

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MAYRA AMORELI DA SILVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE  
ALBUMINA SÉRICA BOVINA CONTENDO POLI (I:C) NA INDUÇÃO DE  
RESPOSTA IMUNE UTILIZANDO DOSES REDUZIDAS DO VÍRUS VACCINIA  
ANKARA MODIFICADO**

**ALFENAS/MG**

**2026**

**MAYRA AMORELI DA SILVEIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE  
ALBUMINA SÉRICA BOVINA CONTENDO POLI (I:C) NA INDUÇÃO DE  
RESPOSTA IMUNE UTILIZANDO DOSES REDUZIDAS DO VÍRUS VACCINIA  
ANKARA MODIFICADO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela  
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Microbiologia e Parasitologia  
aplicadas às Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho

**ALFENAS/MG**

**2026**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Silveira, Mayra Amoreli da.

Avaliação do potencial adjuvante de nanopartículas de albumina sérica bovina contendo Poli(I:C) na indução de resposta imune utilizando doses reduzidas do vírus Vaccinia Ankara Modificado / Mayra Amoreli da Silveira.  
- Alfenas, MG, 2026.

74 f. : il. -

Orientador(a): Luiz Felipe Leomil Coelho.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Adjuvante. 2. Nanopartículas. 3. Vacinas. 4. Poxvírus. 5. MVA. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil, orient. II. Título.

**MAYRA AMORELI DA SILVEIRA**

**"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE DE NANOPARTÍCULAS DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA CONTENDO POLI (I:C) NA INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE UTILIZANDO DOSES REDUZIDAS DO VÍRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO"**

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 23 de março de 2026.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira  
Instituição: Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira  
Instituição: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 24/03/2026, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1753494** e o código CRC **ACD7A184**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me permitir realizar este sonho. Se não fosse por Ele eu nunca conseguiria. “Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre! Amém.” Romanos 11:36

Aos meus pais Ricardo e Maura por toda paciência e incentivo, e por sempre acreditarem em mim mesmo quando nem eu mesma acreditava. Vocês são os meus maiores exemplos de esforço, dedicação e fé.

Aos meus irmãos Matheus e Marcela, meus melhores amigos que sempre estão ao meu lado, e à toda minha família por todo apoio e torcida.

À minha família na fé representada pelos meus pastores Gustavo e Paula, minha célula e todos da Comunidade Fonte da Vida. Vocês foram essenciais nesta fase da minha vida. Muito obrigada pelas orações, conselhos e compreensão.

Ao meu orientador, professor Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, por ter me dado o privilégio de ser sua orientada. Obrigada por ter me confiado um projeto tão relevante, por todos os ensinamentos e por ter me introduzido no mundo da pesquisa. Serei eternamente grata. A todos do Laboratório de Vacinas, em especial Raíne e Ana. Obrigada por tudo que me ensinaram desde o começo, quando eu ainda não dominava as técnicas do laboratório. Obrigada por toda paciência e carinho. Hoje posso dizer que ganhei mais que colegas, mas amigas que levarei para toda a vida. Um agradecimento especial também à Maju, Sandro, Gabi, Anna Clara, Gustavo, Bárbara e Júlia por toda ajuda e companheirismo.

Às minhas amigas Mônica e Débora. Obrigada pela amizade, por sempre acreditarem em mim e por sonharem junto comigo.

À minha amiga Poliana, por ter me incentivado a entrar nesta pós-graduação, por toda ajuda e apoio desde o início.

Aos professores Dra. Carine Ervolino de Oliveira e Dr. Denismar Alves Nogueira pelas colaborações tão importantes na histopatologia e análises estatísticas. Obrigada pela paciência e contribuições.

À professora Dra. Giliane Trindade, Pedro Henrique e Débora do Laboratório de Vírus da UFMG, por toda ajuda com os ensaios de PRNT, contribuições que enriqueceram muito este trabalho.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade de adquirir conhecimentos e me desenvolver em um ambiente acadêmico saudável e com uma ótima estrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPEMIG,  
CNPq e INCT-POX pelo auxílio financeiro.

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

## RESUMO

A família *Poxviridae* compreende vírus de DNA capazes de infectar humanos e animais, incluindo agentes etiológicos de doenças de grande relevância, como a Variola e a Mpox. Embora a varíola tenha sido erradicada, outras doenças causadas por poxvírus permanecem sendo ameaças à saúde pública mundial. O *Orthopoxvirus monkeypox* (MPXV) tem provocado surtos em diferentes regiões, inclusive fora do continente africano, reforçando a necessidade de estratégias vacinais eficazes para conter possíveis emergências globais. Entre as vacinas disponíveis, o vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) destaca-se por sua segurança, mas sua atenuação reduz a imunogenicidade, exigindo doses mais altas ou múltiplas. A disponibilidade global do MVA é limitada, concentrando-se em países de alta renda, o que dificulta respostas rápidas em emergências de saúde pública. Diante dessas limitações, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias capazes de aumentar a imunogenicidade do MVA e, ao mesmo tempo, reduzir custos e a necessidade de grandes volumes de produção. Uma alternativa promissora é o uso de nanopartículas como adjuvantes vacinais. As nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA), quando associadas ao ácido poliinosínico:policitidílico (poli(I:C)), um RNA sintético de fita dupla que simula infecções virais, têm demonstrado efeito adjuvante. Neste estudo, avaliou-se o efeito adjuvante das NPPI associadas ao MVA. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com doses de MVA em concentrações variadas ( $10^5$  a  $10^7$ ), na presença ou ausência das nanopartículas, e posteriormente desafiados com o *Orthopoxvirus vaccinia*. Resultados indicam que as NPPI potencializam a resposta imunológica e protetora induzida pelo MVA em doses menores, demonstrado principalmente através do aumento da produção de anticorpos neutralizantes, diminuição de sinais clínicos e perda de peso e menor grau de injúria pulmonar dos animais infectados. Sendo assim, o uso das NPPI em vacinas baseadas no MVA representa uma estratégia promissora diante de emergências em saúde pública e da limitação de antígenos em larga escala.

Palavras-chave: MVA; adjuvante; nanopartículas.

## ABSTRACT

The *Poxviridae* family comprises DNA viruses that are able to infect humans and animals, including etiological agents of major public health relevance, such as smallpox and mpox. Although smallpox has been eradicated, other poxvirus-associated diseases continue to be considered a global health threat. *Orthopoxvirus monkeypox* (MPXV) has caused outbreaks in multiple regions, including areas outside the African continent, reinforcing the need for effective vaccination strategies to prevent potential global health emergencies. Among available vaccines, the Modified Vaccinia Ankara virus (MVA) stands out for its favorable safety profile; however, its high level of attenuation results in reduced immunogenicity, requiring higher doses or multiple administrations. In addition, global MVA availability remains limited and largely restricted to high-income countries, hindering rapid responses during public health emergencies. Therefore, developing strategies that enhance MVA immunogenicity while reducing production costs and antigen requirements is essential. A promising approach involves the use of nanoparticles as vaccine adjuvants. Bovine serum albumin (BSA) nanoparticles associated with polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)), a synthetic double-stranded RNA that mimics viral infection, have demonstrated adjuvant activity. In this study, we evaluated the adjuvant effect of poly(I:C)-loaded BSA nanoparticles (NPPI) combined with MVA. C57BL/6 mice were immunized with varying doses of MVA ( $10^5$  a  $10^7$ ) in the presence or absence of nanoparticles and subsequently challenged with *Orthopoxvirus vaccinia*. The results indicate that NPPI enhances the immune and protective responses induced by MVA at lower doses, primarily evidenced by increased neutralizing antibody production, reduced clinical signs and body weight loss, and decreased pulmonary injury in infected animals. Thus, the use of NPPI in MVA-based vaccines represents a promising strategy for addressing public health emergencies and overcoming limitations related to large-scale antigen availability.

Keywords: MVA; adjuvant; nanoparticles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Morfologia dos poxvírus.....	13
Figura 2 – Ciclo de replicação viral dos poxvírus.....	15
Figura 3 – Representação esquemática do esquema de imunização utilizando MVA na dose $1 \times 10^7$ UFF na presença e ausência das NPPI.....	31
Figura 4 – Representação esquemática do esquema de imunização utilizando MVA nas doses $1 \times 10^6$ e $1 \times 10^5$ UFF na presença e ausência das NPPI e posterior desafio com VACV.....	32
Figura 5 – Análise das NPPI por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
Figura 6 – As NPPI não interferem na capacidade de infecção do MVA em cultura de células BHK-21.....	39
Figura 7 – Produção de anticorpos IgG anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA e atividade neutralizante para VACV avaliada através de teste de redução de placas (PRNT) em camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA na dose $1 \times 10^7$ UFF.....	42
Figura 8 – Produção de anticorpos IgG anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA e atividade neutralizante para VACV avaliada através de teste de redução de placas (PRNT) em camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas.....	45
Figura 9 – Percentual de sobrevivência após infecção com VACV-WR dos camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em protocolos de imunização baseados em doses baixas.....	46
Figura 10 – Peso dos camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em protocolos de imunização baseados em doses baixas e desafiados com VACV-WR.....	47
Figura 11 – Avaliação dos sinais clínicos dos camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em protocolos de imunização baseados em doses baixas desafiados com VACV-WR.....	48
Figura 12 – Análise titulação viral dos pulmões de camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas e desafiados com VACV-WR.....	49
Figura 13 – Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas e desafiados com VACV-WR.....	50
Figura 14 – Histopatologia dos pulmões de camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas e desafiados com VACV-WR.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização das NPPI .....	37
--	----

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

× g (força)	Força gravitacional relativa
μL	Microlitros
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COVID-19	Doença causada pelo coronavírus 2019
D.O.	Densidade óptica
DLS	Técnica de Dispersão Dinâmica de Luz
DMEM	Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA
g (massa)	Gramas
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
kpb	Pares de bases kilobase
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitros
MOI	Multiplicidade de infecção
MPXV	<i>Orthopoxvirus monkeypox</i>
MVA	Vaccinia Ankara modificado
nm	Nanômetros
NP	Nanopartícula
NPPI	Nanopartículas de BSA contendo poli(I:C)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	PBS contendo 0,05% de Tween 20
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
Poli(I:C)	Ácido poliinosínico-policitidílico
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas
rMVA	MVA recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto

SFB	Soro fetal bovino
T.A	Temperatura ambiente
UFF	Unidades formadoras de foco
UFP	Unidades formadoras de placa
VACV	<i>Orthopoxvirus vaccinia</i>
VACV-WR	cepa Western Reserve do <i>Orthopoxvirus vaccinia</i>
VARV	<i>Orthopoxvirus variola</i>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1.	POXVÍRUS.....	16
<b>2.1.1.</b>	<b>Morfologia e genoma viral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Ciclo de multiplicação .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Doenças causadas por Poxvírus.....</b>	<b>20</b>
2.1.3.1.	Variola.....	20
2.1.3.2.	Mpox (Variola dos macacos).....	21
2.1.3.3.	Vaccinia Bovina.....	22
2.2.	PREVENÇÃO.....	23
<b>2.2.1.</b>	<b>Vaccinia Ankara modificado .....</b>	<b>24</b>
2.2.1.1.	Desafios para o aumento da imunogenicidade do MVA .....	25
2.3.	ADJUVANTES.....	26
2.4.	NANOPARTÍCULAS.....	28
<b>2.4.1.</b>	<b>Nanopartículas de BSA contendo poli(I:C).....</b>	<b>28</b>
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
4.1.	OBJETIVO GERAL .....	31
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>5.</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>32</b>
5.1.	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE BSA CONTENDO POLI(I:C) (NPPI).....	32
5.2.	PRODUÇÃO E TITULAÇÃO DO VÍRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO (MVA) E <i>Orthopoxvirus vaccinia</i> (VACV) – WESTERN RESERVE (WR).....	33
5.3.	ANÁLISE DA INFECÇÃO DO MVA EM CÉLULAS BHK-21 NA PRESENÇA DAS NPPI .....	34
5.4.	IMUNIZAÇÃO .....	34
5.5.	DESAFIO .....	36
5.6.	ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-MVA, ANTI-VACV E ANTI-BSA .....	37
5.7.	TITULAÇÃO VIRAL DOS PULMÕES .....	37
5.8.	HISTOPATOLOGIA .....	38

5.9.	TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA (PRNT) PARA VACV UTILIZANDO SOROS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM DIFERENTES DOSES DE MVA NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DAS NPPI...	39
5.10.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	40
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
6.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE BSA CONTENDO POLI I:C (NPPI).....	41
6.2.	ANÁLISE DA INFECÇÃO DO MVA EM CÉLULAS BHK-21 NA PRESENÇA DAS NPPI .....	42
6.3.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-MVA, ANTI-VACV E ANTI-BSA E ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA VACV EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM MVA NA PRESENÇA DE NPPI .....	44
6.4.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-MVA, ANTI-VACV E ANTI-BSA E ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA VACV EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM NPPI NA PRESENÇA DO MVA EM PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO BASEADOS EM DOSES BAIXAS .....	47
6.5.	INFECÇÃO COM VACV-WR DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM NPPI NA PRESENÇA DO MVA EM PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO BASEADOS EM DOSES BAIXAS .....	50
6.6.	ANÁLISE DE TITULAÇÃO VIRAL DOS PULMÕES DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM MVA EM DOSES BAIXAS NA PRESENÇA DAS NPPI, APÓS INFECÇÃO COM VACV-WR.....	53
6.7.	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM MVA EM DOSES BAIXAS NA PRESENÇA DAS NPPI, APÓS INFECÇÃO COM VACV-WR.....	54
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXO A - TABELA DE REGISTRO DE MONITORAMENTO DO ANIMAL APÓS PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA NECESSIDADE DO PONTO FINAL HUMANITÁRIO .....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A família *Poxviridae* abrange vários vírus causadores de doenças importantes ao longo da história, como o *Orthopoxvirus variola* (VARV) (agente causador da varíola), o *Orthopoxvirus monkeypox* (MPXV), o *Orthopoxvirus cowpox* (CPXV) e o *Orthopoxvirus vaccinia* (VACV) (Domingos *et al.*, 2023; Tiecco *et al.*, 2022). Esses Poxvírus continuam sendo relevantes para a saúde pública, sendo que o VACV e o CPXV permanecem circulando de forma endêmica e com potencial emergente, principalmente em países em desenvolvimento. O VARV, mesmo já tendo sido erradicado, é foco de pesquisa em biodefesa e o MPXV pode provocar surtos esporádicos de zoonoses em humanos, com quadros clínicos similares à varíola (Tiecco *et al.*, 2022).

O MPXV, causador da Mpox (anteriormente denominada varíola dos macacos), surgiu como uma nova ameaça, quando o mundo mal tinha se recuperado da pandemia da COVID-19. Havia uma preocupação de que a volta desta doença fosse tratada com negligência (Zumla *et al.*, 2022). Entre as poxviroses, é a zoonose considerada mais relevante em humanos desde a erradicação da varíola, pois tem a capacidade de provocar doença letal em diversas espécies animais, incluindo roedores, esquilos, cães da pradaria, primatas não humanos e humanos (Paran; Sutter, 2009).

Diante desta realidade, a necessidade da prevenção se torna determinante e a forma mais eficiente de prevenir qualquer doença viral é a vacinação (Shchelkunova; Shchelkunov, 2022). Dentre as vacinas para Poxvírus já utilizadas, a vacina baseada no isolado Vaccinia Ankara modificado (MVA) revelou-se uma alternativa útil para produção de vacinas com alta segurança e que provoca uma resposta imune protetora aos humanos (Reina; Iglesias, 2023). Esta segurança acontece em consequência de muitas passagens seriadas em cultura celular, o que fez o MVA perder uma parte considerável do genoma parental e ter a deleção de muitos genes. Entretanto, devido a esta modificação genômica considerável, para alcançar proteção imunológica, é necessário administrar doses elevadas ou múltiplas de MVA, em comparação com outras vacinas contra a varíola. (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015).

Assim sendo, a importância de aumentar a imunogenicidade das vacinas contra Poxvírus é algo incontestável, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, que podem apresentar uma resposta vacinal reduzida e maior risco de formas graves de infecções por *Orthopoxvirus* (CDC, 2025). Uma estratégia para se alcançar este objetivo, é o uso dos adjuvantes vacinais,

que poderão contribuir para a proteção dessa população. Com as novas candidatas a vacinas buscando cada vez mais a segurança, mas conseqüentemente perdendo imunogenicidade, os adjuvantes se tornarão cada vez mais necessários (O'Haggan; De Gregorio, 2009). Existe uma gama de adjuvantes eficazes à disposição há algum tempo, porém o que realmente se busca são adjuvantes que unam eficácia e segurança (O'Haggan; De Gregorio, 2009).

Estudos revelaram a utilidade de nanopartículas associadas a BSA como potenciais plataformas vacinais (Silva *et al.*, 2012). As nanopartículas em questão são facilmente preparáveis, biodegradáveis e altamente aceitáveis, especialmente devido à capacidade da matriz de albumina de incorporar uma variedade de compostos (Hu *et al.*, 2006). A produção de nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) — um RNA sintético de fita dupla empregado experimentalmente como um modelo para infecções virais *in vivo* — já provou ser uma alternativa adjuvante de resultado satisfatório (Fortier *et al.*, 2004; Piva-Amaral *et al.*, 2024).

Portanto, diante dessas informações, o objetivo deste trabalho será avaliar se as nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) têm a capacidade de elevar a imunogenicidade das vacinas para Poxvírus, especialmente o MVA. Como consequência, este estudo irá contribuir com a saúde pública, pois se provada a presente hipótese, haverá uma maior eficiência da vacinação, gerando uma resposta imune mais robusta contra doenças causadas por Poxvírus e uma proteção mais eficaz à população, principalmente à parcela de pessoas mais vulneráveis e imunocomprometidas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. POXVÍRUS

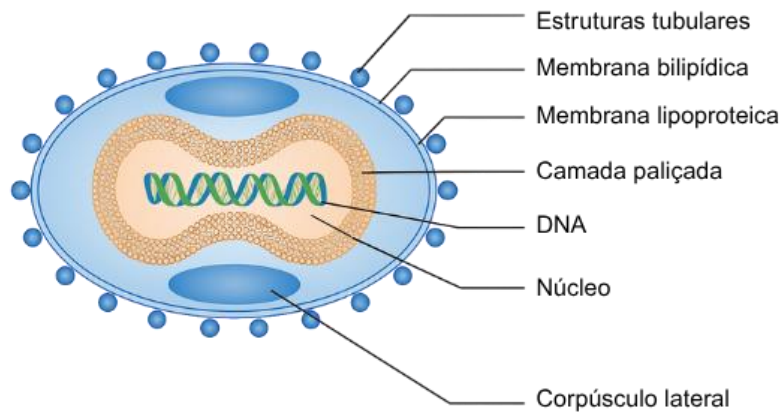
Poxvírus são vírus de DNA grandes e envelopados que se multiplicam no citoplasma das células de hospedeiros animais, vertebrados ou invertebrados (Moss, 2013; Tiecco *et al.*, 2022). Eles pertencem à família *Poxviridae*, que por sua vez possui uma subfamília de Poxvírus de vertebrados chamada *Chordopoxvirinae*. Esta subfamília contém oito gêneros, dentre eles o *Orthopoxvirus*, onde estão classificados os vírus da varíola, varíola bovina, vaccinia e Mpox, que também podem infectar humanos (Espy *et al.*, 2002). Os *Orthopoxvirus* causadores de zoonose são encontrados em sua maioria em animais que convivem com humanos (vacas, búfalos, camelos, macacos etc.). Estes humanos atuam como hospedeiros intermediários do vírus, já que outros animais selvagens costumam ser seu reservatório natural (Shchelkunova; Shchelkunov, 2022).

#### 2.1.1. Morfologia e genoma viral

Os Poxvírus são grandes partículas virais em forma de tijolo que variam de tamanho, podendo ter 220 a 450 nm de comprimento e 140 a 260 nm de largura (Espy *et al.*, 2002). Estas partículas são formadas por quatro partes principais: cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope (Fenner *et al.*, 1988).

