

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

Renata Zorzetto

**Nanopartícula polimérica contendo
óleo de babaçu para o
encapsulamento do peptídeo
imunodominante do *Herpes simplex*
vírus**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2024

Renata Zorzetto

**Nanopartícula polimérica contendo
óleo de babaçu para o
encapsulamento do peptídeo
imunodominante do *Herpes simplex*
vírus**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências da
Fundação Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do
grau de Doutor

Orientador: Luiz Carlos Rodrigues Junior
Co-orientadora: Tanira Alessandra Silveira Aguirre

**Porto Alegre
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação

Zorzetto, Renata

Nanopartícula polimérica contendo óleo de babaçu para o encapsulamento do peptídeo imunodominante do Herpes simplex virus / Renata Zorzetto. -- 2024.

154 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2024.

Orientador(a): Luiz Carlos Rodrigues Junior ;
coorientador(a): Tanira Alessandra Silveira Aguirre.

1. Nanociências. 2. Herpes simplex virus. I. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

CAPES - Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

UFCSPA – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à ciência e à saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que me acompanha em todos os momentos de minha existência.

Agradeço a todos que fazem parte da minha família – os que aqui estão e os que já partiram - pelo amor, carinho, compreensão e incentivo à educação e à busca pelo conhecimento durante toda a minha vida.

Agradeço aos amigos mais próximos, os quais sempre estiveram comigo durante toda a caminhada.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da UFCSPA pelo auxílio e condução desde o início do Doutorado.

Agradeço ao meu Orientador, Professor Luiz Carlos Rodrigues Junior, por todo apoio recebido durante os quatro anos de Doutorado, bem como agradeço à minha Co-orientadora, Professora Tanira Alessandra Silveira Aguirre, pelo apoio e por possibilitar a minha inserção na área da Nanotecnologia. Agradeço, ainda, à Comissão de Acompanhamento, a qual foi composta pelos Professores Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino e Pedro Roosevelt Torres Romão.

Agradeço a todos os colegas da UFCSPA que tiveram alguma participação neste trabalho. Em especial, agradeço aos colegas dos Laboratórios de Immunovirologia, Farmacociências, Imunologia Celular e Imunoterapia por toda ajuda recebida e toda troca de conhecimento.

Agradeço à CAPES, à FAPERGS e à UFCSPA pelo suporte financeiro deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	8
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Herpes simplex vírus (HSV).....	15
1.2 Resposta imune e vacinas.....	24
1.3 Tratamento para os HSVs.....	30
1.4 Peptídeo imunodominante dos HSVs (SSIEFARL).....	31
1.4.1 Linfócitos T Residentes de Memória (TRM).....	33
1.5 Nanotecnologia.....	40
1.5.1 Nanotecnologia no carreamento de peptídeos.....	46
1.5.1.1 Babaçu.....	49
1.5.2 Nanotecnologia na produção de produtos imunoterapêuticos.....	51
1.5.3 Nanotecnologia para drug delivery em mucosas.....	54
1.5.4 Nanopartículas em um sistema de hidrogel.....	57
1.5.5 Aplicações da Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) na Nanotecnologia.....	60
2 OBJETIVOS.....	63
2.1 Geral.....	63
2.1.1 Específicos	63
3 ARTIGO CIENTÍFICO	64
4 PRODUÇÃO DE GELNANOSSIEFARL	78

5 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>.....	78
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES	78
8 REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO A – PARECER CEUA	104
ANEXO B – CURRÍCULO LATTES.....	108
ANEXO C – COAUTORIA DE ARTIGO CIENTÍFICO 1	111
ANEXO D – COAUTORIA DE ARTIGO CIENTÍFICO 2	124
ANEXO E – COAUTORIA DE CAPÍTULO DE LIVRO	136

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

3-OSHS - 3-O-sulfatado de heparan sulfato

ACN - Acetonitrila

APC - Célula apresentadora de antígeno

BBS - Óleo de babaçu

CCR7 - *C-C Chemokine Receptor 7*

CD101 - *Cluster of Differentiation 101*

CD103 - *Cluster of Differentiation 103*

CD49a - *Cluster of Differentiation 49a*

CD62L - *Ligante do Cluster of Differentiation 62*

CD69 - *Cluster of Differentiation 69*

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE - DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos

CMV - Citomegalovírus

CpG - Oligodeoxinucleotídeo CpG

CX3CR1 - *CX3C Motif Chemokine Receptor 1*

CXCR3 - *C-X-C Motif Chemokine Receptor 3*

CXCR6 - *C-X-C Motif Chemokine Receptor 6*

dsDNA - DNA de fita dupla

E - Genes Precoces

EA - Eficiência de associação

EBV - Epstein-Barr vírus

EHL - Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

FA - Fase aquosa

FDA - *Food and Drug Administration*

FO - Fase orgânica

gB - Glicoproteína viral B

gD - Glicoproteína viral D

GeINanoSSIEFARL - Nanopartícula com hidrogel

GeISSIEFARL - Hidrogel com SSIEFARL

gH - Glicoproteína viral H

gL - Glicoproteína viral L

H&E - Hematoxilina & Eosina

HCF - Fatores de célula hospedeira

HHV-6 - Herpes vírus humano 6

HHV-7 - Herpes vírus humano 7

HHV-8 - Herpes vírus humano 8

HIV - Vírus da Imunodeficiência Adquirida

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography

HPV - Papilomavírus Humano

HS - Heparan sulfato

HSV - *Herpes simplex* vírus

HSV-1 - *Herpes simplex* vírus tipo 1

HSV-2 - *Herpes simplex* vírus tipo 2

IBN - Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia

ICH - *International Conference on Harmonisation*

IE - Genes Precoces Imediatos

IFA - Ingrediente farmacêutico ativo

IFN - Interferon

IFN-I - Interferon tipo I

IFN γ - Interferon gama

IL-10 - Interleucina 10

IL-15 - Interleucina 15

IL-2 - Interleucina 2

IL-21 - Interleucina 21

IL-33 - Interleucina 33

KLF2 - Fator do tipo Krueppel 2

KLRG1 - *Killer Cell Lectin Like Receptor G1*

L - Genes Tardios

L - Longo

LATs - Genes associados à latência

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MHC - Moléculas de histocompatibilidade

mL - Mililitros

mRNA - RNA mensageiro

MS - Espectrometria de Massas

Nano Branca - Nanopartícula sem SSIEFARL

NanoSSIEFARL - Nanopartícula com SSIEFARL

NK - Células Natural Killer

nm - Nanômetro

NP - Nanopartícula

ODN - Oligodeoxinucleotídeo

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCL - Policaprolactona

PD&I - Pesquisa, desenvolvimento e inovação

PD-1 - *Programmed Cell Death 1*

ICAM-1 - Proteína de adesão leucocitária intercelular 1

PEO - Polímero polietileno glicol

PF-127 - Pluronic® F-127

PGA - Polímero ácido poliglicólico

PLA - Polímero poliácido láctico

PLGA - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

POE - Polímero elastômero de poliolefina

RR2 - Ribonucleotídeo redutase

RSD - Desvio padrão relativo

S - Curto

S1PR1 - Receptor 1 de esfingosina-1-fosfato

SDD - Sistema de *drug delivery*

T0 - Tempo zero

T30 - Tempo 30 dias

TCM - Linfócitos T Centrais de Memória

TCM - Triglicerídeo de Cadeia Média

TCR - Receptor de célula T

TEM - Linfócitos T Efetores de Memória

TFA - Ácido trifluoroacético

TK – Timidina quinase

TLR9 - Receptor do tipo *Toll* 9

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

TRM - Linfócitos T Residentes de Memória

VHS - Proteína de desligamento do vírion hospedeiro

VLA-1 - Molécula de adesão vascular-1

VPs - Proteínas virais

VZV - Varicela Zoster vírus

α -TIF - Fator transindutor α

μ g - Micrograma

μ m - Micrômetro

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Estrutura viral do HSV.....	17
Figura 2. Apresentação de antígeno e reconhecimento celular.....	32
Figura 3. Linfócitos T de memória.....	35
Figura 4. Modelo de célula TRM de pele.....	37
Figura 5. Dinâmica de linfócitos durante a infecção/recidiva do HSV.....	39
Figura 6. Modelos de nanopartículas.....	44
Figura 7. Babaçu e óleo extraído do côco do babaçu.....	50
Tabela 1. Exemplos de fármacos associados à nanopartículas com aprovação do FDA.....	52
Figura 8. GelNanoSSIEFARL.....	59

RESUMO

O *Herpes simplex* vírus tipo 2 (HSV-2) é o agente causador de uma doença infecciosa genital que acomete milhões de indivíduos mundialmente e que não tem cura nem vacina disponível. Portanto, alternativas terapêuticas para melhorar a resposta imune específica da mucosa são extremamente necessárias. SSIEFARL é um peptídeo murino de 8 aminoácidos da glicoproteína B do HSV considerado um peptídeo imunodominante de células T CD8⁺ em camundongos. Durante a infecção por HSV-2 em camundongos, mais de 50 % de todas as células T CD8⁺ são contra SSIEFARL, e a proteção da mucosa mediada por células T CD8⁺ é crucial para diminuir a recorrência do HSV-2 e a transmissão viral. Nanopartículas (NPs) foram descritas como sistemas de distribuição de medicamentos para peptídeos. Para avaliar o potencial uso do peptídeo imunogênico do HSV em um sistema de *drug delivery* (SDD), desenvolvemos e caracterizamos nanopartículas poliméricas contendo SSIEFARL (NanoSSIEFARL) na concentração final de 20 µg/mL e volume final de 10 mL. Após a produção das nanopartículas, o sistema foi incorporado a um hidrogel termorresponsivo (GelNanoSSIEFARL) para facilitar sua aplicação na mucosa e controlar melhor o perfil de liberação da NanoSSIEFARL. Além disso, descrevemos uma nova metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para caracterizar SSIEFARL e as nanopartículas. O sistema nanoestruturado desenvolvido e incorporado ao gel proporciona resultados promissores e está apto para futuros ensaios *in vivo*.

