictable size by desolvation procedure. **J Microencapsul**, United Kingdom, v. 29, n. 2, p. 138–146, 2012.

SUMATHY, K. et al. Protective efficacy of Zika vaccine in AG129 mouse model. **Nature Publishing Group**, United Kingdom, v.7, p. 1–9, 2017.

TANABE, K. et al. Receptor sorting and actin dynamics at early endosomes. **Communicative & integrative biology**, United States, v. 4, n. 6, p. 742–744, 2011.

TERZIAN, A.C.B. et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Sci Rep**, United Kingdom, v.8, p.16034, 2018.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle – cell interactions. **Small**, Germany n. 1, p. 12–21, 2010.

VOIGT, J.; CHRISTENSEN, J.; SHASTRI, V. P. Differential uptake of nanoparticles by endothelial cells through polyelectrolytes with affinity for caveolae. **PNAS**, United States, v, 111, n. 8, p. 2942-2947, 2014.

WANG, Z. et al. Prevention of vascular inflammation by nanoparticle targeting of adherent neutrophils. **Nature Nanotechnology**, United Kingdom, v. 9, n. 3, p. 204–210, 2014.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology and prospects for control. **Antiviral Research**, Netherlands, v. 130, p. 69–80, 2016.

YEON, J. et al. Preparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 127, n. 4, p. 1892–1898, 2011.

YU, Z. et al. Bovine serum albumin nanoparticles as controlled release carrier for local drug delivery to the inner ear. **Nanoscale Res Lett**, Germany, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2014.

YUN, S.-I.; LEE, Y.-M. Zika virus: An emerging flavivirus. **Journal of Microbiology**, South Korea, v. 55, n. 3, p. 204–219, 2017.

ZHANG, H. et al. Origin, dissemination and entry of the pandemic Zika viruses **Sci. Bull**, Netherlands, v. 61, n.10, p. 749–751, 2016.

ZANLUCA, C.; DOS SANTOS, C. N. D. Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, Netherlands, v. 18, n. 5, p. 295–301, 2016.

ZOLNIK, B. S. et al. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. **Endocrinology**, United States, v. 151, n. 2, p. 458–465, 2010.

ANEXO

Aprovação da Comissão de Ética ao Uso de Animais (CEUA-UNIFAL)
Processo 12/2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de plataformas vacinais experimentais contra o Zika vírus utilizando nanopartículas de albumina sérica", registrada com o nº 12/2016, sob a responsabilidade de Luiz Felipe Leomil Coelho – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em reunião de 23/06/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 23/06/2016 a 01/06/2018	
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico	
Nº de animais	50	
Sexo	Fêmea	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 27 de junho de 2016.

Estela Regina de Oliveira

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira
 Coordenadora CEUA-UNIFAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICATE

We hereby certify that the proposal entitled "Evaluation of experimental vaccine platforms against Zika virus using bovine serum albumin nanoparticles", registration number 12/2016, under the responsibility of Luiz Felipe Leomil Coelho, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research, is in compliance with Law no. 11794, published on October 8th, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15th, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas) on 06/02/2016.

Purpose: () Teaching	(X) Scientific research
Expiration date	06/01/2018
Species/strain/breed	Swiss mouse / Outbred
Number of animals	50
Sex	Female
Origin	Central Vivarium UNIFAL-MG

Alfenas, June 27, 2016.

Estela Regina de Oliveira, PhD
 CEUA/UNIFAL Coordinator

Zimbra

copesq@unifal-mg.edu.br

Resposta à emenda do processo CEUA 12-2016.

De : Leonardo Augusto de Almeida
<leonardo.almeida@unifal-mg.edu.br>

Sex, 19 de mai de 2017 16:49

Assunto : Resposta à emenda do processo CEUA
12-2016.

Para : Luiz Felipe Leomil Coelho
<luiz.coelho@unifal-mg.edu.br>,
Coordenação de Pesquisa <copesq@unifal-
mg.edu.br>, Comissão de Ética no Uso de
Animais <ceua@unifal-mg.edu.br>

Prezado Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho,

A emenda solicitada ao projeto sob a sua coordenação, registrado sob o nº 12/2016, intitulado "Avaliação de plataformas vacinais experimentais contra Zika vírus utilizando nanopartículas de albumina sérica", foi avaliada na reunião ordinária de Maio de 2017 e o parecer da aprovação da mesma ficou pendente devido a alguns quesitos apresentados pelos membros da CEUA-UNIFAL. Para a sua aprovação a CEUA, em cumprimento ao disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), solicita:

1) Uma vez que já foram utilizados 36 camundongos dos 50 solicitados, os resultados obtidos até o momento serão descartados? O aumento do número amostral da mesma linhagem seria muito maior para obtenção dos resultados previstos nos objetivos propostos?

Informamos que o prazo máximo para atendimento às solicitações é de 60 dias, a contar do recebimento do Parecer. Após este prazo, o processo será considerado retirado. Para projetos retirados, ao interesse do pesquisador, novo protocolo deverá ser aberto e reiniciado o processo de registro na CEUA.

Colocamo-nos a disposição para eventuais dúvidas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG

--

Prof. Dr. Leonardo A. Almeida

Zimbra

<https://webmail.unifal-mg.edu.br/h/printmessage?id=55362&tz=Am...>

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG

--

Prof. Dr. Leonardo A. Almeida
Prof. Adjunto - Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Universidade Federal de Alfenas - Campus Sede
Ramal: (+55 35) 3299-1351