O material genético viral é envolto pelo núcleo, que pode ter a forma bicôncava, unilateral côncava ou cilíndrica e é revestido intimamente pela camada denominada de paliçada. Nas duas regiões laterais do núcleo há uma massa oval chamada de corpúsculo lateral, que atua como plataforma de entrega de proteínas virais liberadas no citoplasma após a entrada do vírus, contribuindo para a modulação precoce da resposta antiviral do hospedeiro (Bidgood *et al.*, 2022). Uma membrana lipoproteica envolve o núcleo e os corpúsculos laterais. Por fim, os membros da família *Poxviridae* são envoltos por uma membrana constituída por uma camada dupla lipídica, possuindo muitas estruturas tubulares ou globulares, com uma conformação estrutural helicoidal ou difusa, cuja função e composição química ainda estão pouco definidas (Fenner *et al.*, 1988; Li *et al.*, 2022).

Figura 1 – Morfologia dos Poxvírus



Fonte: Adaptado de Li *et al.*, 2022.

O genoma do Poxvírus é constituído por uma molécula de DNA dupla fita linear com o tamanho variando de 130 kbp a 230 kbp. Em suas regiões terminais estão conectadas as duas cadeias de DNA que formam uma cadeia polinucleotídica contínua. Nestas regiões terminais são encontradas sequências idênticas com orientações contrárias ricas em A-T (Moss, 2013; Gubser *et al.*, 2004).

Segundo Gubser *et al.* (2004), a organização geral do genoma da subfamília *Chordopoxvirus* é conservada, com a região central codificando proteínas mais conservadas entre as diferentes espécies e envolvidas na síntese de RNA e DNA, processamento de proteínas, montagem de vírions e proteínas estruturais. Já os genes codificados por regiões terminais são menos conservados entre diferentes gêneros de *Chordopoxvirus*, espécies dentro de um gênero e até mesmo isolados da mesma espécie. Muitos desses genes são dispensáveis para o crescimento viral *in vitro* e codificam proteínas que influenciam no espectro de hospedeiros, na virulência ou na interação com o sistema imune do hospedeiro (Gubser *et al.*, 2004; Pickup, 2015). É válido enfatizar que a expressão gênica nos Poxvírus é regulada temporalmente, portanto a replicação do DNA é o marco que divide as fases precoces e tardias. Vários promotores e fatores virais e celulares servem para se chegar esta divisão temporal e otimizar a produção da progênie viral (Broyles, 2003).

### 2.1.2. Ciclo de multiplicação

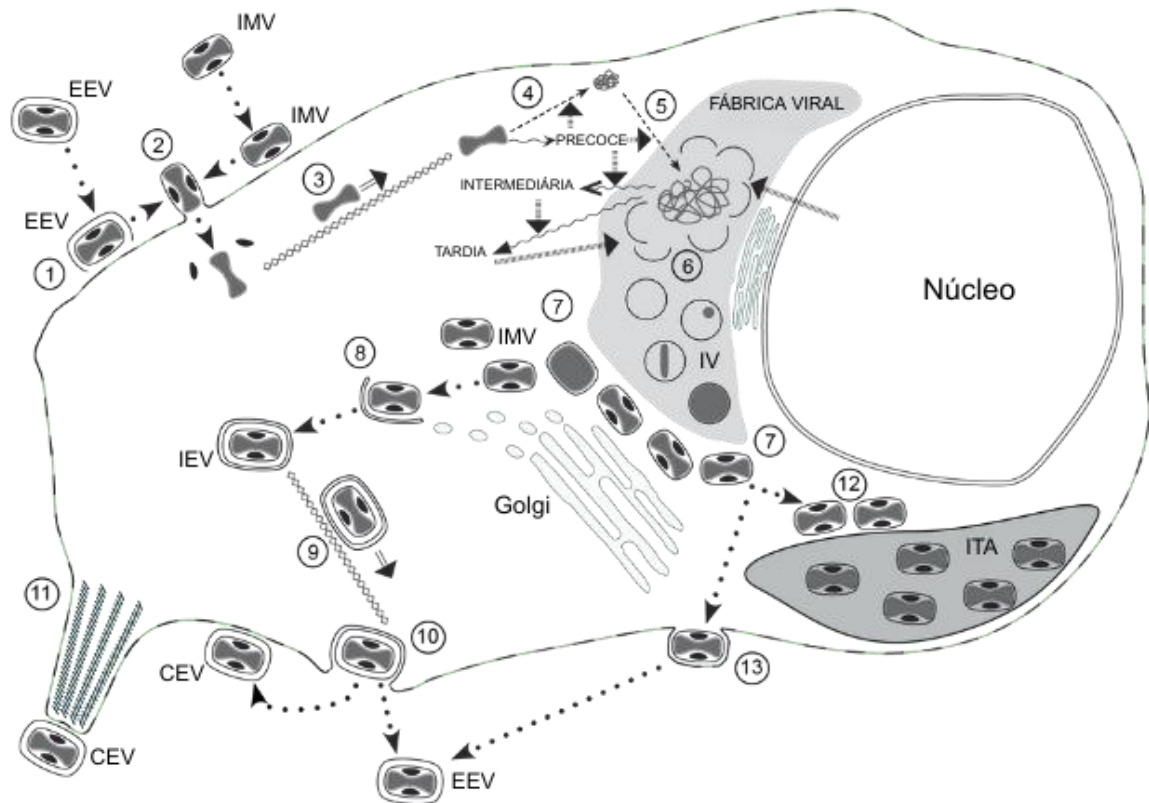
A multiplicação dos Poxvírus é diferente da maioria dos vírus DNA, que geralmente se multiplicam no núcleo, pois acontece no citoplasma da célula hospedeira. É um processo controlado em grande parte por fatores codificados pelo vírus, o que lhe atribui uma autonomia replicativa em relação à célula hospedeira (Andrade, 2012).

A infecção inicia-se com a adsorção da partícula viral (vírion) à superfície celular. (Vida, 2008) e posterior fusão do vírion e das membranas celulares de mamíferos (McFadden, 2005). Dois tipos distintos de partículas virais infecciosas, o vírus maduro intracelular (IMV) e o vírus envelopado extracelular (EEV), podem dar início ao ciclo infeccioso. Os IMV e EEV diferenciam-se em suas glicoproteínas de superfície e no número de membranas envolventes, e considera-se que penetram nas células por mecanismos diferentes. Após a ligação, o evento de fusão entre o vírion e as membranas da célula hospedeira ainda é pouco compreendido (McFadden, 2005).

A multiplicação viral é caracterizada por três séries temporais de transcrição de mRNA viral e síntese de proteínas, denominadas precoce, intermediária e tardia, seguidas pela morfogênese de partículas infecciosas. O IMV é transportado através de microtúbulos e é envolto, dependendo do gênero Poxvírus, com uma membrana derivada de Golgi, cisternas endossômicas ou membrana plasmática (Moss, 2015) se referindo agora como vírus envelopado intracelular (IEV). O IEV é transportado para a periferia celular para formar o vírus envelopado associado à célula (CEV), que é exocitado da célula por polimerização da cauda de actina ou é liberado para formar EEV livre. O EEV também pode se formar por brotamento direto do IMV, evitando assim a forma IEV. (Moss, 2015; McFadden, 2005).

Além dessas rotas, em infecções por certos *Orthopoxvirus*, como o *Orthopoxvirus cowpox*, IMVs podem ser incorporados em grandes inclusões citoplasmáticas do tipo A (ITAs). Essas estruturas são ricas em uma proteína viral chamada ATI<sub>p</sub> e podem proteger a infectividade das partículas após a lise celular, atuando como reservatório ambiental para transmissão (Howard; Moss, 2012).

Figura 2 – Ciclo de replicação viral dos Poxvírus



Fonte: adaptado de McInnes *et al.*, 2023.

Legenda: Ciclo infeccioso dos poxvírus. O ciclo infeccioso dos Poxvírus, baseado principalmente no VACV, apresenta as seguintes etapas: (1) após a ligação do vírus envelopado extracelular (EEV) aos receptores na superfície celular, ocorre a ruptura do envelope externo, expondo o vírus maduro intracelular (IMV); (2) o IMV, nu ou exposto, funde-se diretamente à membrana plasmática por meio do complexo de fusão, liberando o núcleo viral e os corpos laterais; (3) o nucleocapsídeo é transportado ao longo dos microtúbulos até a região perinuclear; (4) onde ocorre a expressão dos genes precoces, produzindo proteínas que promovem o desnudamento (5), a replicação do DNA e a expressão gênica intermediária; (6) proteínas codificadas pelos genes intermediários, em conjunto com proteínas do hospedeiro, regulam a expressão gênica tardia, que inclui proteínas estruturais e proteínas para morfogênese e enzimas essenciais para etapas tardias; (7) membranas singulares em formação envolvem as proteínas virais e o DNA viral, formando o vírus imaturo (IV), que amadurece em IMV; (8) estes são transportados ao compartimento trans-Golgi/endossomal para receber um envelope duplo, originando o vírus envelopado intracelular (IEV); (9) o IEV é conduzido até a superfície celular por microtúbulos; (10) sofre exocitose, perdendo a membrana externa para formar o EEV; (11) o EEV pode permanecer associado à célula como vírus envelopado associado à célula (CEV) ou ser liberado no meio extracelular, sendo que o CEV pode ser impulsionado por projeções induzidas por actina para longe da célula; (12) alguns IMV podem ser incorporados ao corpo de inclusão tipo A (ITA); (13) nos Avipoxvírus, a formação de IEV é pouco significativa, e a produção de EEV ocorre por transporte do IMV até a membrana plasmática, onde ocorre brotamento e liberação celular.

### 2.1.3. Doenças causadas por Poxvírus

Existem quatorze gêneros de Poxvírus que infectam vertebrados e quatro que infectam insetos. Geralmente membros do mesmo gênero são semelhantes antígenicamente, morfológicamente e com relação à gama de hospedeiros que podem infectar (Riccardo; Pablo, 2023). O gênero *Orthopoxvirus* da família *Poxviridae* inclui espécies patogênicas humanas, como o *Orthopoxvirus variola* (VARV) e algumas zoonoses, como o *Orthopoxvirus monkeypox* (MPXV), *Orthopoxvirus cowpox* (CPXV), *Orthopoxvirus camelpox* (CMLV) e *Orthopoxvirus vaccinia* (VACV). (Shchelkunova; Shchelkunov, 2022). O gênero *Orthopoxvirus* é o mais estudado, pois abrange patógenos humanos importantes. Dentre as espécies deste gênero, destaca-se o VARV pelo que esse vírus representa na história da humanidade e da medicina (Riccardo; Pablo, 2023) e o MPXV, que causou surto em 2022 e foi declarado emergência de saúde global pela OMS (Tiecco *et al.*, 2022).

#### 2.1.3.1. Variola

Riccardo e Pablo (2023, p.1) afirmam que “o VARV é o agente etiológico da varíola, doença altamente contagiosa com taxa de mortalidade superior a 30% que matou centenas de milhões de pessoas”. Sua transmissão acontece por via respiratória ou através de lesões cutâneas ou nas mucosas. A sintomatologia mais comum envolve febre, dor de cabeça, vômito e erupções cutâneas (Breman, 2021; Sossai *et al.*, 2023).

A Varíola já foi uma das doenças infecciosas mais importantes epidemiologicamente para humanos, até sua erradicação. Em torno de 400 milhões de pessoas morreram acometidos da doença em menos de 80 anos no século XX, quando a vacinação em massa e medidas de saúde pública intensivas contra a varíola foram implementadas (Shchelkunova; Shchelkunov, 2022).

Antes da descoberta da vacinação, foi observado que indivíduos que se recuperaram da varíola, identificados facilmente por causa de cicatrizes, não voltavam a desenvolver a doença. Desta observação surgiu uma técnica chamada variolação, que consistia em assoprar crostas secas de varíola diretamente no nariz de uma pessoa saudável (Riccardo; Pablo, 2023).

Após o método da variolação, a pessoa desenvolvia uma versão leve da doença e se tornava imune a ela permanentemente. Houve na prática um saldo de cerca de 1% a 2% das pessoas varioladas que vieram a óbito. Mesmo assim, a variolação se espalhou pelo mundo e

começou a ser praticada na Europa no século XVIII. Só então no ano de 1796, Edward Jenner, inspirado nesse método, descobriu a vacinação. De uma forma mais segura, ele constatou que a infecção com um CPXV (vírus da varíola bovina) relacionado e menos virulento fazia com que os indivíduos ficassem imunes à varíola. Essa descoberta deu início à vacinação contra a varíola e a erradicação desta nos EUA e na Europa no início do século XX (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015; Riccardo; Pablo, 2023) e no mundo em 1980 (Organização Mundial da Saúde, 2025).

#### 2.1.3.2. Mpox (Varíola dos macacos)

O *Orthopoxvirus monkeypox* (MPXV) é responsável por uma infecção em humanos que é parecida clinicamente com a varíola discreta e na minoria dos casos pode levar à morte. Em maio de 2022, centenas de casos de MPXV foram descritos de mais de 30 países (Shchelkunova; Shchelkunov, 2022; Tiecco *et al.*, 2022; Grüner *et al.*, 2024).

Entre os casos relatados de 1970 a 2022 observou-se que os homens são mais susceptíveis à Mpox do que as mulheres, especialmente homens que mantêm relações sexuais com outros homens e que possuem em média 30 anos de idade. Os sintomas mais comuns incluem erupções cutâneas, dispnéia, sepse, úlceras gastrointestinais, na boca e na garganta, febre, linfadenopatia e ceratite. Esses sinais podem durar de duas a quatro semanas, mas sua progressão varia entre os indivíduos acometidos pela doença (Karagoz *et al.*, 2023).

Em 1970 foi relatado pela equipe do Instituto de Preparações Virais de Moscou, o primeiro caso de Mpox em humanos, durante a análise da amostra clínica de uma criança infectada no Zaire (atual República Democrática do Congo, RDC). A pesquisa revelou que o Mpox humano é uma doença esporádica rara advinda da transmissão animal-humano do MPXV em regiões de floresta tropical da África Central e Ocidental. Diversas espécies animais africanas são reservatórios naturais do MPXV, especialmente roedores (Shchelkunova; Shchelkunov, 2022).

O surto de Mpox no ano de 2022 em países anteriormente não endêmicos foi causado principalmente pela transmissão entre humanos através do contato sexual, com pessoas com HIV (Grüner *et al.*, 2024; G, Tiecco *et al.*, 2022). Até o presente momento, a transmissão da Mpox entre humanos tem sido atrelada ao contato direto e íntimo com feridas infecciosas, crostas ou fluidos corporais de um indivíduo infectado (Tiecco *et al.*, 2022).

### 2.1.3.3. Vaccinia Bovina

No ano de 1980 a Variola foi declarada erradicada após um programa de vacinação em massa utilizando o VACV (Essbauer; Pfeffer; Meyer, 2010; Organização Mundial da Saúde, 2025). Já no final da década de 1990, foram relatados episódios de infecção zoonótica atribuídos a diferentes linhagens do VACV, conhecidos por surtos de Vaccinia Bovina, envolvendo rebanhos de bovinos leiteiros e trabalhadores rurais que tiveram contato com esses animais, localizados principalmente na região sudeste do Brasil (Essbauer; Pfeffer; Meyer, 2010; Miranda *et al.*, 2017).

Embora no Brasil o VACV também circule entre roedores, marsupiais e primatas não humanos, bovinos e seres humanos permanecem como os hospedeiros epidemiologicamente mais relevantes. Isso se deve ao fato de que o gado atua como um amplificador viral, uma vez que elimina o vírus pelo leite e pelas fezes, favorecendo sua transmissão para humanos e outros animais domésticos (E Silva *et al.*, 2025). Observa-se maior frequência da infecção em homens com idade entre 18 e 31 anos, os quais nasceram após a interrupção da vacinação contra a varíola e, conseqüentemente, não foram imunizados. (E Silva *et al.*, 2025; Sant'Ana *et al.*, 2013).

Em todos os surtos descritos houve o registro de casos de humanos infectados, caracterizados principalmente pelo desenvolvimento de lesões cutâneas dolorosas nas mãos e nos dedos, além de acometimento de outras regiões do corpo, como pescoço e face. Alguns quadros clínicos incluem sintomas sistêmicos como sudorese, anorexia e linfadenomegalia. (Sant'Ana *et al.*, 2013). Quando comparada a outras doenças vesiculares zoonóticas, a infecção por VACV apresenta manifestações clínicas mais graves e sistêmicas em humanos, principalmente naqueles com exposição direta a bovinos infectados (Sant'Ana *et al.*, 2013).

Atualmente a infecção por VACV é considerada negligenciada pelo Brasil, não sendo incluída na lista de doenças de notificação compulsória nacionalmente. Sendo assim, a análise epidemiológica deste vírus no país é prejudicada, uma vez que os casos de Vaccinia Bovina são subnotificados (E Silva *et al.*, 2025).

## 2.2. PREVENÇÃO

Após a erradicação da Variola, a vacinação foi descontinuada (Kuehn, 2022; Sun *et al.*, 2024), logo, grande parte da população mundial no momento não tem imunidade à variola ou a outras zoonoses causadas por *Orthopoxvirus* (Sun *et al.*, 2024).

Foi demonstrado que vacinas baseadas em VACV têm a capacidade de estimular anticorpos protetores cruzados contra outros *Orthopoxvirus* e podem ser usadas como base para vacinas recombinantes. Sabendo que pessoas com menos de 45 anos atualmente não estão protegidas contra o VACV, o uso potencial de *Orthopoxvirus* como armas biológicas é motivo de preocupação em âmbito global (Tiecco *et al.*, 2022).

Durante o século 20 diversas vacinas contra a variola foram desenvolvidas, todas elas com base no vírus vaccínia e com características biológicas distintas. Essas vacinas continham vírus replicantes ativos e competentes, e as pessoas que eram imunizadas com elas reagiam de formas variadas (Reina; Iglesias, 2023).

Dentre as vacinas de primeira geração, a Dryvax®, da cepa New York City Board of Health (NYCBH), estava entre as vacinas mais utilizadas e era considerada muito segura em comparação com outras cepas. A produção das vacinas de primeira geração diminuiu conforme o curso da erradicação da variola, até que em 1978 a produção da Dryvax® foi interrompida (Reina; Iglesias, 2023). Durante a década de 1990, com o risco iminente da utilização do VACV como arma de bioterrorismo, foram retomados os estudos para melhorar a segurança e imunogenicidade da Dryvax®. Destes estudos, a vacina de segunda geração ACAM2000 foi desenvolvida. É uma vacina viva atenuada que foi aprovada pelo FDA em agosto de 2007 no lugar da antiga vacina Dryvax®. Ela é indicada para imunização contra variola humana para pessoas em situações vulneráveis a contrair a doença, como médicos e enfermeiros que têm contato com pacientes infectados com a Mpox, que tenham acima de 18 anos de idade e que sejam imunocompetentes. Não é indicada para pessoas imunocomprometidas, gestantes ou lactantes. (Reina; Iglesias, 2023; CDC, 2022).

Outra vacina derivada da cepa NYCBH é a Aventis Pasteur (APSV). É uma vacina com replicação competente experimental. Seria utilizada em situações de emergência, em que houvesse falta da ACAM2000 (Islam *et al.*, 2022; CDC, 2022).

Finalmente, compondo as vacinas de terceira geração contra a variola, o vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) torna-se a versão mais segura e eficaz em termos de resposta imune dentre todas as opções vacinais, pois é deficiente em replicação, porém induz uma intensa

resposta imune contra a varíola (Reina; Iglesias, 2023; CDC, 2022). Além de sua aplicação no controle das doenças causadas pelos poxvírus, o MVA vem sendo amplamente explorado como plataforma para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra diversos patógenos, destacando-se como um dos vetores virais mais promissores existentes (Altenburg *et al.*, 2014).

### **2.2.1. Vaccinia Ankara modificado**

O vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) é um isolado de VACV gerado na Alemanha na década de 1960, sendo esse altamente atenuado e adaptado a fibroblastos de embriões de galinha (Beddingfield *et al.*, 2024; Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015). Durante extensas passagens seriadas em cultura celular, o MVA perdeu quase 15% do genoma parental da cepa VACV Ankara (CVA). Como resultado desta drástica modificação genômica evolutiva, o MVA perdeu a capacidade de se replicar em células de mamíferos. Por não possuir esta habilidade, o MVA seria um possível imunizante seguro para pessoas impossibilitadas fisiologicamente de receber a vacinação de rotina contra a varíola (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015).

Atualmente o MVA é utilizado pelo Instituto Estatal de Vacinas da Baviera (Bavarian Nordic, Hellerup, Dinamarca) para a produção industrial de vacinas contra a varíola. A vacina Jynneos®, também chamada de Imvamune, Imvanex ou MVA-BN, é uma vacina viva atenuada e não replicante de vetor viral produzida com base na modificação genética do vírus vaccinia Ankara-Bavarian Nordic (cepa MVA-BN) (Reina; Iglesias, 2023).