ABSTRACT

Herpes simplex 2 (HSV-2) is the causative agent of a worldwide concerning genital infection disease that has no cure or available vaccine. Therefore, therapeutic alternatives to improve the specific mucosal immune response are extremely necessary. SSIEFARL is a murine 8-amino-acid peptide from the glycoprotein B of HSV, and it is considered a CD8⁺ T cell immunodominant peptide in mice. During HSV-2 infection in mice, over 50 % of all CD8⁺ T cells are against SSIEFARL, and mucosal protection mediated by CD8⁺ T cells is crucial to decrease HSV-2 recurrence and viral transmission. Nanoparticles (NPs) have been described as drug delivery systems (DDS) for peptides. To evaluate the potential use of HSV's immunogenic peptide in a nanodelivery system, we developed and characterized polymeric nanoparticles containing SSIEFARL (NanoSSIEFARL) at a final concentration of 20 µg/mL with a final volume of 10 mL. After producing the nanoparticles, the system was incorporated into a thermoresponsive hydrogel (GelNanoSSIEFARL) to facilitate its mucosal application and to better control the release profile of NanoSSIEFARL. Furthermore, we described a novel High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) methodology to characterize SSIEFARL and the nanoparticles. The developed nanostructured system incorporated into the gel provides promising results and it is suitable for future tests *in vivo*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Herpes simplex vírus (HSV)

Os vírus *Herpes simplex* tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) causam herpes oral e genital, respectivamente (1,2). Todavia, estudos já demonstraram que ambos os tipos podem infectar as duas regiões. Segundo os últimos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) datados de abril de 2023, a grande maioria da população mundial já entrou em contato com o herpes, com estimativa de que 3,7 bilhões de pessoas com menos de 50 anos estejam infectadas com HSV-1 (67 %) e 491 milhões com idades entre 15 e 49 anos estejam infectadas com HSV-2 (13 %) (3). A maioria dos casos é assintomática, mas os sintomas de herpes incluem bolhas ou úlceras na região labial e/ou genital, as quais podem reaparecer com o tempo. Isso porque o HSV tem a capacidade de estabelecer uma infecção latente nos gânglios nervosos e, após a sua reativação, podem ocorrer novos episódios sintomáticos com alta taxa de recorrência.

A família *Herpesviridae* inclui mais de 200 membros capazes de infectar diferentes espécies e, entre eles, oito são conhecidos por causar doenças em humanos (4). Os herpesvírus humanos são agrupados em três subfamílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammapherpesvirinae*, com base na estrutura do genoma, tropismo tecidual, presença de efeito citopatológico, local da infecção, patogênese e manifestações da doença (5). Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* têm a capacidade de infectar uma ampla variedade de hospedeiros. O ciclo reprodutivo curto, a capacidade de se espalhar rapidamente entre as células, lisar células infectadas de maneira eficiente e o estabelecimento de infecções latentes nos gânglios sensoriais são as principais características. A subfamília inclui os seguintes gêneros: *Simplexvirus* – vírus *Herpes simplex* tipos 1 e 2 e varicelovírus – vírus varicela-zoster (VZV). Os membros da subfamília *Betaherpesvirinae* têm uma faixa de hospedeiros restrita e um ciclo replicativo longo, com progressão lenta da infecção em culturas celulares. Existem dois gêneros: Citomegalovírus — citomegalovírus humano (CMV) e Roseolovírus — herpesvírus humano tipos 6

e 7 (HHV-6 e HHV-7). Os vírus da subfamília *Gammaherpesvirinae* estabelecem infecções latentes principalmente nas células linfoblastóides. Alguns podem produzir infecções líticas nas células epiteliais e fibroblásticas e tem potencial oncogênico. Contém os gêneros: Linfocriptovírus – vírus Epstein-Barr (EBV) e Rhadinovírus – herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) (4,6).

O HSV é um vírus envelopado com um genoma linear de DNA de cadeia dupla fechado por capsídeo icosaédrico composto de 162 capsômeros. O virion é esférico com 186 nm de diâmetro com picos de glicoproteínas ancorados ao envelope (7). O genoma consiste em dois componentes ligados covalentemente, designados como L (longo) e S (curto). Cada componente é formado por sequências únicas flanqueadas por regiões de sequências repetidas e invertidas que facilitam a replicação do genoma (5). O peso molecular do DNA é estimado em aproximadamente 150 kbp, com conteúdo G+C de 68 % para HSV-1 e 69 % para HSV-2 (8). O capsídeo é composto pelas proteínas virais (VPs) VP5, VP19C, VP23, VP24, VP26 e pela proteína codificada pelo gene UL6 (9). Entre o capsídeo e o envelope, encontra-se uma camada proteica amorfa chamada tegumento, o qual é composto por mais de 20 proteínas importantes na regulação do ciclo replicativo viral e entre elas estão: o fator transindutor α (α -TIF), conhecido como VP16, envolvido na transcrição de genes precoces imediatos (IE); a proteína de desligamento do vírion hospedeiro (VHS) ou VP22, responsável pela degradação do RNA mensageiro (mRNA) da célula hospedeira no citoplasma; e a VP1-2 que pode desempenhar um papel na liberação de DNA no poro nuclear durante a entrada viral. O envelope consiste em uma bicamada lipídica e ancora aproximadamente 11 glicoproteínas virais, quatro das quais (gB, gD, gH e gL) são essenciais para a entrada do vírus nas células (7) (Figura 1).

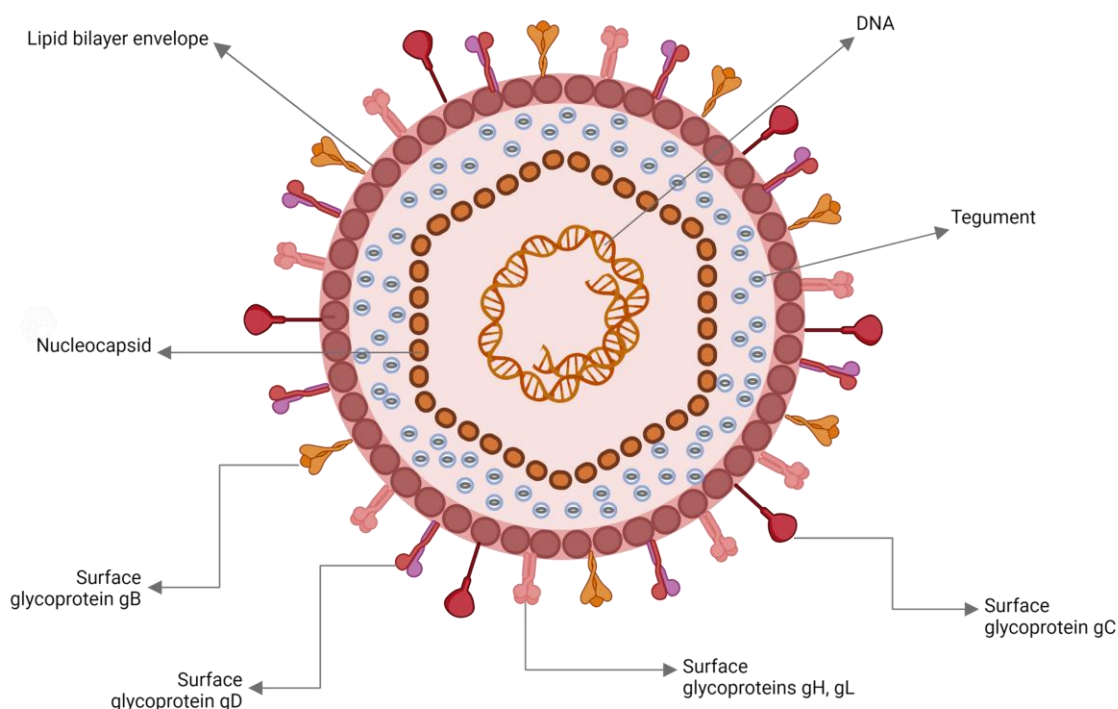


Figura 1. Estrutura viral do HSV. O HSV é um vírus grande, com um núcleo contendo DNA de fita dupla (dsDNA) dentro de um nucleocapsídeo - um icosaedro com 162 capsômeros. O diâmetro de uma partícula completa é de 120 a 200 nm e o vírion em si mede cerca de 100 nm. O envelope que envolve a partícula é composto com bicamada lipídica, sendo parcialmente derivado da membrana nuclear e possuindo espículas de glicoproteína em sua superfície. O vírus entra nas células através da fusão da membrana celular após ser ligado a receptores específicos através de uma glicoproteína do envelope. O capsídeo é transportado para os poros nucleares onde o DNA circulariza após o desenvolvimento e adentra o núcleo (10).

A infecção é iniciada pela adsorção, mediada por glicoproteínas virais que se ligam às cadeias de glicosaminoglicanos, presentes na superfície celular. Dentre elas, o heparan sulfato (HS) é considerado o principal receptor de ligação ao HSV, tendo papel fundamental na adesão das glicoproteínas gC e gB na superfície da célula-alvo (11). A interação de gC e gB com o receptor HS é instável até a participação de gD no processo. Vários receptores celulares para gD são conhecidos como o mediador de entrada do vírus do herpes, as nectinas 1 e 2, e uma forma específica de HS chamada 3-O-sulfatado de heparan sulfato (3-OSHS) (12). Quando a gD interage com um desses receptores, sua cadeia polipeptídica sofre uma alteração conformacional permitindo a interação com o heterodímero H/gL. Essa interação expõe os domínios de fusão de gB e do heterodímero levando à fusão do envelope viral

com a membrana plasmática da célula-alvo (11). Após a penetração no citoplasma, o nucleocapsídeo é transportado através dos microtúbulos do citoesqueleto até um poro da membrana nuclear, onde o DNA viral é liberado no núcleo. No núcleo da célula, a proteína tegumentar VP16 forma complexos com uma proteína celular denominada fator de célula hospedeira (HCF) e interage com a proteína de ligação ao octâmero Oct-1 associada ao DNA viral, formando o ativador ou complexo de pré-iniciação. Os processos de transcrição e replicação do genoma viral, bem como a montagem dos capsídeos da progênie, ocorrem dentro do núcleo (8). O ciclo lítico do HSV envolve a expressão regulada de maneira sequencial e coordenada de três conjuntos de genes virais: α ou precoce imediato (IE), β ou precoce (E) e γ ou tardio (L).

Inicialmente, o DNA viral é transcrito pela RNA polimerase II da célula hospedeira e os primeiros genes a serem transcritos são os genes IE. Após a formação do complexo ativador, seis proteínas IE são sintetizadas nos estágios iniciais de uma infecção produtiva: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e uma proteína codificada pelo gene $Us1.5$. O pico de síntese dessas proteínas ocorre aproximadamente 3 horas após a infecção. Uma vez acumuladas em quantidade suficiente, as proteínas α retornam ao núcleo para ativar a transcrição e tradução dos genes β , em proteínas iniciais ou polipeptídeos β , responsáveis pela replicação do ácido nucleico viral, incluindo DNA polimerase e timidina quinase. O pico da síntese protéica precoce ocorre 6 horas após a infecção. À medida que as proteínas β são expressas, diversas proteínas celulares migram para o núcleo e se reúnem para formar o complexo de replicação nos locais pré-replicativos onde começa a síntese do DNA viral (13). Após a replicação do genoma, o terceiro grupo de genes é expresso. Os genes γ são regulados pelas proteínas α e β e codificam proteínas tardias que formam as proteínas estruturais do vírus, como proteínas do tegumento e do capsídeo e *spikes* de glicoproteínas. A formação do capsídeo ocorre através de proteínas de estrutura que são transportadas para o núcleo (14). A transição do nucleocapsídeo do espaço entre as membranas nucleares interna e externa para a membrana citoplasmática ainda não está bem definida. Três hipóteses foram propostas: envoltório duplo, envoltório nuclear único e envoltório

citoplasmático único. O processo de replicação leva aproximadamente 18 a 20 horas e a saída do vírus das células é dependente de gD e gH (8).

A transmissão do HSV depende de contato íntimo e pessoal entre um indivíduo suscetível e um indivíduo que está excretando o vírus, ou mesmo por fômites as quais tenham quantidades significativas de vírus. Para que a infecção seja iniciada, o vírus deve entrar em contato direto com superfícies mucosas ou pele (15). Geralmente, as infecções por HSV-1 são limitadas à orofaringe e o vírus é transmitido por gotículas respiratórias ou saliva, e mais frequentemente por beijos. O HSV-2 é principalmente transmitido através da atividade sexual (16).

Após a replicação do vírus no local de entrada, o vírion intacto ou seu nucleocapsídeo são transportados através do fluxo axonal retrógrado para os gânglios sensoriais, onde a latência é estabelecida, preferencialmente no gânglio trigeminal para o HSV-1 e nas raízes sacrais dorsais para o HSV-2. As recorrências ocorrem quando o vírus latente é reativado, sendo transportado pelo fluxo axonal anterógrado para a região da infecção primária (13). O processo de reativação da latência é desencadeado por estímulos locais, como lesão ao tecido innervado por neurônios que abrigam o HSV latente, ou por fatores sistêmicos como estresse físico ou emocional, febre, exposição à luz ultravioleta, menstruação e desequilíbrio hormonal (8).

As células infectadas sofrem alterações estruturais e bioquímicas induzidas pela replicação viral. Entre as alterações estruturais estão modificações na cromatina celular, membranas internas e de superfície celular, fragmentação e dispersão das membranas do complexo de Golgi, inserção de proteínas virais nas membranas celulares, rearranjo da rede de microtúbulos e formação de corpos de inclusão intranucleares. Além disso, ocorrem mudanças na maquinaria de expressão proteica da célula, como o bloqueio da síntese de proteínas, degradação do mRNA, bloqueio da transcrição e redução da síntese de RNA, inibição do processamento do mRNA e degradação seletiva de proteínas (8).

Geralmente, o envolvimento orofaríngeo ocorre na infecção primária por HSV-1. Há uma grande variedade de sintomas durante a infecção, que podem variar desde assintomáticos até uma combinação de febre, úlceras na

garganta, lesões ulcerativas e vesiculares, gengivoestomatite (geralmente, na infecção primária por HSV-1 em crianças e adolescentes), edema, linfadenopatia localizada, anorexia e dor. Os casos sintomáticos geralmente afetam os lábios, língua, gengiva, mucosa bucal e palato (7). A maioria dos casos de herpes genital é causada pelo HSV-2, embora a prevalência do HSV-1 esteja aumentando, principalmente em jovens, devido à prática de sexo oral. O herpes genital é caracterizado por vesículas ulcerativas no pênis e no colo do útero, vulva, vagina ou períneo (17). A reativação da infecção orofacial - e também genital - é anunciada por um estágio no qual o paciente sente dor, sensação de queimação, coceira ou formigamento. Outras manifestações incluem ceratoconjuntivite, lesões cutâneas por cortes ou abrasões na pele, glossite e eritema multiforme, uma erupção cutânea rara na parte de trás dos braços e das mãos (7). Em recém-nascidos, a infecção por HSV pode causar uma doença generalizada, devastadora e, muitas vezes, fatal, chamada "infecção generalizada do recém-nascido", adquirida intraútero ou durante o parto vaginal natural, ou pós-natalmente por membros da família ou ambiente hospitalar (5). A encefalite, uma das complicações após a infecção primária, está associada a uma alta taxa de mortalidade e sequelas neurológicas entre os sobreviventes. Pacientes comprometidos por desnutrição e imunossupressão estão em risco aumentado para infecções graves por HSV, pois as lesões por HSV podem se espalhar e esses pacientes podem desenvolver doença progressiva envolvendo o trato respiratório, esôfago e mucosa intestinal (15,18).

Atualmente, não existem vacinas aprovadas e o tratamento contra os HSVs inclui medicamentos antivirais como Aciclovir®, Famciclovir® e Valaciclovir®. Embora possam funcionar muito bem para alguns pacientes, a sua eficácia é limitada e a resistência viral aos medicamentos tem sido amplamente descrita (19–21). Existem várias mutações conhecidas que podem levar à resistência dos HSVs ao aciclovir. Uma das mutações mais comuns ocorre no gene da timidina quinase (TK), uma enzima viral essencial para a ativação do aciclovir dentro da célula infectada. A mutação mais comum é a substituição de aminoácidos na região conservada da TK, impedindo sua capacidade de fosforilar eficientemente o aciclovir, tornando o vírus menos

suscetível aos efeitos antivirais do medicamento. Mutações no gene da DNA polimerase viral - enzima responsável pela replicação do DNA viral durante o ciclo de replicação do HSV - também podem contribuir para a resistência ao aciclovir. Essas mutações podem alterar a estrutura da DNA polimerase, reduzindo sua afinidade pelo aciclovir ou aumentando sua capacidade de continuar replicando o DNA viral, mesmo na presença do medicamento (22–25). O processo de desenvolvimento da resistência ao aciclovir pode ocorrer durante o tratamento prolongado com o medicamento, já que a pressão seletiva exercida pelo aciclovir favorece o crescimento e a propagação de variantes virais com mutações que conferem resistência ao medicamento. É importante ressaltar que a resistência ao aciclovir pode variar entre diferentes cepas de HSV e em diferentes contextos clínicos, podendo ter implicações significativas no manejo clínico das infecções por HSV, exigindo abordagens terapêuticas alternativas.

No Brasil, é possível observar uma grande procura para tratamentos não convencionais como, por exemplo, o uso de extrato de própolis, extrato de camomila ou polivitamínicos, que teriam efeito antiviral e/ou efeito protetor relacionado ao sistema imune. O extrato de própolis contém compostos bioativos, como flavonoides e ácidos fenólicos, que demonstraram possuir atividades antivirais contra o HSV. Esses compostos podem ajudar a inibir a replicação viral e reduzir a carga viral, contribuindo para a resolução das lesões (26). O extrato de camomila é conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes. Ele pode ajudar a reduzir a inflamação e o desconforto associados às lesões causadas pelo herpes, além de promover a regeneração da pele danificada (27). Em relação à suplementação com polivitamínicos, a mesma pode ser benéfica no tratamento do herpes, uma vez que vitaminas e minerais desempenham papéis importantes no funcionamento do sistema imunológico e manter o sistema imunológico saudável é essencial para controlar infecções virais. Vitaminas como a vitamina C, vitamina E, vitaminas do complexo B e minerais como o zinco são conhecidos por melhorar a função imunológica e podem ajudar a reduzir a gravidade e a duração das lesões (28,29).