A vacina MVA-BN tem se mostrado segura em humanos e gera respostas imunes robustas e duráveis. A capacidade de concentrar ao mesmo tempo vários componentes genéticos diferentes a torna um candidato ideal para uma plataforma vacinal (Beddingfield *et al.*, 2024). É uma vacina completamente segura e imunogênica, por este motivo é indicada para pessoas imunocomprometidas (Orlova *et al.*, 2022). Allard *et al.* (2024) também demonstram resultados observacionais que indicam que uma dose da MVA-BN, administrada pelo menos 14 dias antes da data inicial da infecção, está associada com doença menos sintomática e menos extensa entre os casos de Mpox.

Em junho de 2025, a Organização Mundial da Saúde publicou um documento técnico que considera o uso de dose fracionada intradérmica da MVA-BN em cenários de escassez vacinal, como medida temporária. O documento mostra que a aplicação da dose reduzida pela via intradérmica é segura e tão imunogênica quanto a utilização da dose completa por via

subcutânea. Entretanto, ainda assim, a OMS enfatiza a importância de coletar mais dados sobre a segurança, efetividade e duração da resposta imunológica nessas condições (Organização Mundial da Saúde, 2025).

Nos últimos anos, o rMVA foi utilizado como vetor em muitas construções vacinais em pesquisas clínicas e pré-clínicas. Podemos mencionar as principais, sendo elas: Papiloma vírus humano; síndrome respiratória por Coronavírus; vírus da imunodeficiência humana; vírus Ebola; *Influenza virus*; Citomegalovírus, vírus da hepatite B; vírus da hepatite C; *Plasmodium falciparum*, além de atuar no controle da malignidade de tumores. (Remy-Ziller *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2013; Knudsen *et al.*, 2015; Munseri *et al.*, 2015; Zhou & Sullivan, 2015; Mullin *et al.*, 2016; La Rosa *et al.*, 2017; Cavanaugh *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2013; Parra *et al.*, 2015; Walsh *et al.*, 2013 *apud* Oliveira, 2019). García-Arriaza e Esteban (2014) afirmam que o uso de esquemas vacinais heterólogos baseados em MVA recombinante associado a diferentes vetores, como vírus influenza recombinante, adenovírus, vetores de DNA ou outras cepas de Poxvírus, revelou-se uma estratégia eficiente para reduzir a resposta imune anti-vetor e, principalmente, conferir proteção contra diferentes patógenos.

#### 2.2.1.1. Desafios para o aumento da imunogenicidade do MVA

Muitos estudos têm demonstrado o MVA como uma vacina atenuada contra a varíola, capaz de induzir respostas de anticorpos muito próximas da vacina Dryvax®, como também proteção em camundongos e primatas não humanos. Porém, são necessárias altas doses ou doses múltiplas do MVA para conferir proteção imunológica, em comparação a outras vacinas contra a varíola, como a Dryvax®. Somado a isso, o MVA necessita de vários genes imunomoduladores do VACV envolvidos na evasão das respostas imunes do hospedeiro, como receptores solúveis para IFNs tipo I e II, citocinas e quimiocinas, que se não fossem requeridos, uma melhor apresentação antigênica e imunogenicidade seriam conquistadas (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015).

Seguramente, a deleção de genes de evasão imune inata provoca um aumento de citocinas pró-inflamatórias e migração de células imunes, que têm grande influência na diminuição de imunidade adaptativa (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015). Esta diminuição na imunidade foi evidente nos estudos de Russell e Tschärke (2014), que constataram uma resposta 2,5 vezes inferior em porcentagem de TCD8<sup>+</sup> comparada à cepa Western Reserve, e 5 vezes comparando o número de células ativadas no baço. Existe também o interesse em combinar

vetores com adjuvantes conhecidos ou novos, a fim de aumentar ou modular ainda mais as respostas imunes provocadas (Rollier *et al.*, 2011).

### 2.3. ADJUVANTES

Os adjuvantes vacinais são componentes que são somados aos antígenos vacinais para torná-los mais imunogênicos (O'Hagan; De Gregório, 2009; Vrieling *et al.*, 2019). Por isso, os adjuvantes são elementos de grande importância para a maioria das vacinas que obtiveram êxito, principalmente as compostas por subunidades de patógenos, incluindo frações isoladas dos patógenos mortos, ou antígenos recombinantes (O'Hagan; Valiante, 2003).

Entre os adjuvantes mais utilizados atualmente está o Alúmen (ou sais de alumínio), que faz parte de produtos licenciados no mundo todo há mais de 50 anos. O segundo adjuvante mais utilizado é a emulsão óleo em água MF59, que tem sido licenciado há mais de uma década em mais de 20 países (O'Hagan; De Gregório, 2009; Pulendran; Arunachalam; O'Hagan, 2021). Os sais de alumínio, considerados adjuvantes de primeira geração, oferecem antígenos às células imunes e aumentam a persistência do antígeno no local da injeção. Em certos casos, esses efeitos têm mostrado a capacidade de induzir uma resposta imune protetora duradoura em humanos (O'Hagan; De Gregório, 2009; Vrieling *et al.*, 2019). Já antígenos pouco imunogênicos, como as proteínas recombinantes, são na maioria das vezes incapazes de induzir uma resposta imune protetora com adjuvantes de primeira geração e podem necessitar da adição de um potencializador imunológico (O'Hagan; De Gregório, 2009).

Os imunopotencializadores atuam através da ativação de receptores imunes inatos utilizados por células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas, que captam e apresentam antígenos para as células T) para detectar padrões moleculares associados a patógenos. Realmente grande parte dos potenciadores imunológicos conhecidos, como lipopolissacarídeos (LPS), flagelina ou Dipeptídeo de Muramil (MDP), são produtos microbianos. Outros, como oligonucleotídeos CpG e poli I:C, são imitadores de DNA bacteriano e RNA viral (O'Hagan; De Gregório, 2009).

Uma limitação dos sais de alumínio é a menor eficácia na indução de respostas contra patógenos intracelulares. Adjuvantes de nova geração, que combinam sais de alumínio com imunoestimulantes que favorecem respostas Th1, como o 3-O-desacil-4-monofosforil lipídio A (MPLA), têm sido desenvolvidos para superar essa limitação. O MPLA direciona a resposta imune para um fenótipo Th1, elevando a liberação de IFN- $\gamma$  por células T CD4 (Zhu *et al.*,

2021). Varma *et al.*, (2022) afirma que o adjuvante AS04 (combinação dos sais de alumínio com MPLA) promoveu uma resposta imune superior quando comparado ao alúmen isolado, provavelmente devido à sua capacidade de aumentar o recrutamento e a ativação de células imunes, levando à indução de uma forte resposta imune inata e, posteriormente, adaptativa.

Adjuvantes agem fortalecendo a resposta imunológica das vacinas ao ativar a imunidade inata e gerar sinais essenciais para a resposta adaptativa. Esses sinais envolvem a apresentação de antígenos por moléculas MHC em células apresentadoras de antígenos e a expressão de moléculas coestimulatórias e citocinas inflamatórias, que juntos ativam linfócitos T *naïve* e potencializam respostas imunes específicas. Além disso, sistemas de entrega, como nanopartículas lipídicas, polímeros biodegradáveis e nanopartículas proteicas, facilitam a apresentação eficiente dos antígenos e podem direcioná-los às células B, melhorando a produção de anticorpos. Do ponto de vista prático, a inclusão de adjuvantes permite uma menor dose de antígeno na vacina, amplia a resposta imune, possibilita a formulação de vacinas combinadas, e aumenta a eficácia vacinal em populações com resposta imunológica comprometida, como idosos, crianças e imunossuprimidos. Além disso, eles aceleram a proteção e prolongam a memória imunológica, aumentando a duração e qualidade da resposta vacinal (O'Hagan; De Gregório, 2009; Zhao *et al.*, 2023).

Vários fatores, como a carga e o tamanho do adjuvante e do antígeno influenciam na capacidade de adsorção de um antígeno vacinal. Além de influenciar sobre a capacidade de adsorção de antígenos, o tamanho de partículas de adjuvantes particulados também é um parâmetro determinante para a resposta imune (Vrieling *et al.*, 2019). Baranov *et al.*, (2021) relatam que cristais de hidroxiapatita menores que 1–2  $\mu\text{m}$  promoveram uma liberação de TNF- $\alpha$  mais significativa por macrófagos primários humanos cultivados quando comparados com partículas de 6 e 14  $\mu\text{m}$ , e supostamente isso aconteceu em decorrência da ativação mais eficiente do inflamossomo. De igual modo, o tamanho das partículas também é de grande importância quando se trata do processamento dos antígenos para ativação de células T, já que proteínas que atuam como antígenos ligados a nanopartículas de PLGA se mostraram mais eficientes em estimular a apresentação cruzada de MHC-I em comparação com partículas de tamanho micrométrico em células dendríticas cultivadas (Baranov *et al.*, 2021). Um dos fatores que tem dificultado o desenvolvimento de novos e aprimorados adjuvantes tem sido a segurança, pois as vacinas que serão usadas em indivíduos saudáveis precisarão induzir o mínimo possível de efeitos adversos para serem aceitas para uso (O'Hagan; Valiante, 2003).

## 2.4. NANOPARTÍCULAS

Os nanomateriais são materiais com unidades estruturais básicas, como grãos, partículas, fibras ou outros elementos menores que 100 nm, em ao menos uma dimensão. Eles podem ser compostos de metais, cerâmicas, polímeros, materiais orgânicos e suas combinações, assim como os materiais estruturados convencionais ou microestruturados. Compreendidos nos nanomateriais estão nanopartículas, nanoclusters, nanocristais, nanotubos, nanofibras, nanofios, nanobastões, nanofilmes (Zhang; Webster, 2009).

As nanopartículas (NPs) têm por definição partículas com uma dimensão que alterna entre 1 e 100 nm e que possuem variadas características dependendo de seu tamanho e funcionalidades de superfície. Por serem de tamanho reduzido e possuírem grande área de superfície, as NPs têm sido utilizadas com frequência em vários nichos, como cosméticos, eletrônicos e aplicações médicas diagnósticas e terapêuticas (Najahi-Missaoui *et al.*, 2020).

Na área médica, as NPs são utilizadas como carreadores de fármacos contribuindo em diagnósticos e terapias. Estas NPs, dentre elas NPs poliméricas, nanoemulsões, lipossomas e NPs sólidas, são apontadas como aplicações clínicas em grande potencial de uso. O sucesso da sua aplicabilidade depende de múltiplos parâmetros, como suas propriedades físico-químicas, eficiência de carregamento do fármaco, liberação do fármaco e, sobretudo, baixa ou nenhuma toxicidade do próprio carreador. (Najahi-Missaoui *et al.*, 2020).

### 2.4.1. Nanopartículas de BSA contendo poli(I:C)

A albumina sérica é uma proteína natural, conseqüentemente é biocompatível, biodegradável e atóxica (Ambrósio *et al.*, 2020). É a proteína mais abundante no plasma de mamíferos, constituindo aproximadamente 60% das proteínas plasmáticas (Bukackova; Marsalek, 2020). A albumina é composta por diversos sítios de ligação inespecíficos, tornando possível a ligação de compostos bioativos hidrofílicos e hidrofóbicos de forma relativamente inespecífica (Ambrósio *et al.*, 2020).

É uma molécula utilizada com frequência como modelo proteico para revelar sua interação com nanopartículas carregadas ou na liberação de fármacos direcionados (Bukackova; Marsalek, 2020). Também é escolhida como modelo proteico em razão da sua relevância médica, vasta disponibilidade, baixo custo, facilidade de purificação, propriedades incomuns de ligação ao ligante, estabilidade e pelo fato de albuminas de soro humano e bovino

serem proteínas homólogas (Hu *et al.*, 2006). É sabido que nanopartículas de BSA servem como um sistema competente para a liberação de fármacos e antígenos (Piva-Amaral *et al.*, 2024) e dentre as inúmeras possibilidades de combinações com nanopartículas de BSA, Piva-Amaral *et al.* (2024) atestaram uma adição de poli(I:C) com as nanopartículas de BSA (NPPI) obtendo uma combinação de função adjuvante eficaz.

O ácido poliinosínico-policitidílico (poli(I:C)) é um RNA sintético de fita dupla, formado por um homopolímero de ácido poliinosínico combinado a um homopolímero de ácido policitidílico, resultando em uma dupla hélice estável (Guo *et al.*, 2022; Fortier *et al.*, 2004). Ele mimetiza a infecção viral ao ativar receptores de reconhecimento de padrão antiviral, como o receptor *Toll-like 3* (TLR3) endossomal e os receptores citoplasmáticos *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) e *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5), desencadeando assim duas vias antivirais distintas: uma mediada pelo eixo TLR3/Src/STAT1, que leva à apoptose celular, e outra mediada por MDA5/RIG-I/IRF3, que promove a expressão imunoadjuvante de interferon beta (IFN- $\beta$ ). Essa ativação induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias e desencadeia uma cascata inflamatória semelhante à resposta viral. Assim, o poli(I:C) desempenha um papel importante nas respostas antivirais e imunomoduladoras (Guo *et al.*, 2022; Fortier *et al.*, 2004; Palchetti *et al.*, 2013).

Cassano *et al.*, (2018) mostraram que ao serem expostas a poli(I:C), macrófagos inflamatórios e células tronco mesenquimais tiveram aumentos na modulação da proliferação de células T em ambas as situações, indicando que utilizar poli(I:C) como estímulo isolado resulta similarmente ao efeito de um microambiente inflamatório sobre as células tronco mesenquimais.

O poli(I:C) vem sendo frequentemente estudado em combinação com outros compostos e proteínas com potencial adjuvante, como o Monofosforil lipídio A (Ahn; Le; Ko, 2021), nanopartículas catiônicas de  $\alpha$ -D-glucanas derivadas do milho, conhecidas como Nano-11 (Hernandez-Franco *et al.*, 2022) e albumina sérica bovina (Piva-Amaral, 2023).

Vieira-Júnior (2021) constatou que o tratamento de células dendríticas com nanopartículas de BSA associadas a poli(I:C) provocou um aumento da expressão de IFN- $\beta$  e CD40. Adicionado a este achado, foi observado um aumento de infiltrado inflamatório na derme de animais inoculados com essa formulação. Conclui-se então que nanopartículas contendo BSA associadas a poli(I:C) em sua formulação têm função adjuvante e imunoestimulante e consequentemente podem ser boas opções de adjuvantes para compor formulações vacinais. (Vieira-Junior, 2021).

### 3. JUSTIFICATIVA

O vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) é uma variante altamente atenuada do *Orthopoxvirus vaccinia*, e é, portanto, utilizada como vetor viral seguro em vacinas. Ele é amplamente utilizado em vacinas para prevenir infecção por Poxvírus em humanos, demonstrando eficácia na indução de resposta imune protetora.

Apesar das vantagens, ainda existem desafios, como a necessidade de aumentar a quantidade de doses disponíveis para prover imunização do maior número de pessoas no menor tempo possível, principalmente em um contexto de emergência global. Nesse cenário, a Organização Mundial da Saúde tem recomendado de forma excepcional, o uso de dose fracionada por via intradérmica da vacina MVA-BN como estratégia de economia de doses, com o objetivo de promover uma maior cobertura vacinal durante surtos. Nota-se que após a erradicação da varíola e a interrupção da vacinação em massa, houve uma redução da imunidade populacional contra os *Orthopoxvirus*, o que tem sido associado à emergência e reemergência de zoonoses, como a Mpox, surtos recorrentes de Vaccínia Bovina no Brasil e casos de *Orthopoxvirus cowpox* (CPXV) na Europa.

A busca por novos adjuvantes, substâncias adicionadas às vacinas para potencializar a resposta imune, é necessária. Nanopartículas têm sido investigadas como adjuvantes devido às suas propriedades únicas, oferecendo controle preciso da entrega de antígenos e induzindo respostas imunes mais robustas.

Neste contexto, este trabalho avaliou a utilização de nanopartículas miméticas a patógenos cuja matriz é composta de albumina sérica bovina e ácido poliinosínico-policidílico, um análogo de RNA viral. Sendo assim, o objetivo desse trabalho, será avaliar o uso destas nanopartículas quanto a sua capacidade de estimular a imunogenicidade das vacinas compostas por Poxvírus atenuados, considerando situações de utilização de doses baixas de imunização.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito adjuvante de nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) com relação a imunogenicidade de vacinas para *Orthopoxvirus* atenuados utilizando o MVA como modelo de estudo.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar *in vitro* se as nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) interferem na capacidade infectiva do MVA;
- b) Avaliar se as nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) otimizam a resposta imune anti-poxvirus induzida por doses baixas de MVA;
- c) Avaliar se as nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) associadas a doses baixas de MVA conferem proteção clínica contra a infecção por poxvirus.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE BSA CONTENDO POLI(I:C) (NPPI)

As nanopartículas produzidas são compostas de BSA pelo método de dessolvatação e têm em sua matriz incorporado o poli(I:C) e foram sintetizadas conforme descrito por Amaral e colaboradores (2024). Foram utilizados 200  $\mu$ L de uma solução aquosa estéril de poli(I:C) (Sigma-Aldrich) a 5 mg/mL e 1 mL de solução aquosa estéril de BSA a 1% e essa solução foi mantida sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a etapa de dessolvatação, que consiste na adição de álcool etílico absoluto gota a gota sob agitação. Após a formação da nanopartícula contendo poli(I:C), foi realizada a ligação cruzada através da adição de 4  $\mu$ L de glutaraldeído a 25%. A solução foi mantida sob agitação magnética por 2 horas à temperatura ambiente (T.A.). Ao término do tempo necessário para promover a ligação cruzada, as NPPI foram transferidas para tubos de 1,5 mL estéreis e submetidas à centrifugação a 10000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em tampão fosfato-salino (PBS) na concentração de 10 mg/mL. Todos os procedimentos descritos foram realizados em cabine de segurança biológica classe II A2. O potencial Zeta, o diâmetro médio e o índice de polidispersão da amostra foram determinados pela Técnica de Dispersão Dinâmica de Luz (DLS – Malvern Instruments Ltda Zeta sizer Nano ZS – Reino Unido) no Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos da UNIFAL-MG. A morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura no Centro de Microscopia da UFMG.

A taxa de encapsulamento do poli I:C foi determinada pela quantificação do poli(I:C) solúvel através de espectrofotometria (NanoDrop™), por meio da comparação entre a concentração de poli (I:C) livre presente no sobrenadante após a produção das NPPI e aquela obtida na solução inicial de BSA e poli(I:C), antes da adição de etanol.

## 5.2. PRODUÇÃO E TITULAÇÃO DO VÍRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO (MVA) E *Orthopoxvirus vaccinia* (VACV) – WESTERN RESERVE (WR)

O MVA foi produzido, purificado e titulado no Centro de Tecnologia de Vacinas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) conforme Lourenço *et al.* (2025). Após produção, esse vírus foi encaminhado ao Laboratório de Vacinas da UNIFAL-MG e imediatamente congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A cepa inicial de VACV-WR foi obtida pelo Laboratório de Vírus da UFMG. Com o objetivo de replicação da mesma, foi realizada uma diluição em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem soro fetal bovino (SFB) em um MOI de 0,01 e inoculado 2mL do vírus diluído em uma garrafa média de cultura contendo monocamada de células VERO. A garrafa foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  por uma hora, movimentando a placa a cada 10 minutos. Após isso, completou-se o volume para 10mL com DMEM 1% SFB e incubado novamente por mais 48 horas. Passado esse período, ao ser observado 90% de efeito citopático, o sobrenadante foi removido e a monocamada foi raspada com auxílio de raspador de células estéril. Então, adicionou-se 2mL de DMEM e as células infectadas foram submetidas a três ciclos de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongelamento em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  para liberação do vírus. Feito isso, o lisado foi centrifugado por cinco minutos a  $600 \times g$  em  $4^{\circ}\text{C}$  e congelado o sobrenadante a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para a titulação do VACV, foram preparadas diluições seriadas do vírus, de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  em DMEM 0% de SFB. Em seguida, o meio de duas placas de 6 poços contendo monocamada de células VERO foi removido e adicionado 350uL de cada diluição nos poços, sendo que um poço de cada placa foi inoculado com apenas DMEM sem SFB como controle de células. As placas foram incubadas por uma hora, movimentando-as a cada 10 minutos. Posteriormente o volume de cada poço foi completado para 2mL com DMEM 1% SFB e as placas foram incubadas novamente. Passadas 48 horas de incubação, o meio dos poços foi descartado, foi feita a fixação com formaldeído a 10% e coloração com cristal violeta. Removido o excesso de cristal violeta dos poços e lavado em água corrente, foi feita então a contagem das placas de lise.