De acordo com os estudos epidemiológicos de HSVs, o número de casos de recidivas ou recorrências virais pode chegar a até 10 casos por ano (30–34). Diversos fatores podem ocasionar um caso de recidiva viral como estresse físico ou emocional, desequilíbrio químico ou hormonal, exposição solar, imunossupressão, entre outros (35,36), e a intensidade e a frequência das recidivas podem estar relacionadas ao aumento da transmissão de outras infecções, impactando na qualidade de vida e até causando problemas psicológicos (37–41). A presença do HSV-2 aumenta em até 50 % o risco de aquisição, excreção e transmissão do vírus da Imundeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), podendo acelerar a progressão da doença, e também está associada a um aumento de aproximadamente 3 vezes no risco para carcinoma cervical invasivo em mulheres positivas para o DNA do Papilomavírus Humano (HPV) (42–44). Isso porque, além das lesões genitais herpéticas criarem pontos de entrada para outros vírus, a infecção por HSV-2 desencadeia uma resposta inflamatória local, recrutando células imunes para o local da infecção. Essa inflamação crônica pode aumentar a concentração de linfócitos T CD4+, os quais são células-alvo do HIV, e de outros tipos de células imunes no tecido genital, tornando-o um ambiente mais favorável para a infecção pelo HIV e outros vírus, como o vírus do HPV (45). Ainda, a infecção por HSV-2 pode aumentar a expressão de receptores celulares, como as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), que são utilizadas pelo HIV e pelo HPV para a entrada na célula hospedeira (44).

A infecção por HSV-2 também está associada ao herpes neonatal, que pode causar sequelas irreversíveis ao recém-nascido. O herpes neonatal é uma condição grave e potencialmente fatal na qual ocorre a transmissão vertical do HSV-2 para o recém-nascido durante o parto. As lesões ativas, ou úlceras, são altamente contagiosas e contêm uma alta carga viral, aumentando significativamente o risco de transmissão para o bebê e, mesmo na ausência de lesões ativas visíveis, o trauma durante o parto, como lacerações ou abrasões na mucosa genital da mãe ou na pele do bebê durante a passagem, pode facilitar a entrada do vírus no corpo do recém-nascido. O herpes neonatal pode se apresentar de diversas formas, incluindo a forma localizada (lesões cutâneas, mucosas ou oculares) e a forma disseminada, que pode ser fatal se

não tratada rapidamente. Ainda, fatores de risco maternos, como infecção primária por HSV-2 durante a gravidez, aumento da carga viral, histórico prévio de herpes neonatal em gestações anteriores e ausência de supressão antiviral durante o trabalho de parto podem aumentar o risco de transmissão (46,47). Além disso, os recém-nascidos tem um sistema imunológico imaturo, o que os torna mais suscetíveis à infecção pelo HSV-2, já que a capacidade do bebê de montar uma resposta imune eficaz contra o vírus é limitada, o que facilita a replicação viral. Nos casos de herpes neonatal em que ocorre infecção disseminada, órgãos como o cérebro (encefalite herpética), fígado e pulmões podem ser acometidos (48).

Outro fator associado ao herpes genital é que o mesmo possui um forte estigma (49), já que os indivíduos acometidos, principalmente aqueles que sofrem com frequentes casos de recidivas, têm receio de relatar a sua experiência. Isso pode estar associado ao fato de que é de conhecimento comum que o herpes genital é uma infecção sexualmente transmissível (IST). Contudo, muitos desconhecem a capacidade do vírus de estabelecer latência e poder ser reativado sem um segundo contato sexual. Esse estigma associado ao herpes genital pode impedir que muitos indivíduos procurem assistência médica e, como resultado, há uma lacuna na quantidade de diagnósticos realizados, o que tem um impacto direto nos dados epidemiológicos disponíveis em todo o mundo. No Brasil, os últimos dados epidemiológicos foram obtidos através de estudo transversal realizado entre os anos de 1996 e 1997, que analisou 1.090 indivíduos da população geral com idades entre 1 e 40 anos. Nesse estudo, as soroprevalências de anticorpos para HSV-1 e HSV-2, ajustadas por idade, foram 67,2 % e 11,3 %, respectivamente. Ainda, dados do ano de 2010 mostram uma estimativa de 640 mil novos casos de herpes a cada ano no Brasil (50). Se levarmos em consideração os dados epidemiológicos do Brasil e do mundo, é possível observar que a prevalência de indivíduos infectados com HSV-1 é maior do que o HSV-2. No entanto, com o estigma associado ao HSV-2 juntamente com a falta de diagnósticos e, conseqüentemente, a falta de dados epidemiológicos, pode-se concluir que os dados epidemiológicos acerca do HSV-2 estão defasados tanto no Brasil quanto no mundo.

Portanto, tendo conhecimento de que o herpes genital pode causar recorrências e aumentar as chances de infecção por outro patógeno como HIV e HPV, além da resistência do vírus a medicamentos antivirais disponíveis e da subnotificação dos casos, pode-se concluir que esse cenário representa uma preocupação significativa para a saúde pública. Por isso, o desenvolvimento de um novo tratamento eficaz contra os HSVs com potencial de reduzir o número de recorrências se torna extremamente necessário.

1.2 Resposta imune e vacinas

O ponto de partida para a resposta imunológica contra vírus é o reconhecimento feito por células sentinelas, como macrófagos e células dendríticas, que atuam como as primeiras linhas de defesa, detectando padrões moleculares associados a patógenos virais. Essas células apresentam fragmentos virais aos linfócitos T, iniciando a cascata de eventos imunológicos (51). A resposta imunológica divide-se em componentes celulares e humorais, onde as células T citotóxicas desempenham um papel vital na eliminação de células infectadas por vírus, enquanto as células B produzem anticorpos específicos que neutralizam os vírus circulantes, além do sistema complemento e citocinas (52). Além das células, existem os interferons (IFNs), que são moléculas-chave na resposta antiviral. Produzidos em resposta à infecção, esses mediadores desencadeiam uma série de eventos, inibindo a replicação viral dentro das células hospedeiras, bloqueando a síntese de proteínas virais e a transcrição do RNA viral, impedindo assim a produção de novas partículas virais, além de alertar células como macrófagos e os linfócitos T, aumentando sua capacidade de reconhecer e destruir as células infectadas pelo vírus. Eles também promovem a diferenciação e a ativação de células *natural killers* (NK), que são células citotóxicas capazes de eliminar as células infectadas. Além de sua ação antiviral direta, os interferons desempenham um papel importante na modulação da resposta imune adaptativa, pois promovem a maturação e a ativação de células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas, e aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, que ajudam a coordenar a resposta imune contra o vírus. (53,54).

Os HSVs exibem uma considerável variabilidade genética, tanto dentro de uma mesma cepa viral quanto entre diferentes cepas. Essa variabilidade é resultado de vários processos, incluindo mutação, recombinação e seleção natural. As mutações podem afetar diferentes regiões do genoma viral, incluindo genes que codificam proteínas estruturais, enzimas virais e proteínas envolvidas na evasão imunológica, e a taxa de mutação pode variar dependendo de fatores como a taxa de replicação viral, a atividade da maquinaria de reparo de DNA viral e a presença de pressões seletivas. A variabilidade genética dos HSVs pode ter importantes implicações clínicas e epidemiológicas. Por exemplo, diferentes genótipos virais podem exibir variações na virulência, na patogenicidade e na resposta a tratamentos antivirais. Essa variabilidade também pode influenciar a eficácia das estratégias de prevenção e controle, como o desenvolvimento de vacinas (55–57).

A capacidade do vírus de evasão das respostas imunológicas também apresenta desafios significativos. Os HSVs podem interferir na apresentação de antígenos às células do sistema imunológico, dificultando a detecção e a eliminação viral, podendo modular a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I nas células infectadas, reduzindo assim a capacidade das células T citotóxicas de reconhecer e destruir as células infectadas; modulam a resposta imune inata do hospedeiro, evitando a detecção e a eliminação precoce do vírus, podendo bloquear a sinalização de vias antivirais, interferir na produção de citocinas pró-inflamatórias ou induzir a expressão de proteínas virais que antagonizam a atividade dos interferons; expressam proteínas que mimetizam as moléculas do hospedeiro para evitar o reconhecimento imune e proteínas que inibem diretamente a atividade das células imunes, como as células *natural killers* e as células T citotóxicas; possuem estratégias para escapar da resposta humoral, como a produção de glicoproteínas virais que bloqueiam a neutralização pelo anticorpo ou a capacidade de modificar a glicoproteína viral para evitar o reconhecimento por anticorpos neutralizantes; e, durante a reativação da latência, podem evitar a detecção e a eliminação pelo sistema imunológico, uma vez que a replicação viral ocorre predominantemente nas células neuronais, que são menos acessíveis às células imunes (58–61).

O HSV é um vírus neurotrópico com capacidade de estabelecer um estado de latência no hospedeiro, um fenômeno bioquímico complexo que influencia a persistência e recorrência das infecções. É dentro dos neurônios sensoriais que a infecção latente é estabelecida. Após a replicação primária do HSV na mucosa oral ou genital, o vírus é capaz de infectar os dendritos neurais dos gânglios sensoriais que inervam esses tecidos e, após o transporte retrógrado associado aos microtúbulos até o corpo celular do neurônio, o vírus encontra diferentes programas de expressão gênica que ditam o destino do neurônio: replicação lítica ou infecção latente. O genoma do vírus latente é retido de forma estável dentro dos neurônios sensoriais e é caracterizado pela repressão de todos os genes virais líticos. Em resposta a uma variedade de estímulos diversos, o vírus pode periodicamente reativar para retomar a replicação viral e produzir vírus infeccioso, que é transportado de forma anterógrada de volta à periferia para facilitar a infecção das células epiteliais e consequente transmissão (62).

Em contraste com o programa lítico, os únicos transcritos detectáveis durante a latência são os genes associados à latência (LATs). Os LATs são um conjunto de RNAs colineares transcritos de um locus dentro das regiões de repetição do genoma viral das células neuronais, encontrados tanto no gânglio trigêmeo quanto no gânglio sacral, locais de estabelecimento da latência do HSV-1 e HSV-2, respectivamente (35). Embora diferentes modelos de infecção e metodologias específicas possam afetar a eficiência do estabelecimento e reativação da latência, esses dados fornecem um argumento convincente de que as deficiências observadas na reativação de mutantes deficientes em LAT são resultado da ablação de uma função codificada por LAT responsável por aumentar a eficiência do estabelecimento da latência. No entanto, outros estudos observaram uma competência de reativação pobre de vírus LAT-negativos quando as cargas de DNA do vírus latente são comparáveis ao vírus selvagem tanto em camundongos (63,64) quanto em coelhos (65), sugerindo que os LATs influenciam a latência durante múltiplas fases da infecção.

Os produtos genéticos virais do ciclo lítico geralmente não são detectados em neurônios infectados de forma latente e vários estímulos podem induzir a reativação. Em neurônios cultivados, também foram identificados

vários estímulos, tais como: privação de NGF (66–68), inibidor da histona desacetilase Trichostatina A (69), forskolina (70), repressor precoce indutível de AMP cíclico (71), ativação de proteína quinase C por forbol miristateacetato (72), hipertermia transitória (73) ou adição de dexametasona (74).

Estudos mostraram que o processo de latência do HSV é controlado por linfócitos T CD4⁺ auxiliares e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos que se mantêm justapostos à bainha nervosa (75–77). Essa proximidade permite uma resposta imunológica rápida e específica no caso de reativação viral, impedindo a disseminação do vírus e a manifestação de sintomas clínicos. As células T CD8⁺ de memória produzem interferon-gama (IFN γ), que exerce uma diminuição parcial do efeito sobre a replicação viral inicial dentro dos neurônios, enquanto a falta dessas células promove a reativação (78,79). Essas células T CD8⁺ podem direcionar seus receptores para os neurônios infectados e liberar grânulos líticos de Granzima B. A Granzima B induz vias apoptóticas em fibroblastos, porém não em neurônios, onde cliva a proteína viral ICP4, necessária para a transcrição dos genes precoce e tardio, essenciais à replicação do HSV. Assim, a replicação viral precoce pode ser limitada, favorecendo, em última análise, a latência viral sem efeitos letais para o neurônio (80).

Interações moleculares nos gânglios mostram a relação inversa entre LATs e proteínas líticas. A ativação compreende a transcrição ativa de RNA viral e alta expressão de proteínas líticas acompanhada por baixa produção de LATs. Nesse processo de latência, o material genético viral encontra-se em formato episomal, o qual é uma adaptação que permite ao vírus estabelecer e manter a latência de forma eficaz, garantindo ao mesmo tempo a integridade e função do neurônio hospedeiro. Ao contrário da integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, que pode causar mutações e disfunção celular, a forma episomal do DNA viral permite que o neurônio mantenha sua função normal enquanto hospeda o vírus em um estado latente (35).

Já a latência compreende o controle da expressão das proteínas do HSV em neurônios, no gânglio, por células T CD8⁺ residentes no local. IFN- γ e granzima B são liberados pelas células T do hospedeiro e podem inibir a expressão proteica, sendo possível observar a alta produção de LATs e a baixa

produção de proteínas líticas. A presença estratégica e a coordenação entre os linfócitos T CD4⁺ auxiliares e T CD8⁺ citotóxicos nas proximidades da bainha nervosa destacam a participação de células da imunidade adaptativa na regulação do processo de latência do HSV. Essa interação dinâmica fornece uma linha de defesa crucial contra a reativação viral. A retenção prolongada dos linfócitos T CD8⁺ nos gânglios nervosos infectados sugere que, mesmo na ausência de replicação viral ativa, o sistema imunológico mantém uma presença persistente de células de memória no local da latência.

Além da resposta inicial, a formação de células de memória é crucial para uma resposta mais rápida e eficaz em casos de recidiva herpética. Um dos avanços mais significativos na história da imunologia e medicina é o desenvolvimento de vacinas, que são ferramentas poderosas para prevenir e controlar a propagação de doenças virais, uma vez que o reconhecimento antecipado de agentes virais é fundamental para uma resposta imunológica eficaz. As vacinas capitalizam essa ideia, apresentando ao sistema imunológico uma versão inativa (vírus inativo) ou fragmentos do vírus, permitindo que as células imunológicas aprendam a reconhecer e responder rapidamente ao vírus invasor, formando uma memória imunológica duradoura. As vacinas podem induzir imunização ativa artificial, estimulando a produção de anticorpos e células de memória que persistem por longos períodos. Ainda, a administração de anticorpos específicos (imunização passiva) também é uma estratégia, oferecendo proteção imediata em situações de exposição aguda ao vírus (81). A evolução das tecnologias de vacinas trouxe inovações significativas com vacinas de mRNA, por exemplo, como as desenvolvidas contra a COVID-19, representando uma abordagem revolucionária, instruindo as células a produzirem proteínas virais para desencadear uma resposta imunológica robusta (82).

Atualmente, não há vacinas disponíveis contra os HSVs e uma das hipóteses é devido à natureza recorrente da infecção e a latência do vírus nos gânglios nervosos desafiam a criação de respostas imunológicas duradouras (83). A prevenção total da infecção primária e da latência pode ser difícil porque o vírus ganha acesso aos gânglios nervosos por transporte axonal retrógrado e não por disseminação virêmica. Nesse contexto, vacinas

terapêuticas - que atuam estimulando o próprio organismo a combater a doença - emergem como promissoras ferramentas biomédicas, oferecendo uma perspectiva inovadora no combate a essa infecção persistente. O desenvolvimento da vacina terapêutica Shingrix para Herpes Zoster e de uma vacina profilática para o vírus varicela-zoster aumentou os esforços para a vacina contra o HSV devido às similaridades entre os dois vírus, especialmente em relação à latência (84).

Diversas abordagens já foram exploradas em vacinas contra as doenças causadas pelos vírus HSVs. Por exemplo: a vacina VC2, que é produzida com o vírus vivo atenuado do HSV-1, mostrou-se protetiva contra o HSV-2 em modelo de porquinho-da-Índia (85). Ainda: vacinação imunoterapêutica com glicoproteína viral gD recombinante (86,87); imunoterapia com a estratégia de vacinação *prime pull* em porquinhos-da-Índia utilizando a proteína ribonucleotídeo redutase (RR2) juntamente com a quimiocina CXCL11 (88); estratégia de *prime pull* utilizando quimiocinas (89), aminoglicosídeos (90) e adjuvantes como o *imiquimod* (91); e imunização oral com adjuvante lipídico Liporale®, seguido de aplicação vaginal de agentes inflamatórios como DNFB ou CXCL9/10 (92).

Outra estratégia inovadora que vem sendo estudada é a aplicação da nanotecnologia no desenvolvimento de uma vacina ou imunoterapêutico contra os HSVs. Já existem inúmeros estudos demonstrando nanocápsulas, nanoesferas, nanoemulsões, microemulsões e hidrogéis com atividade antiherpética (93–105). As nanopartículas são utilizadas como veículos para a entrega de moléculas ou fármacos – sistema conhecido como *drug delivery* – pois elas podem ser projetadas para direcionar moléculas especificamente às células infectadas por vírus, permitindo a liberação controlada no local da infecção. Ainda, devido à sua característica protetora, conseguem manter a molécula mais estável e protegida contra a degradação até que alcancem as células-alvo. A nanotecnologia também possibilita a combinação de diferentes terapias em uma única formulação. Por exemplo, nanopartículas podem ser carregadas com múltiplos agentes antivirais ou com moléculas que atuam em diferentes estágios do ciclo de vida do vírus herpes, aumentando assim a eficácia do tratamento (106–108). No entanto, até o momento, não há

nanopartículas aprovadas para o tratamento do herpes genital. A pesquisa em nanotecnologia para essa finalidade ainda está em estágios iniciais de desenvolvimento e avaliação. Embora haja estudos promissores demonstrando o potencial das nanopartículas na entrega de moléculas para diversas doenças, incluindo infecções virais, ainda não houve uma aprovação específica para o tratamento do herpes genital.