### 5.3. ANÁLISE DA INFECÇÃO DO MVA EM CÉLULAS BHK-21 NA PRESENÇA DAS NPPI

Para este ensaio, foram preparadas diluições seriadas do MVA nas concentrações de  $10^{-3}$  a  $10^{-10}$  em DMEM 0% SFB e adicionado as NPPI nas concentrações de 1,0 e 0,1mg/mL. As soluções foram incubadas a 37°C por 30 minutos, agitando a cada 10 minutos. Após a incubação, foi retirado o meio DMEM 1% SFB dos poços da placa de 24 poços contendo células BHK-21 com 90% de confluência e os volumes dos tubos transferidos, para a monocamada de células. A placa foi incubada a 37°C, por 2 horas, agitando a cada 15 minutos. Após este período, foi retirado o inóculo e adicionado 2ml de DMEM 1% SFB em cada poço e incubado a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas.

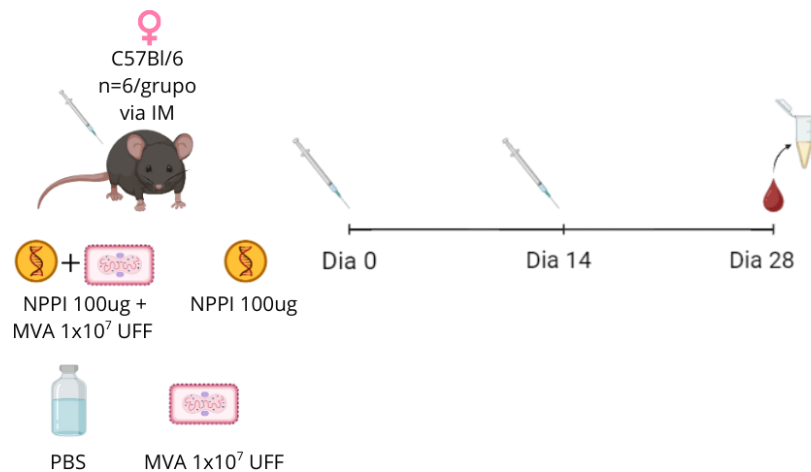
Após 48 horas de incubação, o meio foi removido dos poços e as células fixadas com solução de metanol/acetona 1:1 por 20 minutos em T.A. Feito isso, a solução de fixação foi removida e a monocamada lavada com 2ml de PBS em cada poço. Para a quantificação das unidades formadoras de foco (UFF), foram adicionados a cada poço 125ul por poço de anticorpo anti-VACV AB35219 (Analítica, 5mg/mL), diluído na proporção 1:250 em PBS contendo 3% de SFB e a placa foi incubada por uma hora em T.A. Retirado o anticorpo primário e lavada a monocamada com PBS, foi adicionado o anti-coelho conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), diluído em 1:500 em PBS com 3% de SFB. A placa ficou incubada por 1 hora a T.A. e após o tempo, foi retirado o anticorpo secundário. A monocamada foi novamente lavada com PBS e então foram adicionados 500ul por poço de SIGMA FAST™. Após cerca de 5 a 10 minutos a monocamada foi lavada uma última vez com PBS. Por meio de microscopia direta, foram contadas as UFF de cada poço por análise duplo cega.

### 5.4. IMUNIZAÇÃO

Todos os protocolos experimentais foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas (Nº de protocolo: 0006/2024). Camundongos C57Bl/6 foram imunizados com  $10^7$ ,  $10^6$  ou  $10^5$  UFF do vírus MVA na presença e ausência das NPPI (100µg/dose). Nos grupos que receberam NPPI, as doses de MVA foram previamente misturadas às nanopartículas em tubos de 1,5 mL e administradas imediatamente em uma única aplicação. Outro grupo foi imunizado apenas com NPPI na dose de 100ug. Como controle negativo, um grupo recebeu apenas PBS. Todos os animais foram imunizados por via

intramuscular, no músculo posterior da coxa direita, recebendo duas doses (dia 0 e dia 14), em um volume máximo de 40uL por dose. Os animais imunizados com MVA na dose de  $10^7$ , NPPI, MVA na dose de  $10^7$  na presença das NPPI e parte dos animais do grupo controle negativo, foram eutanasiados 14 dias após a última dose através da administração excessiva de anestésico pela via intraperitoneal (cetamina a 300 mg/kg e xilazina a 30 mg/kg) e o sangue coletado (Figura 3). Após a coleta do sangue, este foi mantido a 4 °C por 1 hora, e em seguida centrifugado a 3600 rpm durante 10 minutos. O soro foi recolhido e congelado a -20 °C até o momento de realização do ELISA e dos ensaios de soroneutralização.

Figura 3 – Representação esquemática do esquema de imunização utilizando MVA na dose  $1 \times 10^7$  UFF na presença e ausência das NPPI



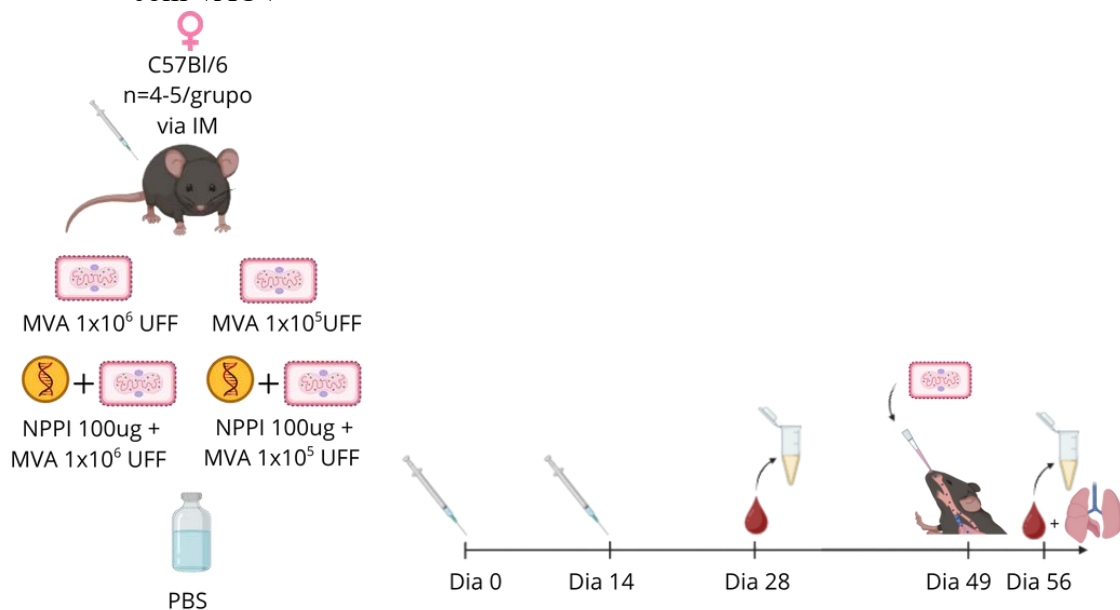
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Os animais imunizados com doses reduzidas ( $10^6$  e  $10^5$  UFF/dose), após 14 dias da segunda dose de imunização, foram submetidos a coleta de uma amostra de sangue antes do desafio com VACV. A coleta foi realizada por gotejamento com o auxílio de uma agulha perfurando a veia submandibular. Em seguida, o sangue foi mantido a 4 °C por 1 hora, e então centrifugado a 3600 rpm durante 10 minutos. O soro foi recolhido e congelado a -20 °C até o momento de realização do ELISA e dos ensaios de soroneutralização.

## 5.5. DESAFIO

Após 21 dias da segunda dose, os animais foram anestesiados com Xilazina na dose de 30 mg/kg e Cetamina na dose de 65 mg/kg. Em seguida, foram desafiados com VACV-WR, na dose de  $1 \times 10^6$  UFP em volume total de 50uL, por via intranasal. Foi feito o acompanhamento dos animais diariamente durante 7 dias, sendo avaliados os parâmetros de acordo com o Formulário de Registro de monitoramento do animal (Anexo A) após procedimento para determinação da necessidade do ponto final humanitário, fornecido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas. Na avaliação, é pontuado um escore de 1-3 em cada parâmetro clínico, como perda de peso, aparência do animal e comportamento. Na soma final, há um escore total máximo permitido e, ao se ultrapassar este escore, é sugerido a realização do ponto final humanitário (eutanásia), minimizando o sofrimento do animal. Ao final de 7 dias os animais foram eutanasiados através da administração excessiva de anestésico pela via intraperitoneal (cetamina a 300 mg/kg e xilazina a 30 mg/kg). Foram coletados os pulmões para análise de titulação viral e histopatologia. O sangue foi coletado por via intracardíaca e posteriormente teve o soro separado e acondicionado com o mesmo procedimento e objetivos realizados anteriormente (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática do esquema de imunização utilizando MVA nas doses  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^5$  UFF na presença e ausência das NPPI e posterior desafio com VACV



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

## 5.6. ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-MVA, ANTI-VACV E ANTI-BSA

Os soros dos animais imunizados foram avaliados com relação à produção de anticorpos anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA através de ELISA. Para isso, inicialmente o MVA ou VACV foi diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M, em pH 9,6 à concentração de  $10^6$  UFF (MVA) ou UFP (VACV) por mL. No caso da avaliação de anticorpos anti-BSA, foi realizada a diluição do BSA para 10ug/mL. Foram adicionados 100uL dessa solução em cada poço de uma placa de ELISA de 96 poços Nunc MaxiSorp® (eBIOSCIENCE, EUA) para sensibilizá-la. A placa foi incubada a 4°C overnight. No dia seguinte, o líquido foi descartado, a placa lavada três vezes com solução de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween-20, PBS-T) e em seguida foi feito o bloqueio com 200 µL de PBS-T contendo 5% de leite em pó (Molico®, Nestlé) por 2 horas a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada com PBS-T quatro vezes e foram adicionados os soros dos animais na diluição 1:100 em PBS-T resultando no volume final de 100uL por poço. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por uma hora. Após essa etapa, foram realizadas três lavagens com PBS-T e adicionados 100uL/poço de anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) na diluição 1:5000 em solução de PBS-T. Novamente a placa foi incubada a 37°C por uma hora e lavada três vezes com PBS-T. Logo após, foi acrescentado 100µl por poço de uma solução de Tetrametilbenzidina - TMB (Sigma-Aldrich, EUA) preparada em tampão citrato/fosfato (0,1M de Ácido Cítrico; 0,1M de Fosfato de Sódio; pH 4,5) e adicionado 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após mais 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi adicionado 30 uL por poço da solução de parada (ácido sulfúrico 2M) e então foi realizada a leitura da densidade ótica em leitor de microplacas (Leitor de Elisa AnthosZenyth 200rt) em comprimento de onda de 450nm.

## 5.7. TITULAÇÃO VIRAL DOS PULMÕES

Após a eutanásia dos camundongos C57Bl/6 imunizados com MVA em doses baixas na presença das NPPI e desafiados com VACV-WR, os pulmões esquerdos foram coletados para realização de titulação viral. Inicialmente os pulmões foram individualmente colocados em tubos de 1,5ml contendo 500uL de DMEM 0% SFB e macerados com auxílio de um pistilo estéril. O macerado foi centrifugado por 5 min a 10000 rpm e separado o sobrenadante, o qual foi mantido a -20°C.

Para a realização da titulação viral, os sobrenadantes dos pulmões foram descongelados e homogeneizados em vórtex. Foram preparadas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  com DMEM 0% SFB. Em placas de 24 poços contendo células Vero com 90% de confluência foram adicionados 200uL de cada diluição, de acordo com o mapa. Também foram selecionados poços para controle de vírus e controle de células. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por uma hora, e movimentadas a cada 10 minutos em cruz. Após o tempo de incubação, o volume dos poços foi completado para 1mL com DMEM 1% de SFB e as placas incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Passadas as 48 horas, foi descartado o meio e realizada fixação com formaldeído 10% e coloração com cristal violeta 0,1 %. Removido o excesso de cristal violeta dos poços e lavado em água corrente, foi feita então a contagem das placas de lise.

## 5.8. HISTOPATOLOGIA

Foram também coletados os pulmões direitos para análise histopatológica. Estes órgãos foram fixados em solução de formaldeído a 10% em PBS, submetidos à desidratação em etanol, diafanizados em xilol e posteriormente incluídos em parafina. Em seguida, foram realizados cortes sagitais com espessura de 4 µm em micrótomo rotativo, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas histológicas foram examinadas em microscópio óptico (AxioCam ICc3, Zeiss, Alemanha), em aumento de 20 vezes, por análise duplo-cega, considerando-se os parâmetros de injúria (inflamação, hemorragia, congestão vascular e edema) e perda de arquitetura pulmonar. Para a avaliação de injúria pulmonar foram considerados os escores 0 = normal, 1 = leve, 2 = moderado e 3 = severo. Na análise de perda de arquitetura pulmonar foram utilizados os escores de 0 (arquitetura pulmonar normal) a 4 (perda grave da arquitetura pulmonar). (Coelho *et al.*, 2025; Yamanel *et al.*, 2011).

### 5.9. TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACA (PRNT) PARA VACV UTILIZANDO SOROS DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM DIFERENTES DOSES DE MVA NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DAS NPPI

Com o objetivo de avaliar se houve produção de anticorpos neutralizantes para VACV pelos animais imunizados com a dose usual ou doses baixas de MVA, na presença ou ausência das NPPI, foi realizado o PRNT. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Vírus da UFMG.

Foram aliquotados 22,5 µL dos soros a serem testados em tubos de 1,5mL, e de SFB também na quantidade de 22,5 µL por tubo, para os controles de vírus. Os tubos com as amostras de soro e soros-controle foram incubados em banho-maria por 30 minutos a 56°C para a inativação do sistema complemento. Após isso, foram retirados do banho-maria e adicionados 427,5µL de MEM 0% em cada tubo (diluição 1:20). Para a preparação do vírus VACV, uma alíquota foi sonicada por 30 segundos e colocada no gelo por mais 30 segundos. O processo foi repetido por 3 vezes consecutivas. Feito isso, o vírus foi diluído para 150 PFU em MEM 0%.

Em seguida, 450uL do vírus diluído foram adicionados aos tubos contendo as amostras e tubos com soros-controle, ou seja, 450uL da diluição de vírus + 450uL da diluição de soro, sendo a concentração do soro no volume final de 1:40. Os tubos foram incubados por 16 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Haviam sido também preparadas placas de 6 poços contendo 2x10<sup>5</sup> de células BSC-40 por poço e colocada na estufa overnight a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, foi verificada a confluência de 80-90% nas placas, fase ideal para a infecção. Foi descartado o meio das placas e adicionado 400 µL das amostras em duplicata nos poços, sendo que em cada placa foram utilizados um poço de controle de células, um poço de controle de vírus, e duas amostras em duplicata. Foi realizada a adsorção de 15 em 15 minutos por uma hora, movimentando as placas e garantindo que a solução atinja toda a superfície do poço. Feito isso, foi adicionado 1,6mL de MEM 1% SFB em cada poço e incubado por 48 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Passadas as 48 horas, foi retirado o meio dos poços, adicionado PBS/formol a 3,7% em cada poço e incubado em T.A. por 30 minutos. Depois, o PBS/formol foi removido dos poços, foi adicionado cristal violeta 0,1 % e a placa foi incubada por mais 15 minutos. Após essas etapas, foi removido o excesso de cristal violeta e as placas lavadas com cuidado em água corrente. Após a secagem das placas em T.A., foi feita a contagem das placas de lise. Para quantificar a neutralização viral, o número de placas formadas foi contado em cada poço e comparado ao controle de vírus (sem soro). A porcentagem de formação de placas foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ Formação de placa} = \left( \frac{\text{número de placas}}{\text{número de placas no controle de vírus}} \right) \times 100$$

Esse valor representa o percentual de placas formadas em relação ao controle de vírus.

Em seguida, a porcentagem de redução de placas foi obtida por:

$$\% \text{ Redução de placa} = 100 - \% \text{ Formação de placa}$$

Essa medida representa a porcentagem de redução na formação de placas, ou seja, o quanto os anticorpos neutralizantes diminuíram a infectividade do vírus em comparação ao controle (Thomas *et al.*, 2009).

Devido às limitações experimentais (volume reduzido de soro dos animais imunizados), optou-se pela avaliação da neutralização na diluição 1:40, comparando com controle de vírus. Essa abordagem é considerada metodologicamente válida para comparar a capacidade de neutralização entre grupos, mesmo sem determinar títulos absolutos, e tem respaldo em estudos que empregam PRNT em contextos semelhantes (Silva *et al.*, 2025).

## 5.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos dados de ELISA e PRNT foram realizadas através de uma análise de variância (ANOVA) com estimação por quadrados mínimos ponderados (WLS), utilizando o inverso da variância dos tratamentos como pesos. Essa abordagem foi escolhida para corrigir o problema de heterocedasticidade, diagnosticado pelo teste de Bartlett. Algumas variáveis foram transformadas pela raiz quadrada para atender ao pressuposto de normalidade dos resíduos, conforme diagnosticado pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação post-hoc, foi utilizado o teste de Tukey-Kramer. Todos os testes foram realizados com 5% de significância.

As demais análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0.2; GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como valores individuais, com apresentação da distribuição dos dados. A comparação entre múltiplos grupos experimentais foi realizada por análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, quando apropriado. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE BSA CONTENDO POLI I:C (NPPI)

As NPPI produzidas pelo método de coacervação foram caracterizadas através da análise por DLS. As nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) obtiveram o tamanho de  $281,7 \pm 4,078$ , índice de polidispersão (PDI) de  $0,292 \pm 0,050$  e Potencial Zeta de  $-21,6 \pm 1,04$  (Tabela 1). A análise por microscopia eletrônica demonstra uma morfologia esférica, conforme evidenciado na figura 5.

Tabela 1 – Caracterização das NPPI

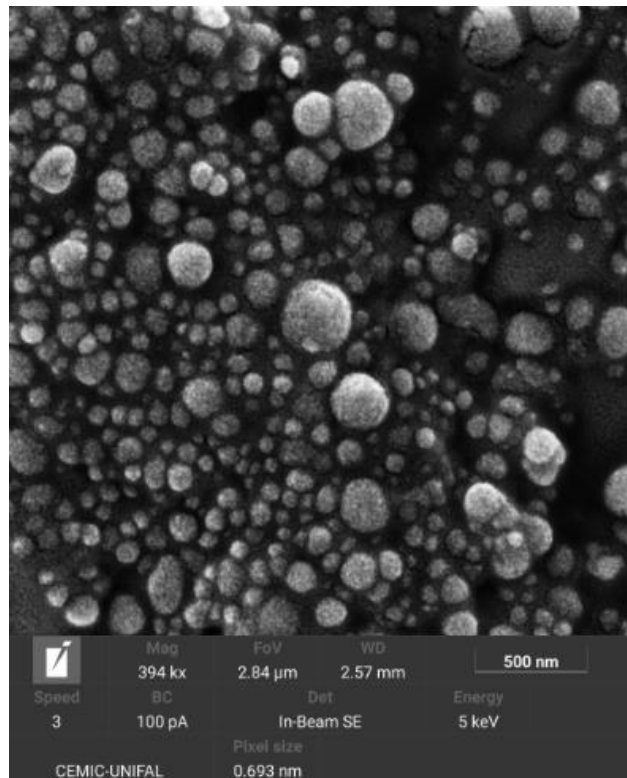
<b>Tamanho médio (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
$281,7 \pm 4,078$	$0,292 \pm 0,050$	$-21,6 \pm 1,04$

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Análise das NPPI quanto ao tamanho médio, PDI e Potencial Zeta. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

A taxa de encapsulamento do poli I:C foi determinada pela quantificação do poli(I:C) solúvel através de espectrofotometria. Os dados demonstraram que houve um encapsulamento de cerca de 80%.