1.3 Tratamentos para os HSVs

Atualmente, o tratamento disponível contra os HSVs inclui medicamentos antivirais como Valaciclovir®, Famciclovir® e Aciclovir. O Valaciclovir® utiliza o composto ativo aciclovir e atua inibindo seletivamente a DNA polimerase viral, interrompendo a replicação do DNA viral, levando à redução da carga viral e ao alívio dos sintomas associados às infecções. O Famciclovir® possui o mesmo mecanismo de ação que o Valaciclovir®, mas utiliza o composto ativo penciclovir. Uma vez incorporado ao DNA viral, o penciclovir-TP atua como um terminador da cadeia, interrompendo a síntese do DNA viral e inibindo a replicação viral subsequente (109,110). No entanto, o medicamento mais utilizado é o aciclovir, que é administrado por via oral, tópica ou intravenosa. Após a administração oral, ele é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal. Seu principal método de ativação é através da fosforilação por uma enzima viral específica, a timidina quinase, presente nas células infectadas com herpes. Essa fosforilação converte o aciclovir em aciclovir monofosfato. Após a fosforilação inicial, o aciclovir monofosfato é convertido em aciclovir trifosfato (aciclovir-TP) pelas enzimas celulares. Essa fosforilação sequencial ocorre por meio de quinases celulares, e é essencial para a atividade antiviral do aciclovir. O aciclovir-TP é um análogo de nucleosídeo que se assemelha ao desoxiguanosina trifosfato (dGTP), um componente fundamental para a replicação do DNA viral. No entanto, quando incorporado no DNA viral em replicação, o aciclovir-TP atua como um inibidor competitivo da DNA polimerase viral. Ele interrompe a síntese do DNA viral ao ser incorporado na cadeia de DNA em crescimento, pois não permite a adição de nucleotídeos subsequentes. Uma vez que o aciclovir-TP é incorporado ao

DNA viral, ele age como um "terminador" da cadeia. Isso significa que a síntese do DNA viral é interrompida precocemente, resultando na produção de fragmentos de DNA não funcionais. Como resultado, a replicação viral é inibida e a propagação da infecção é controlada. O aciclovir tem uma alta seletividade para as células infectadas pelo herpesvírus, pois sua ativação depende da presença da enzima viral timidina quinase. Isso significa que as células não-infectadas pelo herpesvírus têm uma capacidade muito limitada de ativar o aciclovir, reduzindo assim a toxicidade para as células saudáveis (111,112).

1.4 Peptídeo imunodominante dos HSVs (SSIEFARL)

A grande maioria dos linfócitos T CD8+ justapostos à bainha neuronal são mantidos nesse sítio através da expressão de um epítipo imunodominante do HSV (113). Os epítipos imunodominantes são peptídeos - fragmentos de proteínas virais ou bacterianas - que têm uma forte capacidade de estimular a resposta do sistema imunológico. Em contextos virais, esses peptídeos são apresentados por moléculas de histocompatibilidade nas células infectadas, e os linfócitos T reconhecem esses complexos MHC/epítipos como sinais de infecção. Além disso, peptídeos imunodominantes têm sido explorados como candidatos a componentes de vacinas, já que podem induzir respostas imunológicas específicas (114,115).

O SSIEFARL é um epítipo imunodominante murino que está localizado na glicoproteína B viral do HSV (116,117). O primeiro estudo que faz menção ao peptídeo demonstrou que as células T reconhecem um complexo antigênico de peptídeos ligado aos produtos da classe I ou da classe II do MHC (118) (Figura 2). Um estudo posterior realizado em camundongos C57Bl/6 demonstrou resultados interessantes, sugerindo que acima de 50 % das células T CD8+ específicas para HSV-1 direcionam-se ao SSIEFARL (119). A ideia de um imunoterapêutico contra HSV utilizando o peptídeo SSIEFARL para aumentar a resposta local já foi demonstrada por Rouse, B.T. e colaboradores em 2002, imunizando camundongos com oligodeoxinucleotídeos (ODN) contendo CpG combinados com SSIEFARL. Os resultados obtidos mostram que o sistema conseguiu gerar uma população de T CD8+ específica, porém,

com valores mais baixos se comparados ao grupo imunizado com vaccinia vírus juntamente com SSIEFARL (120). Ainda, foi possível definir o início da resposta mediada por células T CD8+ à infecção cutânea pelo HSV-1 utilizando um receptor de células T (TCR) SSIEFARL-específico, demonstrando que a resposta imune à infecção viral localizada depende apenas da presença de células apresentando antígeno derivado do vírus e começa com uma rapidez notável (121).

Em estudo posterior, no ano de 2004, pesquisadores mostraram que a imunização de camundongos com o peptídeo SSIEFARL combinada com o ligante *Toll-like receptor 9* (TLR9) na ausência de ativação de células T CD4 + auxiliares gera uma resposta de memória de células T CD8 + funcionalmente prejudicada. No geral, os resultados do estudo indicam que a boa resposta das células T CD8 + de memória à imunização com peptídeos pode ser alcançada usando procedimentos coestimulatórios no momento da imunização inicial ou de *recall* (122). Ainda, outras estratégias de imunização foram relatadas com o peptídeo SSIEFARL juntamente com a interleucina 15 (IL-15) (123) e IL-15 juntamente com a interleucina 21 (IL-21) (124).

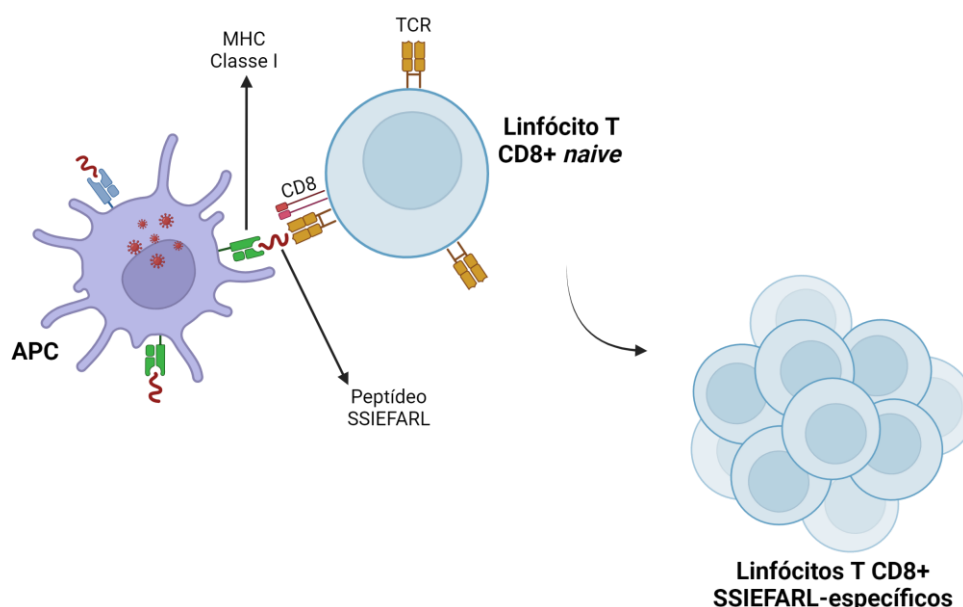


Figura 2. Apresentação de antígeno e reconhecimento celular. Células apresentadoras de antígeno (APCs) como células dendríticas e macrófagos capturam o vírus e apresentam seus epítomos ligados a moléculas de MHC Classe I para linfócitos T CD8+ *naive*. Os epítomos, como o peptídeo SSIEFARL, se ligam a receptores de células T (TCRs), promovendo a

expansão clonal e a geração de linfócitos T CD8+ específicos onde, no caso do SSIEFARL, acima de 50 % das células geradas são SSIEFARL-específicas (125).

Muitas das células T CD8+ que se infiltram e são retidas no gânglio trigêmeo infectado são específicas ao HSV e potencialmente contribuem para a manutenção da latência do HSV-1 (126). Além disso, as proteínas β e $\gamma 1$ do HSV-1, que são expressas antes da síntese de DNA viral, são alvos principais de células T CD8+, e a imunodominância de SSIEFARL (acima de 50 %) dentro do repertório de TCR é provavelmente devido à frequência ou características de expansão e sobrevivência dos precursores de células T CD8+ (127). Esse estudo realizado por Hendricks, R.L. e colaboradores destaca a importância do SSIEFARL e, juntamente com estudos prévios, demonstra que esse peptídeo imunodominante pode ser um candidato promissor para uma nova estratégia de imunização contra o HSV. Além disso, em 2016, outro estudo mostrou a expansão de células T CD8+ SSIEFARL-específicas, bem como células T CD8+ produtoras de IFN γ e *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), após tratamento com um complexo de Interleucina 2 (IL-2) (128).

Em um contexto de infecção genital por HSV-2, a presença de células T citotóxicas é crucial para a resolução da infecção, assim como a presença de células residentes de memória (TRM) em tecidos de barreira é crítica para respostas imunológicas protetoras duradouras. Trabalhos anteriores mostraram que essas células no tecido podem ser estabelecidas “puxando” células T efectoras vírus-específicas da circulação para a mucosa genital por meio da aplicação vaginal tópica de quimiocinas em camundongos, sinalizando uma ativação robusta da via de sinalização de IFN, incluindo a regulação positiva da expressão de quimiocinas no tecido (129). Em um estudo promissor, pesquisadores demonstraram que uma única aplicação tópica de neomicina, um antibiótico barato e não tóxico para a vagina, é suficiente para puxar células T CD8+ para a mucosa vaginal e fornecer proteção contra infecção por herpes genital em camundongos (90).