Figura 5 – Análise das NPPI por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

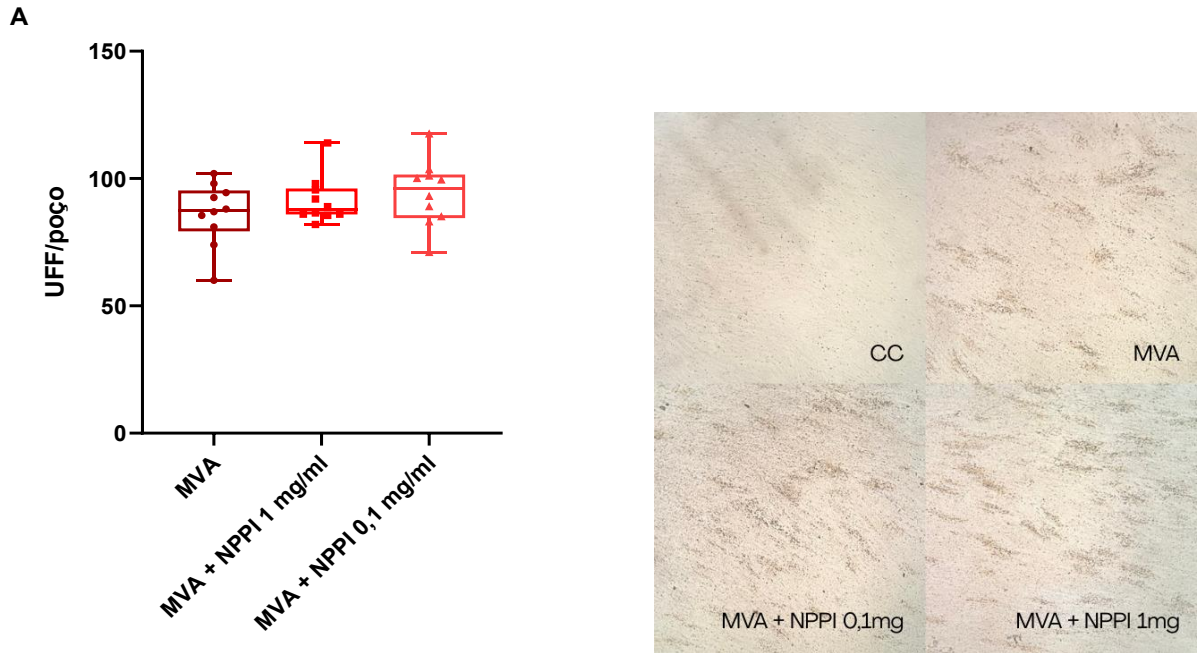


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

## 6.2. ANÁLISE DA INFECÇÃO DO MVA EM CÉLULAS BHK-21 NA PRESENÇA DAS NPPI

Com o objetivo de verificar se a presença das NPPI poderia inibir ou interferir com o processo de infecção do MVA em cultura de células, 100 UFF do MVA foi incubado com diferentes concentrações das NPPI (0,1 e 1 mg/ml). Os resultados indicam que não houve diferença estatística no número de UFF entre as células infectadas apenas com MVA, infectadas com MVA na presença de 1,0 mg e 0,1 mg de NPPI (Figura 6).

Figura 6 – As NPPI não interferem na capacidade de infecção do MVA em cultura de células BHK-21.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Gráfico: Análise da infectividade do MVA em células BHK-21 frente à adição de NPPI em diferentes concentrações. Células BHK-21 infectadas com MVA foram acrescidas de NPPI nas concentrações de 1,0mg e 0,1mg. Através de um ensaio de imunomarcção, as células infectadas com MVA foram identificadas e foi realizada a contagem de UFF. Não houve diferença estatística entre as amostras testadas. Análise realizada utilizando teste one-way ANOVA. Imagem: foto de microscopia ótica na objetiva de 4x, sendo CC: controle de células BHK-21; MVA: células BHK-21 infectadas com MVA; MVA + NPPI 0,1mg: células BHK-21 infectadas com MVA na presença das NPPI na concentração de 0,1 mg/mL; MVA + NPPI 1,0 mg: células BHK-21 infectadas com MVA na presença das NPPI na concentração de 1,0 mg/mL.

### 6.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-MVA, ANTI-VACV E ANTI-BSA E ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA VACV EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM MVA NA PRESENÇA DE NPPI

Com o objetivo de avaliar se as NPPI têm um potencial adjuvante com relação à imunização com MVA, camundongos foram imunizados de acordo com protocolo previamente estabelecido na literatura, onde se estabelece a concentração de  $1 \times 10^7$  UFF/dose (Cotter *et al.*, 2024; Pan *et al.*, 2021; Wyatt *et al.*, 2004). Após a realização do protocolo dose-resposta, os níveis de anticorpos anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA produzidos nos soros foram quantificados.

Ao se analisar a produção de anticorpos anti-MVA (Figura 7A), os grupos MVA e NPPI + MVA apresentaram índices médios de D.O./cut-off de  $2,61 \pm 0,12$  e  $2,63 \pm 0,12$ , respectivamente, mostrando respostas significativamente maiores do que os grupos PBS ( $1,26 \pm 0,26$ ) e NPPI ( $1,48 \pm 0,46$ ), ( $p < 0,0001$ ). Porém, entre os dois grupos imunizados com MVA não foi observada uma diferença estatística.

Considerando que a vacinação com MVA gera resposta imune cruzada para outros *Orthopoxvirus*, os níveis de anticorpos anti-VACV produzidos também foram quantificados. Os grupos MVA ( $11,56 \pm 3,44$ ) e NPPI + MVA ( $15,41 \pm 3,75$ ) apresentaram respostas significativamente maiores em comparação ao grupo PBS ( $0,42 \pm 0,27$ ) e NPPI ( $0,92 \pm 0,85$ ) ( $p < 0,0001$ ). O grupo NPPI isolado não foi diferente significativamente do grupo PBS ( $p = 0,8813$ ). Também não houve diferença estatística entre MVA e NPPI + MVA ( $p = 0,1464$ ) (Figura 7B).

Quando realizada a análise dos níveis de anticorpos anti-BSA produzidos pelos camundongos imunizados, as médias encontradas foram de  $0,054 \pm 0,039$  para o grupo PBS,  $0,026 \pm 0,020$  para o MVA,  $0,876 \pm 0,904$  para o NPPI e  $2,060 \pm 1,123$  para o MVA+NPPI. Os grupos NPPI e MVA+NPPI apresentaram níveis significativamente maiores de IgG anti-BSA em comparação ao grupo PBS ( $p = 0,0291$  e  $p = 0,0009$  respectivamente). Houve também diferença estatística entre os grupos MVA+NPPI e MVA ( $p = 0,0024$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre os demais grupos (Figura 7C).

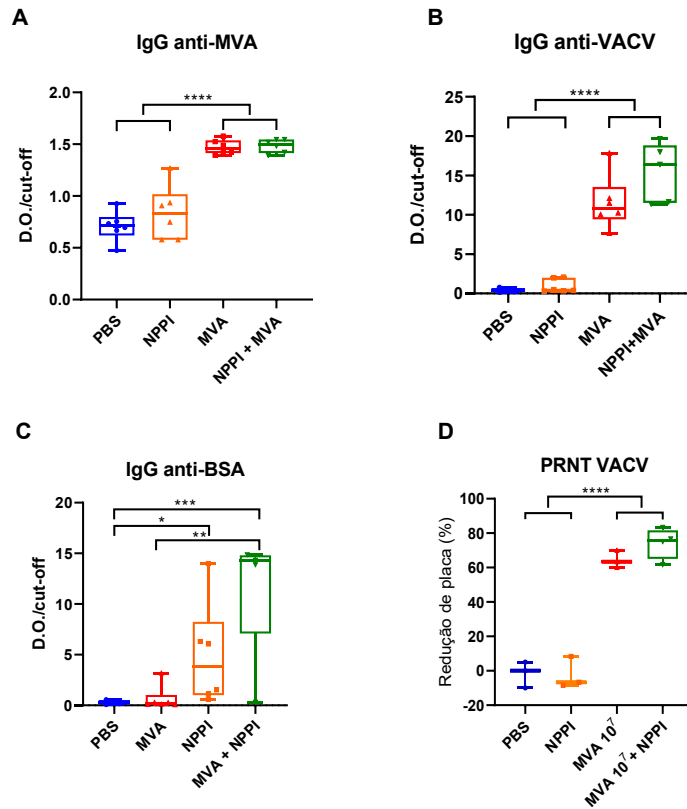
Adicionalmente, foi realizado o ensaio de PRNT utilizando os soros dos animais imunizados com  $10^7$  UFF de MVA, na presença ou ausência das NPPI para avaliação da produção de anticorpos neutralizantes para VACV (Figura 7D). A comparação entre os grupos controle (PBS) e NPPI não revelou diferença estatisticamente significativa na porcentagem de

redução de placas ( $p = 0,9998$ ), indicando ausência de atividade neutralizante detectável nesses grupos.

Por outro lado, os soros dos animais imunizados com MVA  $10^7$  UFF apresentaram aumento significativo da atividade neutralizante quando comparados ao grupo PBS ( $p < 0,0001$ ), assim como em relação ao grupo NPPI ( $p < 0,0001$ ). Resultado semelhante foi observado para o grupo imunizado com MVA  $10^7$  UFF associado às nanopartículas, que apresentou atividade neutralizante significativa em comparação tanto ao grupo PBS ( $p < 0,0001$ ) quanto ao grupo NPPI ( $p < 0,0001$ ).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos MVA  $10^7$  e MVA  $10^7 + NPPI$  ( $p = 0,4349$ ), sugerindo que neste caso a adição das nanopartículas não alterou significativamente a atividade neutralizante induzida pela dose elevada de MVA.

Figura 7 – Produção de anticorpos IgG anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA e atividade neutralizante para VACV em camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA na dose  $1 \times 10^7$  UFF.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Gráficos A, B e C: Avaliação do nível de anticorpos anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA e neutralizantes nos animais imunizados. (A) Níveis de IgG anti-MVA (B) Níveis de IgG anti-VACV (C) Níveis de IgG anti-BSA. Valores em D.O./cut-off. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Gráfico D: Resposta de anticorpos neutralizantes para VACV, induzida por MVA, acrescido ou não de NPPI. O PRNT foi realizado utilizando os soros na concentração 1:20 e VACV em células Vero, e os resultados são expressos como porcentagem de redução de placas em relação ao controle de vírus. Os dados são apresentados como valores individuais, com a distribuição dos resultados indicada graficamente. Análise estatística conforme descrito na seção 5.10. As linhas horizontais indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 6.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-MVA, ANTI-VACV E ANTI-BSA E ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PARA VACV EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM NPPI NA PRESENÇA DO MVA EM PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO BASEADOS EM DOSES BAIXAS

Com o intuito de avaliar se as NPPI têm um potencial adjuvante com relação ao MVA em doses reduzidas, camundongos C57Bl/6 foram imunizados de acordo com protocolo previamente estabelecido e os níveis de anticorpos anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA produzidos nos soros foram quantificados (Figura 8).

A avaliação do nível de produção de anticorpos anti-MVA demonstrou aumento nos grupos imunizados, sendo os grupos MVA  $10^5$  + NPPI ( $4,12 \pm 3,13$ ), MVA  $10^6$  ( $3,79 \pm 2,16$ ), e MVA  $10^6$  + NPPI ( $4,79 \pm 1,02$ ) significativamente superiores ao grupo controle PBS ( $0,13 \pm 0,05$ ) com valores de  $p = 0,075$ ,  $p = 0,0032$ , e  $p < 0,0001$  respectivamente. Nota-se que a diferença de produção de anticorpos dos grupos acrescidos das NPPI em relação ao grupo controle negativo (PBS) foi maior em comparação à diferença de produção de anticorpos dos grupos que receberam a mesma dose de MVA na ausência das NPPI em relação ao grupo controle negativo. Isso se evidencia pelo fato de que o grupo MVA  $10^5$  + NPPI apresentou produção de anticorpos superior estatisticamente ao grupo PBS e o grupo que recebeu a mesma dose de MVA porém, na ausência das NPPI, não apresentou diferença estatística em relação ao grupo PBS. Também houve diferença significativa na produção de anticorpos anti-MVA entre os grupos MVA  $10^6$  + NPPI e MVA  $10^5$  ( $1,25 \pm 1,19$ ) ( $p = 0,0075$ ). Não foi observada diferença estatística entre os demais grupos. Estes achados revelam que a adição das NPPI confere uma maior produção de anticorpos em comparação à resposta produzida pelos grupos que receberam a mesma dose de MVA na ausência das nanopartículas (Figura 8A).

Também foram quantificados os níveis de anticorpos anti-VACV produzidos nos soros dos animais imunizados. A resposta humoral foi significativamente maior nos grupos imunizados com MVA  $10^6$ , especialmente quando associado às NPPI. O grupo MVA  $10^6$  + NPPI apresentou média de D.O./*cutoff* de  $14,32 \pm 6,45$ , significativamente superior ao grupo controle PBS ( $0,65 \pm 0,17$ ;  $p = 0,0005$ ). De forma semelhante, o grupo MVA  $10^6$  ( $13,10 \pm 7,554$ ) também demonstrou aumento significativo em relação ao PBS ( $13,10 \pm 7,38$ ;  $p = 0,0026$ ). O mesmo achado da avaliação de produção de anticorpos IgG anti-MVA se repetiu com relação aos grupos que receberam a dose de  $10^6$  UFF de MVA. O grupo que recebeu as NPPI teve uma diferença estatística de produção de anticorpos em relação ao grupo PBS, superior em comparação a diferença de produção de anticorpos do grupo que não recebeu as NPPI em relação ao grupo

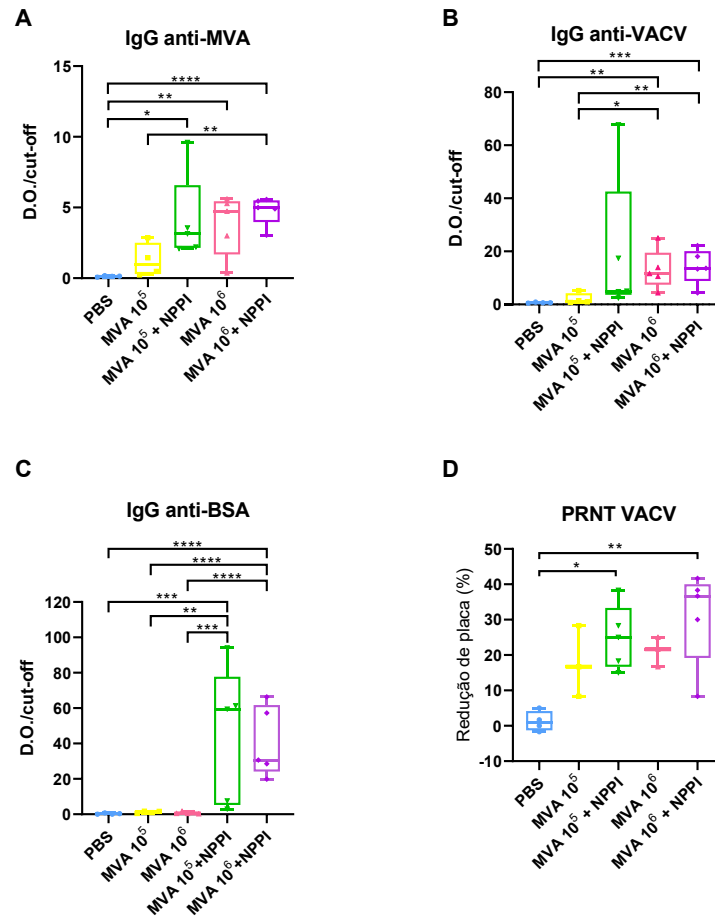
PBS. Também foi observada uma maior resposta do grupo MVA  $10^6$  + NPPI e MVA  $10^6$  em relação ao grupo MVA  $10^5$  ( $2,089 \pm 2,099$ ), com valores de  $p = 0,0066$  e  $0,0211$  respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os demais grupos. Esses dados indicam que a imunização com MVA na dose de  $1 \times 10^6$  é eficaz na indução de anticorpos anti-VACV, porém a adição das NPPI confere uma maior resposta humoral (Figura 8B).

Os níveis de anticorpos anti-BSA produzidos pelos camundongos imunizados com baixas doses de MVA foram adicionalmente quantificados (Figura 8C). A resposta de anticorpos anti-BSA foi significativamente aumentada nos grupos imunizados com MVA associado às NPPI. Os níveis médios de IgG anti-BSA foram  $45,08 \pm 38,91$  no grupo MVA  $10^5$  + NPPI e  $40,53 \pm 20,09$  no grupo MVA  $10^6$  + NPPI, enquanto os demais grupos apresentaram níveis baixos. O grupo MVA  $10^6$  + NPPI apresentou resposta significativamente maior que PBS ( $0,2994 \pm 0,3230$ ), MVA  $10^5$  ( $1,214 \pm 0,6457$ ) e MVA  $10^6$  ( $0,7596 \pm 0,5977$ ), sendo  $p < 0,0001$ . O grupo MVA  $10^5$  + NPPI também diferiu significativamente de PBS ( $p = 0,0003$ ), MVA  $10^5$  ( $p = 0,0011$ ) e MVA  $10^6$  ( $p = 0,0006$ ). Esses resultados sugerem que a imunização com NPPI induziu a resposta anti-BSA de forma expressiva (Figura 8C).

Posteriormente, foi realizado o ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT), utilizando os soros de camundongos imunizados com baixas doses de MVA ( $10^5$  ou  $10^6$  FFU), na presença ou ausência das nanopartículas (Figura 8D). As comparações entre o grupo controle (PBS) e os grupos imunizados apenas com MVA nas doses de  $10^5$  ou  $10^6$  FFU não demonstraram diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de redução de placas ( $p = 0,1932$  e  $p = 0,0872$ , respectivamente).

Em contraste, os soros dos animais imunizados com MVA  $10^5$  associado às NPPI apresentaram aumento significativo da atividade neutralizante em relação ao grupo PBS ( $p = 0,0131$ ). De forma semelhante, o grupo imunizado com MVA  $10^6$  associado às nanopartículas exibiu atividade neutralizante significativamente superior à observada no grupo controle ( $p = 0,0021$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre as duas doses de MVA, nem entre os grupos imunizados com MVA isolado e aqueles que receberam MVA associado às NPPI. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos MVA  $10^5$  + NPPI e MVA  $10^6$  + NPPI ( $p = 0,8444$ ).

Figura 8 – Produção de anticorpos IgG anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA e atividade neutralizante em camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas.



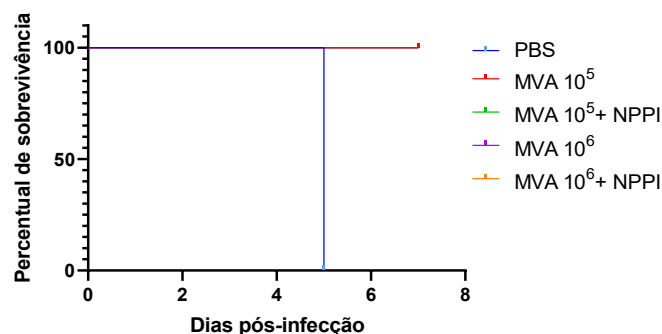
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Gráficos A, B e C: Resposta humoral anti-MVA, anti-VACV e anti-BSA induzida por MVA em doses baixas, acrescido ou não de NPPI. Quantificação realizada por ELISA na diluição 1:100. Os dados foram expressos como D.O./cut off a 450 nm. (A) Quantificação de IgG anti-MVA. (B) Quantificação de IgG anti-VACV. (C) Quantificação de IgG anti-BSA. Gráfico D: Resposta de anticorpos neutralizantes para VACV, induzida por MVA em doses baixas, acrescido ou não de NPPI. O PRNT foi realizado utilizando os soros na concentração 1:20 e VACV em células Vero, e os resultados são expressos como porcentagem de redução de placas em relação ao controle de vírus. Os dados são apresentados como valores individuais, com a distribuição dos resultados indicada graficamente. Análise estatística conforme descrito na seção 5.10. Nos gráficos as linhas horizontais indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Gráfico A: \*p < 0,1; \*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,0001. Gráficos B, C e D: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

## 6.5. INFECÇÃO COM VACV-WR DOS ANIMAIS IMUNIZADOS COM NPPI NA PRESENÇA DO MVA EM PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO BASEADOS EM DOSES BAIXAS

Os camundongos C57Bl/6 imunizados com baixas doses de MVA foram desafiados com VACV-WR por via intranasal. Parâmetros como sinais clínicos, peso e curva de mortalidade foram registrados diariamente durante 7 dias, utilizando o Formulário de Registro de monitoramento do animal fornecido pelo CEUA da Unifal. Durante os 7 dias após a infecção com VACV-WR os animais dos grupos imunizados com MVA em baixas doses, acrescidos ou não das NPPI, sobreviveram e foram eutanasiados, como proposto inicialmente, ao final deste período. Os animais do grupo PBS, em contrapartida, tiveram que ser eutanasiados após 5 dias da infecção, em razão do agravamento dos sinais clínicos e consequente determinação do ponto final humanitário (Figura 9).