1.4.1 Linfócitos T Residentes de Memória (TRM)

Existem três tipos principais de linfócitos no sistema imunológico: linfócitos B, linfócitos T e células natural killer, cada um desempenhando um papel específico na resposta imunológica. Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, que são proteínas especializadas na neutralização de patógenos, opsonização para facilitar a fagocitose pelos macrófagos e ativação do sistema complemento. Os linfócitos T estão envolvidos em respostas imunes mediadas por células e existem dois principais subtipos: os linfócitos T CD4⁺ e os linfócitos T CD8⁺. Os linfócitos T CD4⁺ auxiliam na ativação de outras células do sistema imunológico, como os linfócitos B, macrófagos e células T CD8⁺, além de desempenhar papéis importantes na regulação da resposta imune. Os linfócitos T CD8⁺, por sua vez, são citotóxicos e são capazes de reconhecer e destruir células infectadas por vírus ou células cancerígenas. Já as células NK são um tipo de linfócito citotóxico que desempenha um papel na resposta imune inata, sendo capazes de reconhecer e destruir células infectadas por vírus ou células tumorais sem a necessidade de ativação prévia. As células NK também secretam citocinas que modulam a resposta imune, influenciando a atividade de outros tipos de células imunológicas (130).

Até então, a literatura relatava a formação de dois subtipos de linfócitos T após uma infecção por um determinado patógeno: linfócitos T centrais de memória (TCM) e linfócitos T efetores de memória (TEM), ambos circulando entre órgãos linfóides secundários e corrente sanguínea, com os TEM circulando também em tecidos não-linfóides (131). Os centrais de memória residem principalmente nos linfonodos e no baço e são caracterizados por uma alta expressão de receptores de coestimulação e pela capacidade de se proliferar rapidamente e se diferenciar em células efectoras após reencontrarem seu antígeno específico; são considerados também uma reserva de células T de memória, prontas para serem recrutadas em resposta a uma reexposição ao antígeno. Os linfócitos T efetores de memória têm um maior potencial para se proliferar e diferenciar em células efectoras, produzindo citocinas de forma mais rápida e eficiente do que durante a resposta primária. Contudo, após o descobrimento de células de memória presentes em tecidos não-linfóides por muito tempo após a resolução de uma infecção (132), pesquisadores

demonstraram um outro grupo de linfócitos chamado de linfócitos T residentes de memória (133), os quais são caracterizados por se estabelecerem em um tecido não-linfóide, permanecendo nesse mesmo sítio por um determinado tempo, sem sinais de saída pra corrente sanguínea e/ou órgãos linfóides secundários (Figura 3).

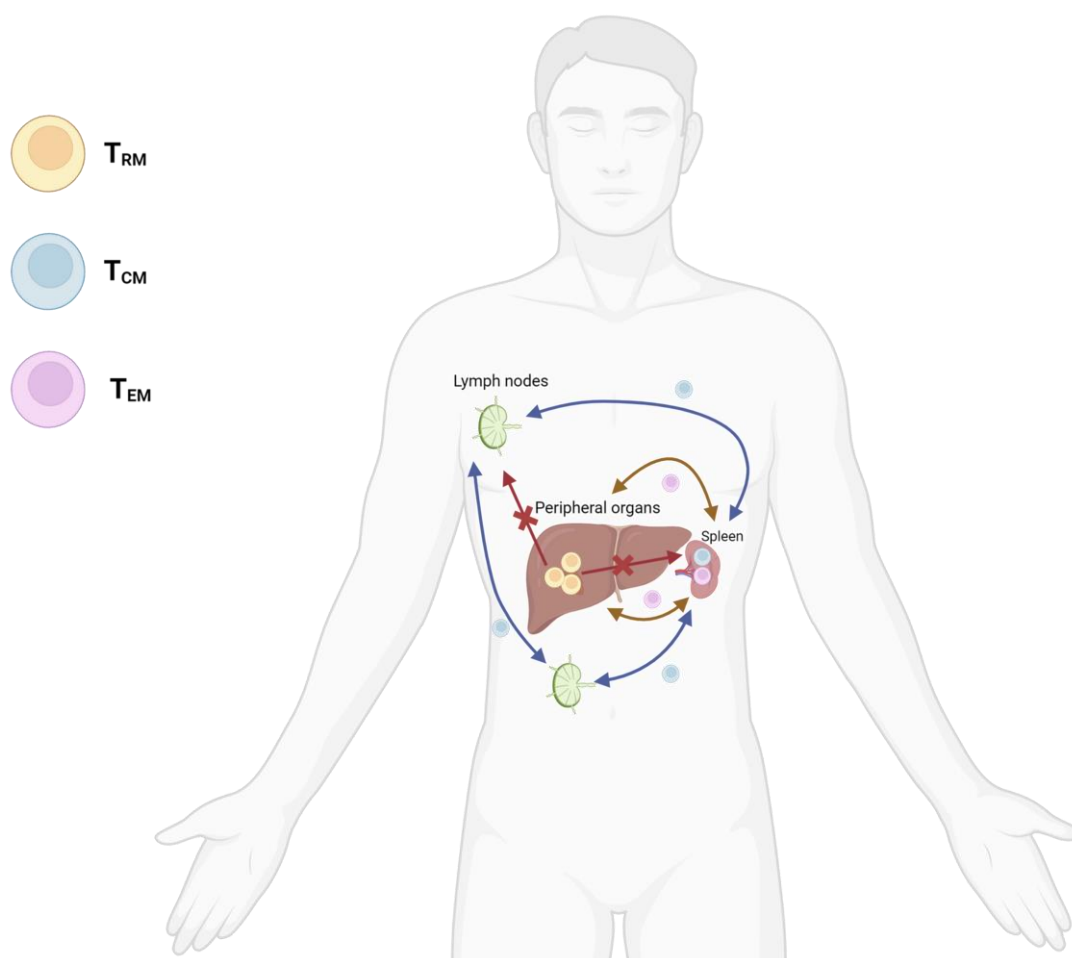


Figura 3. Linfócitos T de memória. Dentre os linfócito T de memória que são produzidos a partir de uma infecção, Linfócitos T centrais de memória (TCM) e linfócitos T efetores de memória (TEM) circulam entre órgãos linfoides secundários e corrente sanguínea, enquanto os TEM também circulam em tecidos não linfoides. Já os linfócitos T residentes de memória (TRM) se estabelecem em tecidos não linfoides, permanecendo nesse local por um período específico, sem demonstrar sinais de migração para a corrente sanguínea e/ou órgãos linfoides secundários (131,133).

Os linfócitos TRM desempenham um papel crucial na resposta imunológica adaptativa, fornecendo uma defesa local eficaz contra patógenos

previamente encontrados, residindo permanentemente nos tecidos periféricos, proporcionando uma resposta imunológica rápida e específica no local de infecção. Este subconjunto de células T tem características transcricionais, fenotípicas e funcionais distintas que os diferenciam dos linfócitos T centrais e efetores de memória.

Os TRM são caracterizados pela expressão de moléculas específicas e a expressão dessas moléculas pode variar de acordo com o tecido (Figura 4). A saída da célula de um órgão linfóide depende da expressão da molécula de receptor 1 *sphingosine-1 phosphate* (S1PR1) (134). Quando as células T reconhecem um antígeno cognato, elas reduzem transitoriamente a expressão do fator de transcrição semelhante a kruppel 2 (KLF2), um regulador positivo da transcrição de S1PR1 (135). A regulação negativa de S1PR1 está concomitantemente associada à expressão, na superfície celular, da lectina do tipo C, a integrina CD69 (136). Isso evita que células T ativadas recentemente deixem o órgão linfóide secundário até que estejam totalmente ativadas. Deve-se notar que o reconhecimento do antígeno cognato não é o único sinal que modula o CD69. Por exemplo, interferon tipo I (IFN-I), interleucina 33 (IL-33) e TNF α e outras citocinas também induzem a regulação positiva de CD69 nas células T (137). Quando as células T *naïve*, as que ainda não entraram em contato com nenhum patógeno, são originadas nos órgãos linfóides secundários, elas dão origem a células efectoras que migram por todo o hospedeiro e deixam uma população de memória que persiste por muito tempo após a eliminação do patógeno (138). As células de memória T CD8 + em muitos órgãos não-linfóides não possuem a molécula ligante de CD62, a CD62L (137), o qual é o fenótipo definidor de uma célula TEM. No entanto, as células T de memória derivadas de órgãos não-linfóides também expressam muitos marcadores não compartilhados por nenhuma população circulante de células T de memória no sangue (137,139).