Figura 9 – Percentual de sobrevivência após infecção com VACV-WR dos camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em protocolos de imunização baseados em doses baixas



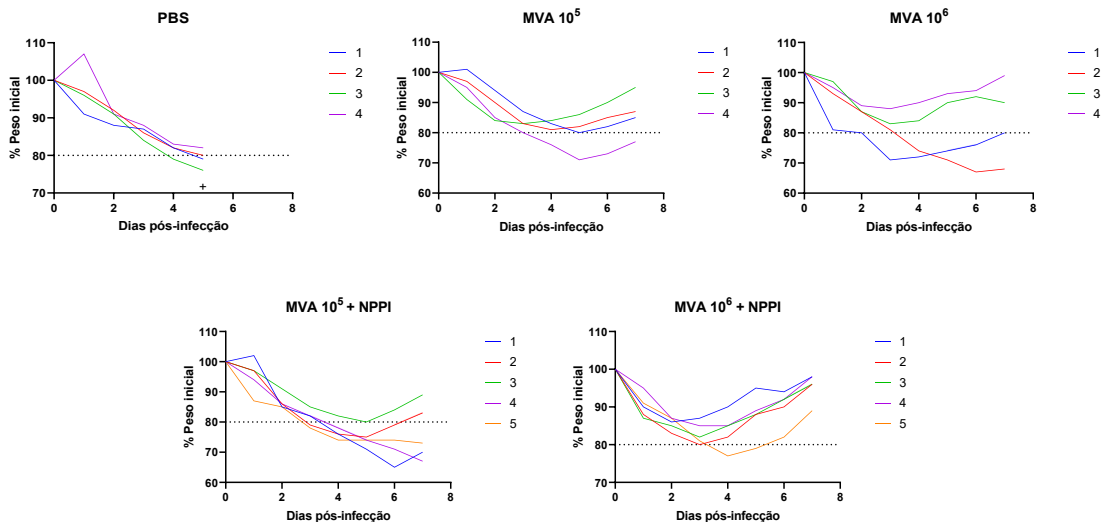
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Curva de sobrevivência de animais imunizados com MVA em baixas doses, acrescidos ou não das NPPI, após infecção por VACV-WR.

O peso dos animais também foi acompanhado durante os dias após a infecção com VACV-WR (Figura 10). Observou-se que os animais do grupo PBS tiveram uma perda progressiva de peso em comparação aos demais grupos que foram imunizados com MVA em baixas doses, acrescidos ou não das NPPI, que perderam peso inicialmente, mas recuperaram ao longo do período avaliado. Também é possível notar que os animais do grupo MVA 10<sup>6</sup> +

NPPI apresentaram recuperação de peso de forma mais precoce em comparação aos demais grupos. Até o quarto dia após a infecção, todos os animais desse grupo já haviam retomado o ganho de peso, achado que não foi observado nos grupos restantes.

Figura 10 – Peso dos camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em protocolos de imunização baseados em doses baixas e desafiados com VACV-WR

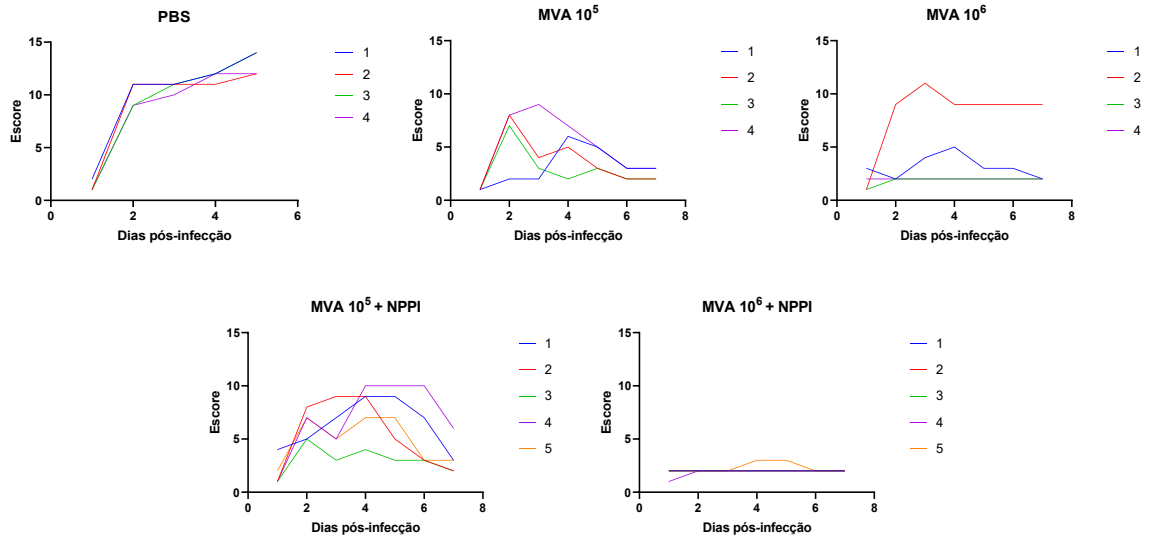


Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Peso de animais imunizados com MVA em baixas doses, acrescidos ou não das NPPI, após infecção por VACV-WR. No gráfico PBS o símbolo + indica o dia em que os animais foram eutanasiados por atingirem ponto final humanitário.

Um conjunto de sinais clínicos, sendo eles: aparência, ingestão de água e ração, escala de Grimace, comportamento natural e comportamento provocado gerou um escore clínico que pode ser observado representado por gráficos na Figura 11. É possível notar que os animais do grupo PBS obtiveram um escore clínico que se elevou progressivamente ao longo dos dias após a infecção, em comparação aos grupos imunizados com MVA, independente da dose e se acrescidos ou não das NPPI. Outro fato a ser observado é que os animais do grupo MVA 10<sup>6</sup> + NPPI mantiveram, em sua maioria, um escore baixo durante os 7 dias após a infecção, em comparação aos demais grupos.

Figura 11 – Avaliação dos sinais clínicos dos camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em protocolos de imunização baseados em doses baixas desafiados com VACV-WR



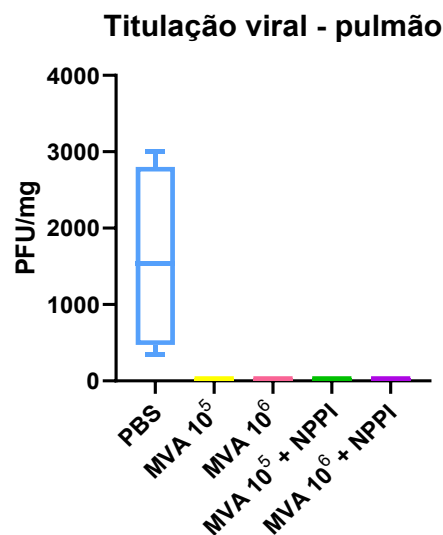
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Escore clínico de animais imunizados com MVA em baixas doses, acrescidos ou não das NPPI, após infecção por VACV-WR.

## 6.6. ANÁLISE DE TITULAÇÃO VIRAL DOS PULMÕES DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM MVA EM DOSES BAIXAS NA PRESENÇA DAS NPPI, APÓS INFECÇÃO COM VACV-WR

Foi realizada a análise de titulação viral dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas e posteriormente desafiados com VACV-WR. Apenas o grupo PBS apresentou vírus detectado no pulmão, indicando que a imunização com MVA foi eficaz em reduzir a carga viral dos animais sete dias após a infecção, independente da dose e se acrescido ou não das NPPI (Figura 12).

Figura 12 – Análise de titulação viral dos pulmões de camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas e desafiados com VACV-WR.



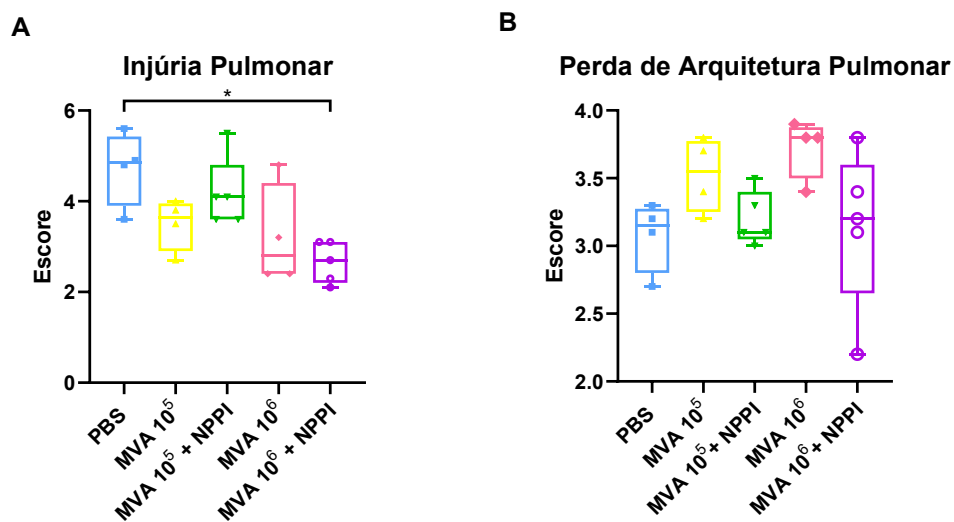
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Titulação viral dos pulmões de animais imunizados conforme protocolo instituído e desafiados com VACV-WR. Dados em UFP/mg.

## 6.7. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS PULMÕES DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM MVA EM DOSES BAIXAS NA PRESENÇA DAS NPPI, APÓS INFECÇÃO COM VACV-WR

Foi realizada a análise histopatológica dos pulmões dos camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas e posteriormente desafiados com VACV-WR (Figuras 13 e 14). Ao avaliar-se os parâmetros injúria (inflamação, hemorragia, congestão vascular e edema), foi observada uma diferença estatística entre o grupo PBS e o grupo MVA  $10^6$  + NPPI ( $p < 0,05$ ), porém entre os demais grupos infectados não foi encontrada diferença estatística (Figura 13A). Já na análise da perda de arquitetura pulmonar, não foi observada diferença estatística entre os grupos, independente da dose de MVA utilizada na imunização e se acrescida ou não das NPPI (Figura 13B).

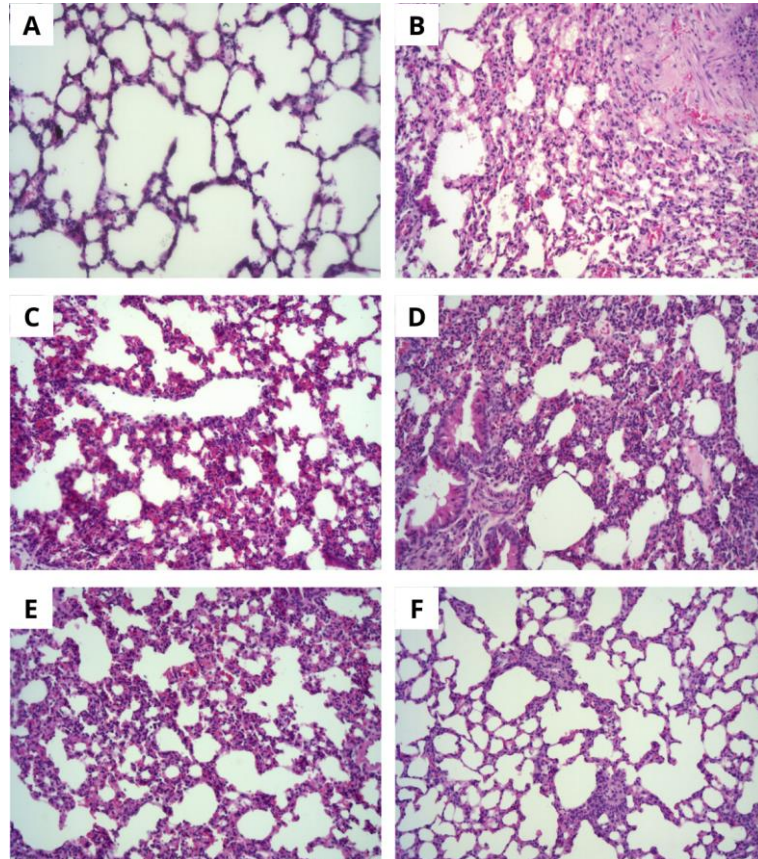
Figura 13 – Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas e desafiados com VACV-WR.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Análise histopatológica dos pulmões de animais imunizados conforme protocolo instituído e desafiados com VACV-WR. (A) Avaliação de injúria pulmonar. Diferenças significativas indicadas por  $p < 0,05$  (teste de Tukey-Kramer). No gráfico a linha horizontal indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $*p < 0,05$ ). (B) Avaliação da perda de arquitetura pulmonar.

Figura 14 – Histopatologia dos pulmões de camundongos C57Bl/6 imunizados com NPPI na presença do MVA em doses baixas e desafiados com VACV-WR.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Legenda: Análise histopatológica dos pulmões de animais imunizados conforme protocolo instituído e desafiados com VACV-WR. Foto de microscópio óptico, no aumento de 20x. Grupos: (A) não imunizado e não infectado; (B) PBS; (C) MVA  $10^5$ ; (D) MVA  $10^5$  + NPPI; (E) MVA  $10^6$ ; (F) MVA  $10^6$  + NPPI. Os grupos B, C, D, E e F foram imunizados e posteriormente infectados

## 7. DISCUSSÃO

As doenças causadas por poxvírus estão presentes ao longo da história, acometendo tanto humanos, como outros animais. Embora a varíola tenha sido erradicada com sucesso, o surgimento de casos de Mpox, causada por um vírus do mesmo gênero (*Orthopoxvirus monkeypox*), tem sido motivo de grande preocupação de saúde pública (Rajsri; Rao, 2022). Uma das estratégias mais eficazes de prevenção de infecções causadas pelos poxvirus é o uso de vacinas constituídas de vírus atenuados. A vacina baseada no MVA (como a MVA-BN, usada tradicionalmente contra varíola) demonstrou em múltiplos estudos ser eficaz e segura contra Mpox (Back *et al.*, 2024; Organização Mundial da Saúde, 2024).

Apesar das vacinas baseadas no MVA contra Mpox sejam comprovadamente eficazes e seguras, seu uso em larga escala enfrenta duas limitações relevantes. Em primeiro lugar, a disponibilidade global de doses ainda é restrita, concentrando-se em grande parte em países de alta renda, enquanto regiões endêmicas da África e outras áreas vulneráveis enfrentam desafios de produção e distribuição (Liu *et al.*, 2024; Organização Mundial da Saúde, 2024). Esta questão compromete a capacidade de conter surtos de forma eficiente e pode favorecer a persistência da transmissão viral em populações não vacinadas. Em segundo lugar, a resposta imunológica pode ser insatisfatória em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles vivendo com HIV com contagem de CD4 reduzida, o que requer esquemas vacinais completos ou doses de reforço para conferir proteção adequada (Mazzotta *et al.*, 2024; Organização Mundial da Saúde, 2024). Essas limitações destacam a necessidade de estratégias para aumentar a imunogenicidade da vacina e diminuir custos de produção.

Neste trabalho, a estratégia sugerida foi o uso das nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) (NPPI) como adjuvante ao MVA. Conforme demonstrado por Piva-Amaral *et al.*, (2024), as NPPI se mostraram um adjuvante eficaz em modelo de imunização para Zika e assim, a hipótese a ser testada é se as NPPI podem aumentar a imunogenicidade de vacinas baseadas em MVA, mesmo em condições de uso de baixas doses antigênicas.

Para compreender os efeitos observados no aumento da resposta imune, é fundamental considerar as propriedades físico-químicas das NPPI. No presente estudo, as NPPI apresentaram tamanho médio de  $281,7 \pm 4,08$  nm, PDI de  $0,292 \pm 0,050$  e potencial zeta de  $-21,6 \pm 1,04$  mV, (Tabela 1) indicando partículas relativamente homogêneas, estáveis e com morfologia esférica. Esses achados são consistentes com relatos anteriores sobre nanopartículas de BSA conjugadas a poli I:C (Piva-Amaral, 2024) e BSA conjugadas a compostos bioativos,

como os descritos por Bronze-Uhle *et al.*, (2016) e Solanki *et al.* (2021), que demonstraram tamanhos variando entre 110 e 166 nm e morfologia esférica, além de estabilidade em suspensão. Embora as NPPI sejam ligeiramente maiores, o intervalo observado permanece dentro da faixa 200-600nm, considerada favorável para interação com células imunológicas e internalização eficiente, como evidenciado por Oyewumi *et al.* (2010).

Provando que o tamanho de uma partícula pode ser determinante para seu efeito adjuvante, Vrieling *et al.* (2019) afirma que as nanopartículas conseguem ser vantajosas em comparação às micropartículas como adjuvante vacinal. Como exemplo, é possível reduzir a dose de adjuvante levando a uma diminuição dos efeitos colaterais dos adjuvantes à base de sal de alumínio, como irritação e inflamação locais. Já Sloat *et al.*, (2010) acrescenta que as micropartículas geram resposta humoral, enquanto as nanopartículas geram resposta celular.

Com relação à importância do nanoencapsulamento do poli(I:C), Speth *et al.* (2017) fizeram um estudo para investigar a capacidade de nanopartículas à base de quitosana contendo poli(I:C) de aumentar a imunogenicidade da BCG em macrófagos derivados da medula óssea de camundongo (BMDM) *in vitro*. Seus achados demonstraram que a incorporação do poli(I:C) em nanopartículas impediu sua degradação por ribonucleases e aumentou sua captação pelos BMDM de camundongo. Este estudo revelou que o poli(I:C) solúvel foi ineficaz, enquanto sua versão nanoencapsulada aumentou significativamente a resposta imune pró-inflamatória de macrófagos infectados por BCG. Esses achados reforçam que o BSA nas NPPI funciona não apenas como veículo, mas também como matriz protetora do poli(I:C), conservando-o ativo por mais tempo e potencializando seu efeito adjuvante.

Outro ponto a ser destacado, é que o uso de adjuvantes pode possibilitar uma redução da dose de antígeno na vacina, sem comprometer sua eficácia, como afirmado por Keech *et al.*, (2020) e Zhu; Wang; Nie, (2014). Um estudo atestou a propriedade do adjuvante Advax-CpG (derivado de partículas cristalinas de delta inulina, um polissacarídeo vegetal composto por unidades de frutose e glicose) em potencializar a imunogenicidade da vacina inativada contra poliovírus e permitir a redução da dose do antígeno (Honda-Okubo; Baldwin; Petrovsky, 2021). Em outro estudo, Jiang *et al.* (2014) demonstraram que o adjuvante rOv-ASP-1 (uma proteína secretada associada à ativação de *Onchocerca volvulus*) quando adicionado à vacina inativada contra influenza em formulação aquosa, potencializou significativamente a resposta de anticorpos específicos e a proteção contra infecção letal em modelo murino. Além disso, o rOv-ASP-1 intensificou a resposta humoral mesmo com baixas doses da vacina, possibilitando uma redução de até dez vezes na quantidade de antígeno necessária para induzir imunidade protetora. No contexto de adjuvantes nanoparticulados, Lee *et al.* (2022) demonstraram que o uso de

nanopartículas de fosfato de cálcio com poli(I:C) associada à vacina contra influenza permitiu que meias doses da vacina com o adjuvante nanoparticulado apresentassem imunogenicidade e eficácia protetora comparáveis ou superiores às doses completas. Esse efeito foi atribuído à maior ativação de células apresentadoras de antígeno, à expansão de linfócitos T e ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  nos pulmões, desempenho superior ao observado com poli(I:C) solúvel (Lee *et al.*, 2022). De maneira semelhante, as NPPI desenvolvidas neste estudo podem representar uma estratégia promissora com função adjuvante ao MVA, conciliando eficácia vacinal, segurança e potencial redução da dose de antígeno necessária.

Antes de se iniciar os experimentos de imunização, foi importante avaliar se a presença das NPPI poderia interferir na infectividade do MVA *in vitro*. Os dados obtidos (Figura 6) demonstram que não houve interferência do processo de infecção e replicação do MVA pelas NPPI em cultura de células. Esse fato pode ser explicado devido ao uso de receptores diferentes para internalização das NPPI. Em geral, a entrada do MVA em células ainda é pouco elucidada, embora estudos indiquem que poxvírus, como o VACV, podem utilizar múltiplas vias, incluindo fusão direta na membrana plasmática ou endocitose dependente de pH, dependendo da cepa viral e do tipo celular (Moss, 2016, 2012; Schmidt; Bleck; Mercer, 2012). Ainda é descrito que a regulação de receptores de superfície celular pelo MVA, observada em leucócitos humanos, sugere que o vírus pode modular positivamente ou negativamente a expressão de variados tipos de receptores de superfície celular, porém esse mecanismo ainda é inexplorado (Pereira *et al.*, 2020). Nossos dados demonstram que as NPPI não interferem na infectividade do MVA, o que reforça o fato de que, quando administrado junto a um antígeno vacinal, não interfere com a replicação do vírus.

Qu *et al.* (2024) afirmam que o principal receptor de albumina, gp60, responsável pela endocitose da albumina sérica humana (HSA) em condições fisiológicas, apresenta ampla expressão em células endoteliais vasculares, com exceção do endotélio cerebral. A interação da albumina com o gp60 desencadeia sua internalização pelas células endoteliais, seguida de transporte transcelular por meio do processo de transcitose. Portanto, sugere-se que as NPPI seguem vias de internalização e ativação imune distintas daquelas usadas pelo MVA, o que explicaria a ausência de interferência na entrada do vírus na célula. Esta é uma característica relevante para um adjuvante, pois sugere que a adição dessas nanopartículas não compromete a entrada e conseqüentemente imunogenicidade do MVA.

Sabendo que o MVA provoca respostas imunes celulares e humorais ao vírus *Orthopoxvirus vaccinia* em camundongos (Wyatt *et al.*, 2004), no presente estudo, a imunização dos camundongos C57Bl/6 foi realizada com MVA em diferentes concentrações ( $10^5$  a  $10^7$  UFF

por dose), administrada pela via intramuscular em um esquema de duas doses com intervalo de 14 dias. Nos trabalhos selecionados em nossa revisão foram empregadas a doses de  $10^5$  a  $10^8$  FFU de MVA/dose (Belyakov *et al.*, 2003; Drexler *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2023; McCurdy *et al.*, 2004; Meseda *et al.*, 2005). Entre os trabalhos de Belyakov *et al.* (2003), McCurdy *et al.* (2004) e Meseda *et al.* (2005) as vias de administração variaram entre intramuscular (IM), subcutânea (SC) e intranasal (IN), porém Altenburg *et al.* (2017) afirmou que a via IM constitui o padrão de administração das vacinas baseadas em MVA.

Ao se analisar os ensaios de avaliação da produção de anticorpos IgG anti-MVA e anti-VACV (Figuras 7A, 7B, 8A e 8B), observa-se que os resultados são semelhantes. Isto se deve provavelmente à grande semelhança entre os dois antígenos, visto que o vírus ancestral do MVA é a cepa do *Orthopoxvirus vaccinia* Ankara (Altenburg *et al.*, 2014; Volz; Sutter, 2017). Nos ensaios pré-infecção com VACV não foi observada diferença estatística entre a produção de anticorpos IgG anti-MVA e anti-VACV dos animais que receberam MVA independente da dose e os que receberam as mesmas doses acrescidas de NPPI (Figuras 8A e 8B). Houve sim, como esperado, uma grande diferença estatística entre os animais imunizados e os animais do grupo controle, corroborando com os dados de Gao *et al.* (2023) que evidenciaram a capacidade do MVA de induzir respostas humorais robustas e dose-dependentes em camundongos, incluindo anticorpos IgG com atividade cruzada contra o MPXV. Ainda é possível notar uma maior diferença estatística na produção de anticorpos IgG anti-MVA e anti-VACV dos grupos que receberam as NPPI em relação ao grupo controle, quando comparada com a produção de anticorpos dos grupos que receberam as mesmas doses de MVA em relação ao grupo controle. Este achado é semelhante ao encontrado por Piva-Amaral *et al.* (2024), que observou em seu estudo que os camundongos imunizados com as NPPI apresentaram produção superior de anticorpos anti-zEDIII em comparação com os grupos controle, revelando a capacidade adjuvante das NPPI quanto a produção de anticorpos. Associado a esse achado, observou-se que a produção de anticorpos IgG anti-MVA do grupo MVA  $10^5$  + NPPI é semelhante à produção humoral do grupo MVA  $10^6$ , revelando mais uma vez a capacidade imunogênica das NPPI, fator que pode possibilitar uma economia de doses de vacina, sem prejuízo na produção de anticorpos.

Os camundongos imunizados com as doses mais baixas de MVA ( $10^5$  e  $10^6$  UFF) foram desafiados com  $10^6$  PFU de VACV-WR, por via intranasal, em consonância com Li, *et al.* (2024) e Zhou *et al.*, (2024). O VACV é amplamente utilizado como protótipo da família *Poxviridae* (Xiang; Lane, 2021) e compartilha aproximadamente 95% de similaridade de sequência de antígenos imunodominantes com o MPXV (Xia *et al.*, 2023), justificando o uso do VACV como

modelo de desafio para avaliação de vacinas contra MPXV. O volume de vírus administrado foi baseado no guia de vias de administração e volumes em camundongos (University of California, San Francisco, 2025), que determina que o volume ideal para administração de substâncias por via intranasal em camundongos é 50uL. Drexler *et al.* (2003) ainda concluiu que a infecção respiratória com o *Orthopoxvirus vaccinia* constitui um modelo de desafio consolidado, uma vez que os efeitos da infecção são observados principalmente através da perda de peso corporal e aparecimento de sinais clínicos. Neste trabalho, os animais foram desafiados após 21 dias da segunda dose de imunização, diferente de Li, *et al.* (2024) e Zhou *et al.*, (2024) que fizeram o desafio após 14 dias da imunização. Assim como observado por Zhou *et al.*, (2024), todos os grupos tiveram uma pequena perda de peso já no dia 1 após a infecção, sendo que os animais do grupo controle tiveram uma perda progressiva e no dia 5 após a infecção atingiram o limite considerado indicativo de eutanásia, além de serem notados sinais clínicos graves (Figura 10).

Belyakov *et al.* (2003) observou em seu estudo que o MVA foi capaz de conferir proteção contra a infecção com VACV, de maneira dose-dependente, ou seja, os animais que perderam menos peso foram os que receberam as maiores doses de MVA. Este dado não foi plenamente observado no presente trabalho, tendo em vista que a perda de peso variou entre os grupos de animais imunizados com MVA adicionados ou não das NPPI, com exceção do grupo que recebeu  $10^6$ UFF+NPPI, que ao final do experimento havia recuperado aproximadamente 100% do peso inicial (Figura 10).

Além da avaliação de perda de peso dos animais após a infecção, foi avaliado o escore clínico, que une uma série de sinais clínicos e de comportamento (Figura 11). Foi observado que os animais dos grupos  $10^5$ ,  $10^5$ +NPPI e  $10^6$  tiveram um aumento do escore até aproximadamente o dia 4 após a infecção, quando então a maior parte dos animais voltou a ter uma diminuição do escore. O grupo  $10^6$ +NPPI manteve o escore baixo durante todo o período após a infecção. Volz *et al.* (2014) mostrou resultados diferentes em seu estudo em que camundongos C57Bl/6 foram imunizados com doses de  $10^2$  a  $10^8$  de MVA e desafiados com *Orthopoxvirus ectromelia* (ECTV). Os pesquisadores observaram que os animais imunizados com doses acima de  $10^5$  FFU de MVA não apresentaram nenhum sintoma evidente da doença.

De igual modo, foi avaliada a produção de anticorpos anti-BSA (Figuras 7C e 8C). Considerando que foi administrada a mesma dose de NPPI em todas as imunizações, os animais que receberam as NPPI tiveram produção de anticorpos IgG anti-BSA igualmente superior em todos os protocolos de imunização, quando comparados aos animais que não receberam as nanopartículas. Este resultado contrasta com o encontrado por Piva-Amaral *et al.*, (2024), que

testou uma vacina utilizando o domínio III da proteína do envelope do *Orthoflavivirus zikaense* (zEDIII) e as NPPI e observou que todos os grupos testados apresentaram baixos níveis de anticorpos anti-BSA. Esta variação de resposta pode ser atribuída a diferença entre os antígenos, uma vez que o MVA é um vírus atenuado e o zEDIII uma proteína recombinante e essa diferença de estímulo antigênico pode ser algo relevante para geração de resposta imune anti-BSA.

Foi realizada a quantificação de titulação viral dos pulmões dos animais desafiados com VACV (Figura 13). Assim como Zhou *et al.*, (2024), as amostras foram coletadas no dia 7 após o desafio. Contudo, diferentemente do estudo citado, no qual ainda foi detectada carga viral nos pulmões dos animais imunizados (mesmo que em níveis reduzidos em relação ao grupo controle), no presente trabalho não foi detectada qualquer carga viral nos pulmões dos animais imunizados com MVA, independentemente da dose e se acrescido ou não das NPPI. Este resultado é semelhante ao de McCurdy *et al.* (2004) em que não foi detectada carga viral a partir do dia 8 após o desafio em todos os animais imunizados. Este achado demonstra a capacidade do MVA de controlar a carga viral pulmonar, mesmo em doses baixas.

Além da titulação viral, foi realizada a análise histopatológica dos pulmões dos animais infectados com VACV (Figuras 13 e 14). Foi constatado que a infecção por VACV por via intranasal foi eficaz do ponto de vista histopatológico, uma vez que foram observados sinais significativos de injúria pulmonar nos animais não imunizados. Estes achados confirmam os encontrados por Zhou *et al.* (2024), que mostraram que a infecção por VACV induziu grandes sinais de injúria pulmonar, como inflamação, congestão e hemorragia em animais não imunizados. Também foi observado no presente estudo que apenas o grupo imunizado com MVA na dose de  $10^6$  FFU acrescido das NPPI apresentou um escore de injúria pulmonar menor estatisticamente, quando comparado ao grupo não imunizado. Este resultado contrasta com o encontrado por McCurdy *et al.* (2004) que observou que ambas imunizações utilizadas no estudo (Dryvax e MVA na dose de  $2 \times 10^6$  PFU) foram eficientes em proteger os animais contra a injúria pulmonar causada pelo VACV, quando comparados com os animais não imunizados e reforça a capacidade das NPPI, quando acrescidas à dose de  $10^6$  FFU de MVA, de controlar a injúria pulmonar causada pela infecção por poxvírus.

Adicionalmente, foram realizados os ensaios de análise de neutralização por redução de placa para VACV através do PRNT, utilizando soros de animais imunizados com doses variadas de MVA na presença ou ausência das NPPI (Figuras 7D e 8D). Ao se analisar os soros dos animais imunizados no protocolo utilizando a dose usual de MVA ( $10^7$  UFF) (Figura 7D), foi observada uma grande atividade de neutralização por parte dos soros dos animais imunizados

com MVA, acrescido ou não das NPPI, em relação aos grupos não imunizados com MVA. Este resultado demonstra a capacidade do MVA em estimular a produção de anticorpos neutralizantes para os *Orthopoxvirus*, como observado no estudo de Gao *et al.*, (2023) que mostra que camundongos imunizados com MVA na dose de  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL produziram maior quantidade de anticorpos neutralizantes para MPXV e MVA.

Por fim, foram testados os soros dos animais imunizados no protocolo utilizando baixas doses de MVA. Foi observado que apenas os grupos imunizados com MVA na presença das NPPI demonstraram capacidade neutralizante significativa em relação ao grupo controle não-imunizado, apesar de estar com atividade neutralizante abaixo de 50% em todos os grupos (Figura 8D). Este achado sugere que as NPPI induziram um aumento da produção de anticorpos neutralizantes pelos animais imunizados com MVA acrescido das NPPI, em comparação aos grupos imunizados com as mesmas doses de MVA, porém com fraca atividade de neutralização. De forma semelhante, Zhang *et al.* (2025) reforçam em seu trabalho, que formulações nanoparticuladas podem modular e aumentar a geração de anticorpos neutralizantes contra VACV em modelos murinos. O fato de o grupo MVA  $10^6$  + NPPI ter revelado uma maior capacidade neutralizante do VACV se relaciona com o resultado encontrado clinicamente (baixa morbidade após a infecção viral) e histopatologicamente (menor grau de injúria pulmonar).

Assim, os resultados do presente estudo demonstram que as nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) (NPPI) funcionam como adjuvante eficaz para o MVA, potencializando a resposta humoral e melhorando a proteção clínica após o desafio com VACV. Esses achados reforçam o potencial das NPPI para otimizar vacinas baseadas em MVA, permitindo esquemas vacinais mais eficientes e menor dose de antígeno, sem comprometer a segurança ou a eficácia.

## 8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se:

- A adição das NPPI não interferiu na infectividade do MVA *in vitro*, ativando de forma segura respostas imunes sem comprometer a imunogenicidade do vírus atenuado;
- as nanopartículas de BSA contendo poli(I:C) (NPPI) atuam como adjuvante eficaz ao MVA em doses baixas, potencializando a resposta humoral anti-MVA e anti-VACV;
- as nanopartículas influenciaram na produção de anticorpos neutralizantes para VACV, observada nos ensaios de neutralização por redução de placas (PRNT), nos quais os grupos imunizados com MVA em doses baixas, na presença das NPPI, apresentaram aumento significativo de anticorpos neutralizantes se comparado aos outros grupos;
- as NPPI quando acrescidas ao MVA na dose de  $10^6$  promoveram proteção clínica robusta em camundongos, demonstrada através da diminuição de perda de peso e sinais clínicos;
- a ausência de carga viral nos pulmões dos animais imunizados, independentemente da dose e se acrescido ou não das NPPI, reforça a capacidade protetora do MVA;
- a avaliação histopatológica pulmonar demonstrou que o grupo imunizado com MVA na dose de  $10^6$  associado às NPPI apresentou menor grau de injúria pulmonar de forma estatisticamente significativa quando comparado ao grupo PBS, corroborando com os achados sorológicos e clínicos.

Esses achados sugerem que a combinação do MVA com as NPPI constitui uma estratégia promissora para otimização de vacinas contra Poxvírus, viabilizando a redução de doses, manutenção da eficácia e segurança, e aumento da memória imunológica.

## REFERÊNCIAS

- AHN, So Yeon; LE, Chau Thuy Tien; KO, Eun-Ju. **Monophosphoryl Lipid A and Poly I:C Combination Adjuvant Promoted Ovalbumin-Specific Cell Mediated Immunity in Mice Model.** *Biology*, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 908, set. 2021.
- ALLARD, R. *et al.* **Breakthrough cases of mpox:** One-dose vaccination is associated with milder clinical manifestations. *Journal of infection and public health*, [S. l.], v. 17, n. 4, abr. 2024.
- ALLARD, Roberto *et al.* **Breakthrough cases of mpox:** One-dose vaccination is associated with milder clinical manifestations. *Journal of infection and public health*, [S. l.], v. 17, n. 4, abr. 2024.
- ALTENBURG, Arwen F. *et al.* **Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) as Production Platform for Vaccines against Influenza and Other Viral Respiratory Diseases.** *Viruses*, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 2735–2761, jul. 2014.
- ALTENBURG, Arwen F. *et al.* **Modified Vaccinia Virus Ankara Preferentially Targets Antigen Presenting Cells In Vitro, Ex Vivo and In Vivo.** *Scientific Reports*, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 8580, 17 ago. 2017.
- AMBRÓSIO, Jéssica A. R. *et al.* **BSA nanoparticles loaded-methylene blue for photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT):** effect on both growth and biofilm formation by *Candida albicans*. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, [S. l.], v. 31, n. 17, dez. 2020.
- ANDRADE, Ketyllen Reis. **Monkeypox virus associado à infecções humanas.** 2012. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2012.
- BACK, Soowoo *et al.* **Effectiveness and Safety of the MVA–BN Vaccine against Mpox in At-Risk Individuals in the United States (USMVAc).** *Vaccines*, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 651, jun. 2024.
- BARANOV, Maksim V. *et al.* **Modulation of Immune Responses by Particle Size and Shape.** *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 11, p. 607945, 12 fev. 2021.
- BEDDINGFIELD, Brandon J. *et al.* **MVA-based vaccines are protective against lethal eastern equine encephalitis virus aerosol challenge in cynomolgus macaques.** *NPJ vaccines*, [S. l.], v. 9, n. 1, 27 fev. 2024.
- BELYAKOV, Igor M. *et al.* **Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viroses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences [S. l.]*, v. 100, n. 16, p. 9458-9463, jul. 2003.
- BIDGOOD, Susanna R. *et al.* **Poxviruses package viral redox proteins in lateral bodies and modulate the host oxidative response.** *PLOS Pathogens*, [S. l.], v. 18, n. 7, p. e1010614, 14 jul. 2022.

BREMAN, Joel G. **Smallpox**. *The Journal of Infectious Diseases*, [S. l.], v. 224, n. Suppl 4, p. S379–S386, 30 set. 2021.

BRONZE-UHLE, ES *et al.* **Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid**. *Nanotechnology, Science and Applications*, [S. l.], v. 10, p. 11–21, 28 dez. 2016.

BROYLES, S. **Vaccinia virus transcription**. *The Journal of general virology*, [S. l.], v. 84, n. Pt 9, set. 2003.

BUKACKOVA, M.; MARSALEK, R. **Interaction of BSA with ZnO, TiO<sub>2</sub>, and CeO<sub>2</sub> nanoparticles**. *Biophysical chemistry*, [S. l.], v. 267, dez. 2020.

CASSANO, Jennifer M. *et al.* **The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand**. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, [S. l.], v. 195, p. 33–39, jan. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Clinical considerations for monkeypox in immunocompromised people**. Atlanta: CDC, 29 ago. 2025. Disponível em: <https://www.cdc.gov/monkeypox/hcp/clinical-care/immunocompromised-people.html>. Acesso em: 08 jan. 2026.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **VACINAS | VARÍOLA** | 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/smallpox/clinicians/vaccines.html>. Acesso em: 12 maio 2024.

CHAUDHRI, Geeta *et al.* **Vaccine-Induced Protection against Orthopoxvirus Infection Is Mediated through the Combined Functions of CD4 T Cell-Dependent Antibody and CD8 T Cell Responses**. *Journal of Virology*, [S. l.], v. 89, n. 3, p. 1889–1899, 26 nov. 2014.

COELHO, Luiz Felipe Leomil *et al.* **Mucosal-adapted bacteriophages as a preventive strategy for a lethal *Pseudomonas aeruginosa* challenge in mice**. *Communications Biology*, v. 8, p. 13, 2025.

COTTER, A. W.; *et al.* **Mpox mRNA-1769 vaccine inhibits orthopoxvirus replication at intranasal, intrarectal, and cutaneous sites of inoculation**. *npj Vaccines*, London, 2024.

DOMINGOS, Iago J. S. *et al.* **Orthopoxvirus Circulation in an Endemic Area in Brazil: Investigation of Infections in Small Mammals during an Absence of Outbreaks**. *Viruses*, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 842, 25 mar. 2023.

DREXLER, Ingo *et al.* **Identification of vaccinia virus epitope-specific HLA-A\*0201-restricted T cells and comparative analysis of smallpox vaccines**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S. l.], v. 100, n. 1, p. 217–222, 7 jan. 2003.

ESSBAUER, S.; PFEFFER, M.; MEYER, H. **Zoonotic poxviruses**. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 140, n. 3–4, p. 229–236, 2010.

E SILVA, P. H. B. *et al.* **Geographic distribution of Vaccinia virus, diagnosis and demographic aspects of affected populations, Minas Gerais, Brazil, 2000–2023.** *Viruses*, Basel, v. 17, n. 1, p. 22, 2025.

ESPY, M.J. *et al.* **Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR.** *Journal of clinical microbiology*, [S. l.], v. 40, n. 6, jun. 2002.

FENNER, Frank *et al.* **Smallpox and its eradication.** [S. l.]: World Health Organization, 1988. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/39485>. Acesso em: 1 maio 2024.

FORTIER, M. E. *et al.* **The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism.** *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, [S. l.], v. 287, n. 4, out. 2004.

GAO, Feixia *et al.* **Cross-reactive immune responses to monkeypox virus induced by MVA vaccination in mice.** *Virology Journal*, [S. l.], v. 20, p. 126, 19 jun. 2023.

GRÜNER, Eva *et al.* **Mpox-specific immune responses elicited by vaccination or infection in people living with HIV.** *The Journal of infectious diseases*, [S. l.], 13 mar. 2024.

GUBSER, Caroline *et al.* **Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis.** *The Journal of general virology*, [S. l.], v. 85, n. Pt 1, jan. 2004

GUO, Chang *et al.* **Poly I:C promotes malate to enhance innate immune response against bacterial infection.** *Fish & Shellfish Immunology*, [S. l.], v. 131, p. 172–180, 1 dez. 2022.

HERNANDEZ-FRANCO, Juan F. *et al.* **Mechanism of activation of porcine dendritic cells by an  $\alpha$ -D-glucan nanoparticle adjuvant and a nanoparticle/poly(I:C) combination adjuvant.** *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 13, p. 990900, 5 set. 2022.

HONDA-OKUBO, Yoshikazu; BALDWIN, Jeremy; PETROVSKY, Nikolai. **Advax-CpG Adjuvant Provides Antigen Dose-Sparing and Enhanced Immunogenicity for Inactivated Poliomyelitis Virus Vaccines.** *Pathogens*, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 500, maio 2021.

HOWARD, Amanda R.; MOSS, Bernard. **Formation of Orthopoxvirus Cytoplasmic A-Type Inclusion Bodies and Embedding of Virions Are Dynamic Processes Requiring Microtubules.** *Journal of Virology*, [S. l.], v. 86, n. 10, p. 5905–5914, maio 2012.

HU, Y. J. *et al.* **Binding of anti-inflammatory drug cromolyn sodium to bovine serum albumin.** *International journal of biological macromolecules*, [S. l.], v. 39, n. 4–5, 15 nov. 2006.

ISLAM, Md. Rabiul *et al.* **Repositioning potentials of smallpox vaccines and antiviral agents in monkeypox outbreak: A rapid review on comparative benefits and risks.** *Health Science Reports*, [S. l.], v. 5, n. 5, p. e798, 23 ago. 2022.

JIANG, Jiu *et al.* **Antigen sparing and enhanced protection using a novel rOv-ASP-1 adjuvant in aqueous formulation with influenza vaccines.** *Vaccine*, [S. l.], v. 32, n. 23, p. 2696–2702, 13 maio 2014.

KARAGOZ, Aysel *et al.* **Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis.** *Journal of Infection and Public Health*, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 531–541, abr. 2023.

KEECH, Cheryl *et al.* **Phase 1–2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine.** *New England Journal of Medicine*, [S. l.], 10 dez. 2020.

KUEHN, Bridget. **Newer Poxvirus Vaccine Is Recommended.** *JAMA*, [S. l.], v. 328, n. 2, 7 dez. 2022.

LEE, Jueun *et al.* **Protective and vaccine dose-sparing efficacy of Poly I:C-functionalized calcium phosphate nanoparticle adjuvants in inactivated influenza vaccination.** *International Immunopharmacology*, [S. l.], v. 112, p. 109240, 1 nov. 2022.

LI, Entao *et al.* **An mpox quadrivalent mRNA vaccine protects mice from lethal vaccinia virus challenge.** *Antiviral Research*, [S. l.], v. 230, p. 105974, 1 out. 2024.

LI, Heng *et al.* **The land-scape of immune response to monkeypox virus.** *eBioMedicine*, [S. l.], v. 87, p. 104424, 28 dez. 2022.

LIU, Hao *et al.* **Global perspectives on smallpox vaccine against monkeypox: a comprehensive meta-analysis and systematic review of effectiveness, protection, safety and cross-immunogenicity.** *Emerging Microbes & Infections*, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 2387442, [s. d.].

LOURENÇO, Karine Lima *et al.* **The LVD/NIAID/NIH MVA1974 clone as an Mpox vaccine – preclinical assessment upon in a model of lethal infection with *Orthopoxvirus monkeypox* in mice.** *Vaccine*, [S. l.], v. 67, p. 127889, 20 nov. 2025.

MAZZOTTA, Valentina *et al.* **Immunogenicity and reactogenicity of modified vaccinia Ankara pre-exposure vaccination against mpox according to previous smallpox vaccine exposure and HIV infection: prospective cohort study.** *eClinicalMedicine*, [S. l.], v. 68, p. 102420, 12 jan. 2024.

MCCURDY, Lewis H. *et al.* **Modified Vaccinia Virus Ankara Immunization Protects against Lethal Challenge with Recombinant Vaccinia Virus Expressing Murine Interleukin-4.** *Journal of Virology*, [S. l.], v. 78, n. 22, p. 12471–12479, nov. 2004.

MCFADDEN, Grant. **Poxvirus tropism.** *Nature reviews. Microbiology*, [S. l.], v. 3, n. 3, mar. 2005.

MCINNES, Colin J. *et al.* **ICTV Virus Taxonomy Profile: Poxviridae 2023: This article is part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles collection.** *Journal of General Virology*, [S. l.], v. 104, n. 5, 31 maio 2023.

MESEDA, Clement A. *et al.* **Enhanced immunogenicity and protective effect conferred by vaccination with combinations of modified vaccinia virus Ankara and licensed smallpox vaccine Dryvax in a mouse model.** *Virology*, [S. l.], v. 339, n. 2, p. 164–175, 1 set. 2005.

MIRANDA, J. B. *et al.* **Serologic and molecular evidence of Vaccinia virus circulation among small mammals from different biomes, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 23, n. 6, p. 1015–1023, 2017.

MOSS, Bernard. **Membrane fusion during poxvirus entry.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, [S. l.], v. 60, p. 89–96, 1 dez. 2016.

MOSS, Bernard. **Poxvirus Cell Entry: How Many Proteins Does it Take?** *Viruses*, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 688–707, maio 2012.

MOSS, Bernard. **Poxvirus DNA replication.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. [S. l.], v. 5, n. 9, 9 jan. 2013.

MOSS, Bernard. **Poxvirus membrane biogenesis.** *Virology*, [S. l.], v. 479–480, maio 2015.

NAJAH-MISSAOUI, W. *et al.* **Safe Nanoparticles: Are We There Yet?** *International journal of molecular sciences*, [S. l.], v. 22, n. 1, 31 dez. 2020.

O'HAGAN, Derek T.; VALIANTE, Nicholas M. **Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants.** *Nature Reviews. Drug Discovery*, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 727, 2003.

O'HAGAN, Derek; DE GREGORIO, Ennio. **The path to a successful vaccine adjuvant—'the long and winding road'.** *Drug discovery today*, [S. l.], v. 14, n. 11–12, jun. 2009.

OLIVEIRA, Sabryna Brito. **Construção e avaliação do potencial protetor, em modelo murino, de diferentes construções do Vaccinia Virus Ankara Modificado (MVA) expressando a proteína E de Dengue Virus sorotipos 1, 2 e 4.** 2019. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Frequently Asked Questions (FAQ) on use of fractional dosing with intradermal administration of mpox MVA-BN vaccine in the context of vaccine supply-constrained outbreak response.** Genebra: OMS, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/public-advice/mpox-vaccination>. Acesso em: 08 jan. 2026.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Public advice on mpox vaccination.** Genebra: OMS, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/public-advice/mpox-vaccination>. Acesso em: 25 set. 2025.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Smallpox (varíola) — informações gerais.** Genebra: World Health Organization, [s.d.]. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/situations/smallpox>. Acesso em: 08 jan. 2026.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO prequalifies the first vaccine against mpox.** Genebra: OMS, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/13-09-2024-who-prequalifies-the-first-vaccine-against-mpox> Acesso em: 25 set. 2025.

ORLOVA, Olga Vladimirovna *et al.* **Development of Modified Vaccinia Virus Ankara-Based Vaccines: Advantages and Applications.** *Vaccines*, [S. l.], v. 10, n. 9, set. 2022.

OYEWUMI, Moses O; KUMAR, Amit; CUI, Zhengrong. **Nano-microparticles as immune adjuvants: correlating particle sizes and the resultant immune responses.** Expert review of vaccines, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 1095–1107, set. 2010.

PALCHETTI, Sara *et al.* **Structural characterization of cationic liposome/poly(I:C) complexes showing high ability in eliminating prostate cancer cells.** *RSC Advances*, [S. l.], v. 3, n. 46, p. 24597, 2013.

PAN, Y.; LIU, L.; TIAN, T.; *et al.* **Epicutaneous immunization with modified vaccinia Ankara viral vectors generates superior T cell immunity against a respiratory viral challenge.** *npj Vaccines*, 2021.

PARAN, N.; SUTTER, G. **Smallpox vaccines: New formulations and revised strategies for vaccination.** *Human vaccines*, [S. l.], v. 5, n. 12, dez. 2009.

PEREIRA, Adrien Leite *et al.* **Modulation of Cell Surface Receptor Expression by Modified Vaccinia Virus Ankara in Leukocytes of Healthy and HIV-Infected Individuals.** *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 11, p. 2096, 8 set. 2020.

PICKUP, David J. **Extracellular Virions: The Advance Guard of Poxvirus Infections.** *PLoS Pathogens*, [S. l.], v. 11, n. 7, jul. 2015.

PIVA-AMARAL, Raíne *et al.* **Bovine serum albumin nanoparticles containing Poly (I:C) can enhance the neutralizing antibody response induced by envelope protein of Orthoflavivirus zikaense.** *International Immunopharmacology*, [S. l.], v. 128, p. 111523, 15 fev. 2024.

PIVA-AMARAL, Raíne. **Efeito adjuvante de nanopartículas de albumina sérica bovina contendo poli (I:C) em camundongos imunizados com o domínio III da proteína do envelope do Zika virus.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

PULENDRAN, Bali; S. ARUNACHALAM, Prabhu; O'HAGAN, Derek T. **Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants.** *Nature Reviews. Drug Discovery*, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 454–475, 2021.

QU, Na *et al.* **Albumin Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems.** *International Journal of Nanomedicine*, [S. l.], v. 19, p. 6945–6980, 10 jul. 2024.

RAJSRI, S.; RAO, M. **Poxvirus-driven human diseases and emerging therapeutics.** *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, [S. l.], v. 9, p. 20499361221136751, 1 jan. 2022.

REINA, Jordi; IGLESIAS, Carla. **Vaccines against monkeypox**. *Medicina Clínica (English Edition)*, [S. l.], v. 160, n. 7, p. 305–309, abr. 2023.

RICCARDO, Vernuccio; PABLO, Guardado-Calvo. **Neutralization Determinants on Poxviruses**. *Viruses*, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 2396, dez. 2023.

ROLLIER, Christine S. *et al.* **Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight**. *Current opinion in immunology*, [S. l.], v. 23, n. 3, jun. 2011.

RUSSELL, Tiffany A.; TSCHARKE, David C. **Strikingly poor CD8+ T cell immunogenicity of vaccinia virus strain MVA in BALB/c mice**. *Immunology and cell biology*, [S. l.], v. 92, n. 5, p. 466, jun. 2014.

SÁNCHEZ-SAMPEDRO, L. *et al.* **The evolution of poxvirus vaccines**. *Viruses*, [S. l.], v. 7, n. 4, 4 jul. 2015.

SANT'ANA, F. J. F. *et al.* **Outbreaks of vesicular disease caused by Vaccinia virus in dairy cattle from Goiás State, Brazil (2010–2012)**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 33, n. 7, p. 860–866, 2013.

SCHMIDT, Florian Ingo; BLECK, Christopher Karl Ernst; MERCER, Jason. **Poxvirus host cell entry**. *Current Opinion in Virology*, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 20–27, 1 fev. 2012.

SHCHELKUNOVA, G. A.; SHCHELKUNOV, S. N. **Smallpox, Monkeypox and Other Human Orthopoxvirus Infections**. *Viruses*, [S. l.], v. 15, n. 1, 29 dez. 2022.

SILVA, Elisângela F *et al.* **A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice**. *Journal of Nanobiotechnology*, [S. l.], v. 10, p. 13, 22 mar. 2012.

SILVA, Thyago José *et al.* **Vaccinia and Monkeypox Virus-Neutralizing Antibodies in People Living with HIV: A Serological Study in a Orthopoxvirus-Endemic, Low-Income Region in Brazil**. *Pathogens*, [S. l.], v. 14, n. 8, 24 jul. 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/14/8/733>. Acesso em: 6 fev. 2026.

SLOAT, Brian R. *et al.* **Strong Antibody Responses Induced by Protein Antigens Conjugated onto the Surface of Lecithin-Based Nanoparticles**. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, [S. l.], v. 141, n. 1, p. 93–100, 4 jan. 2010.

SOLANKI, Raghu; PATEL, Krunal; PATEL, Sunita. **Bovine Serum Albumin Nanoparticles for the Efficient Delivery of Berberine: Preparation, Characterization and *In vitro* biological studies**. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, [S. l.], v. 608, p. 125501, 5 jan. 2021.

SOSSAI, Paolo *et al.* **Smallpox and monkeypox: Looking back and looking ahead**. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, [S. l.], v. 90, n. 3, seq. Review, p. 141–144, 1 mar. 2023.

SPETH, Martin T. *et al.* **Poly(I:C)-Encapsulating Nanoparticles Enhance Innate Immune Responses to the Tuberculosis Vaccine Bacille Calmette–Guérin (BCG) via Synergistic Activation of Innate Immune Receptors.** *Molecular Pharmaceutics*, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 4098–4112, 6 nov. 2017.

SUN, Y. *et al.* **Human monkeypox virus: Epidemiologic review and research progress in diagnosis and treatment.** *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, [S. l.], v. 171, abr. 2024.

THOMAS, Stephen J. *et al.* **Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, [S. l.], v. 81, n. 5, p. 825–833, nov. 2009.

TIECCO, Giorgio *et al.* **Monkeypox, a Literature Review: What Is New and Where Does This concerning Virus Come From?** *Viruses*, [S. l.], v. 14, n. 9, 27 ago. 2022.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA SAN FRANCISCO. **Routes and volumes of administration in mice.** San Francisco: UCSF, 2024. Disponível em: <https://iacuc.ucsf.edu/sites/g/files/tkssra16261/files/wysiwyg/GUIDELINE%20-%20Routes%20and%20Volumes%20of%20Administration%20in%20Mice.pdf>. Acesso em: 2 out. 2025.

VARMA, Vivek P. *et al.* **LigA formulated in AS04 or Montanide ISA720VG induced superior immune response compared to alum, which correlated to protective efficacy in a hamster model of leptospirosis.** *Frontiers in Immunology*, [S. l.], v. 13, p. 985802, 10 out. 2022.

VIDA, Leandro Ciesielski. **Poxvirus e sua utilização como ferramenta biotecnológica.** 2008. Monografia (Especialização em Microbiologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2008.

VIEIRA JÚNIOR, João Carlos Vilela. **Avaliação do efeito de nanopartículas de albumina sérica bovina associadas ao ácido poliinosínico-policitidílico poli (I:C) sobre o fenótipo de células dendríticas.** 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2021.

VOLZ, A.; SUTTER, G. **Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development.** *Advances in Virus Research*, [S. l.], v. 97, p. 187, 2017.

VOLZ, Asisa *et al.* **Rapid Expansion of CD8+ T Cells in Wild-Type and Type I Interferon Receptor-Deficient Mice Correlates with Protection after Low-Dose Emergency Immunization with Modified Vaccinia Virus Ankara.** *Journal of Virology*, [S. l.], v. 88, n. 18, p. 10946–10957, set. 2014.

VRIELING, Hilde *et al.* **Stabilised aluminium phosphate nanoparticles used as vaccine adjuvant.** *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, [S. l.], v. 181, 9 jan. 2019.

WYATT, Linda S. *et al.* **Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge.** Proceedings of the National Academy of Sciences, [*S. l.*], v. 101, n. 13, p. 4590–4595, 30 mar. 2004.

XIA, Anqi *et al.* **Cross-reactive antibody response to Monkeypox virus surface proteins in a small proportion of individuals with and without Chinese smallpox vaccination history.** BMC Biology, [*S. l.*], v. 21, p. 205, 2 out. 2023.

XIANG, Yan; LANE, Rebecca K. **Vírus da Vacínia (*Poxviridae*).** In: BAMFORD, Dennis H.; ZUCKERMAN, Mark (org.). Encyclopedia of Virology (Fourth Edition). Oxford: Academic Press, 2021. p. 854–859.

YAMANEL, Levent *et al.* **Ozone Therapy and Hyperbaric Oxygen Treatment in Lung Injury in Septic Rats.** International Journal of Medical Sciences, [*S. l.*], v. 8, n. 1, p. 48–55, 3 jan. 2011.

ZHANG, Congcong *et al.* **Immune Responses and Protective Efficacy of Nanoemulsion-Adjuvanted Monkeypox Virus Recombinant Vaccines Against Lethal Challenge in Mice.** Pathogens, [*S. l.*], v. 14, n. 12, 15 dez. 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/14/12/1293>. Acesso em: 9 fev. 2026.

ZHANG, Lijie; WEBSTER, Thomas J. **Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration.** Nano Today, [*S. l.*], v. 4, n. 1, p. 66–80, fev. 2009.

ZHAO, Tingmei *et al.* **Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms.** Signal Transduction and Targeted Therapy, [*S. l.*], v. 8, p. 283, 19 jul. 2023.

ZHOU, Jinge *et al.* **Circular RNA vaccines against monkeypox virus provide potent protection against vaccinia virus infection in mice.** Molecular Therapy, [*S. l.*], v. 32, n. 6, p. 1779–1789, 5 jun. 2024.

ZHU, Leqing *et al.* **Yeast Shells Encapsulating Adjuvant AS04 as an Antigen Delivery System for a Novel Vaccine against *Toxoplasma Gondii*.** ACS Applied Materials & Interfaces, [*S. l.*], v. 13, n. 34, p. 40415–40428, 1 set. 2021.

ZHU, Motao; WANG, Rongfu; NIE, Guangjun. **Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants.** Human Vaccines & Immunotherapeutics, [*S. l.*], v. 10, n. 9, p. 2761–2774, 17 nov. 2014.

ZUMLA, Alimuddin *et al.* **Monkeypox outbreaks outside endemic regions: scientific and social priorities.** The Lancet. Infectious Diseases, [*S. l.*], v. 22, n. 7, p. 929–931, jul. 2022.

## ANEXO A - TABELA DE REGISTRO DE MONITORAMENTO DO ANIMAL APÓS PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA NECESSIDADE DO PONTO FINAL HUMANITÁRIO

TABELA 1 - Registro de monitoramento do animal após procedimento para determinação da necessidade do ponto final humanitário		Animal					
		Peso inicial					
Título do projeto:							
Número de aprovação da CEUA:							
Responsável pelo monitoramento:							
Procedimento realizado:							
Data do procedimento							
Identificação do animal							
	Data						
	Hora						
	Peso						
Aparência	Normal	0					
	Falta de limpeza geral	1					
	Descarga nasal e ocular	2					
Ingestão de água e ração	Piloereção, encurvado	3					
	Normal	0					
	Incerta: perda de peso < 5%	1					
Grímaca scale	Perda de peso entre 0-15%	2					
	Sem ingestão de água ou ração (perda de peso maior do que 20%)	3					
	Alterações não presentes (score médio = 0)	0					
Comportamento natural	Alterações leves presentes (score médio ≥ 0,5 a 0,9)	1					
	Alterações moderadas presentes (score médio ≥ 0,1 a 1,4)	2					
	Alterações severas presentes (score médio ≥ 1,5 a 2)	3					
	Normal	0					
Comportamento provocado	Mudança mínima	1					
	Menos móvel, mas alerta / isolado	2					
	(não alerta)	3					
Score	Normal	0					
	Mínima depressão/resposta exagerada	1					
	Moderadas mudanças no aspecto comportamental	2					
	Reação violenta ou fraco e pré-comatoso	3					
	<b>Se teve score 3 mais de uma vez, some 1 ponto a cada 3 score</b>						
	<b>TOTAL</b>						

0-4 = normal

5-9 = monitorar com atenção, considerar o uso de analgésicos.

10-14 = sofrimento, prover alívio, observar regularmente. Busque segunda opinião ou chame o veterinário. Considere a eutanásia.

15-20 = dor severa. Considere a eutanásia. Revise os procedimentos de seu protocolo experimental.

### CONCLUSÃO DO CHECK LIST DE PONTO FINAL HUMANITÁRIO

	SIM	NÃO
1 - O animal acima avaliado foi eutanasiado?		
2 - Se <b>NÃO</b> , qual a conduta adotada? Justifique		
3 - Se <b>SIM</b> , qual o método adotado?		

Data:

Assinatura do responsável