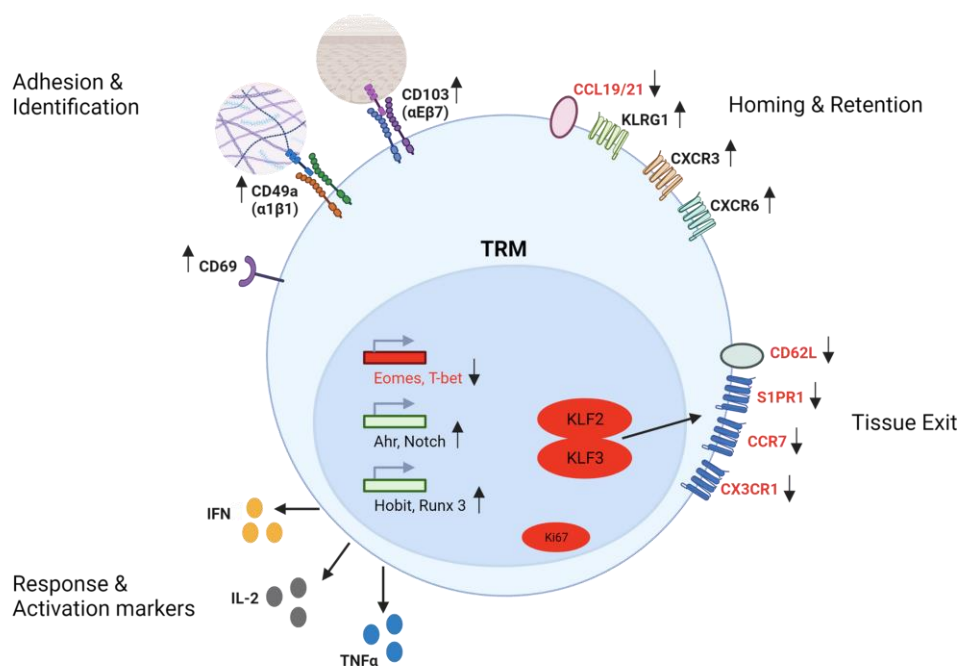


Figura 4. Modelo de célula TRM de pele. A célula apresenta expressão de marcadores relacionados à resposta e à ativação (IFN, IL-2 e TNF α), adesão e identificação (CD69, CD49a e CD103), retenção (KLRG1, CXCR3 e CXCR6) e ausência de marcadores de saída do tecido (CD62L, S1PR1, CCR7 e CX3CR1).

Examinando a dinâmica das alterações fenotípicas entre as células T CD8⁺ antivirais na mucosa do intestino delgado foi possível obter informações sobre a ontogenia das células TRM. Após infecções virais agudas em camundongos e humanos, as células T efetoras regulam transitoriamente a integrina $\alpha 4\beta 7$, o que facilita a migração para o intestino delgado (133,140). Após a infecção viral aguda em camundongos, o $\alpha 4\beta 7$ é rapidamente regulado negativamente após o tráfego para o intestino, sugerindo que as células T CD8⁺ efetoras recém-chegadas perderam a capacidade de reentrada após o ingresso (133). Esta perda de $\alpha 4\beta 7$ está associada à regulação positiva *in situ* da integrina $\alpha E\beta 7$ (também chamada de CD103) e CD69, à manutenção da granzima B e à regulação negativa da expressão de Ly6C e CD122 (139). Na pele, a molécula de CD103 consegue se ligar à molécula de *E-cadherin*, expressa em células epiteliais, apontando um forte indicativo associado à

residência tecidual. Estes dados indicam que muitas assinaturas fenotípicas de células TRM são adquiridas somente após a migração para os tecidos de residência de destino. Assim, as mudanças na localização estão ligadas às mudanças no fenótipo. Isso sugere que as células TRM, apesar do seu fenótipo semelhante à de uma célula efetora, podem não ser terminalmente diferenciadas. Observações recentes mostraram que os precursores das células TRM na pele e no intestino delgado são derivados de precursores de células T de memória menos diferenciados que expressavam baixos níveis de *killer cell lectin-like receptor G1* (KLRG1) (141,142). Por outro lado, muitas células T de memória recirculantes perdem a capacidade de adquirir assinaturas fenotípicas prototípicas associadas às células TRM após reestimulação e migração para a mucosa intestinal (139). Análises de componentes principais revelaram que as células TRM exibiam assinaturas transcricionais totalmente diferentes em comparação com células T *naïve*, células TCM e TEM, sendo estas últimas bastante semelhantes entre si. Embora possam existir vários subconjuntos de TRM, uma descoberta importante foi que as células TRM em diferentes tecidos compartilhavam muitas transcrições em comum, sugerindo uma assinatura central (142).

Evidências sugerem que citocinas dentro dos tecidos são responsáveis pelas assinaturas ou características das células TRM, embora apenas um número limitado de sinais tenha sido definido até agora (143). Por exemplo, o TGF β induz a expressão de CD103 em precursores de células TRM (142) e o mesmo está prontamente disponível em muitas superfícies epiteliais, como na epiderme e no epitélio do intestino delgado (144). Ainda, a deficiência do receptor de TGF β impede a regulação positiva do CD103 na pele, pulmão e intestino delgado (137,142), mostrando a grande importância dessa citocina na regulação das TRM. Funcionalmente, os TRMs humanos podem produzir rapidamente IL-2 e outras citocinas inflamatórias como IFN γ e TNF α , mas também expressam moléculas que atenuam a ativação, incluindo as moléculas inibitórias *programmed death 1* (PD-1) e CD101, e a citocina reguladora interleucina 10 (IL-10) (145). Algumas moléculas relacionadas à saída da célula do tecido estão pouco expressas como o CD62L, marcador de uma célula TEM, caracterizando assim uma célula que não recircula e permanece

residente (146). Ainda, também apresentam uma reduzida expressão de moléculas de circulação, como a molécula de adesão vascular-1 (VLA-1), o que limita sua capacidade de entrar na corrente sanguínea (147).

Estima-se que, durante uma infecção genital por HSV, após a ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos com apresentação do antígeno viral ligado a moléculas de MHC classe I, células TRM são formadas e mantidas nos tecidos genitais, como a mucosa vaginal, desempenhando um papel fundamental na vigilância imunológica, proporcionando uma resposta específica contra o vírus em locais de entrada. Em estudo realizado por Schiffer e colaboradores no ano de 2013 (35) mostrou que a recidiva do HSV-1 e HSV-2 é controlada, principalmente, pelos linfócitos T CD8⁺ residentes no tecido após a infecção inicial ou recidiva anterior. Durante uma infecção aguda, a resposta imune é mediada por linfócitos T CD8⁺, que possuem memória imunológica. O modelo apresentado na Figura 5 ilustra a dinâmica desses linfócitos na mucosa durante a infecção/recidiva do HSV-2 e o mesmo mecanismo pode ser aplicado também ao HSV-1 (35).

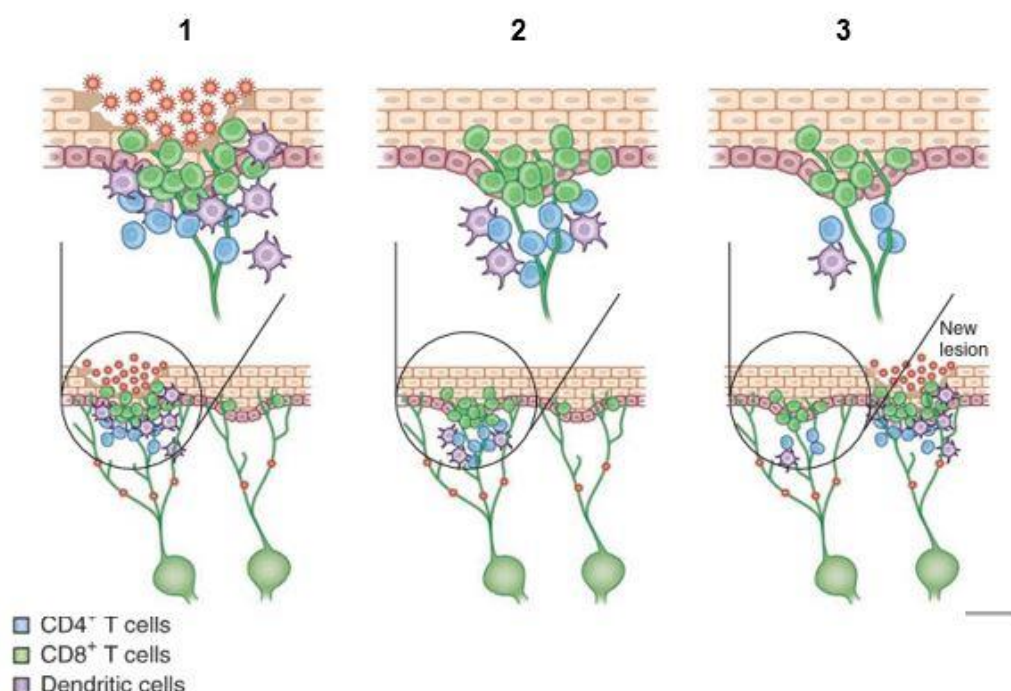


Figura 5. Dinâmica de linfócitos durante a infecção/recidiva do HSV. O modelo mostra que o HSV é liberado contínua e lentamente devido à reativação simultânea do HSV em múltiplos

gânglios, o que leva à liberação do vírus em múltiplos locais da mucosa espacialmente discretos. Periodicamente, as células epiteliais são infectadas, levando à rápida disseminação viral, múltiplas células infectadas, formação de microúlceras ou úlceras (onde um grande número de queratinócitos são lisados e vírions são eliminados) e infiltração densa de células T CD4+ e CD8+. Após a contenção do HSV num único local, as células T persistem nesse local durante vários meses numa capacidade de imunovigilância, adquirindo um perfil de TRM. O HSV-2 é reativado em outros locais onde a densidade de linfócitos T CD4+ e CD8+ é menor, permitindo um episódio de eliminação no trato genital, que se inicia em uma região diferente; **1)** O HSV-2 (vermelho) goteja dos neurônios (células verdes longas) e infecta periodicamente células epiteliais (bordô), resultando na formação de lesões, onde altas densidades de linfócitos T CD4+ (azuis) e T CD8+ (verdes), e em menor extensão das DCs (roxo), circulam para eliminar a infecção viral (lado esquerdo); locais a apenas milímetros de distância da replicação do HSV-2 podem permanecer não infectados, e a densidade de células T nessas regiões permanece baixa (lado direito); **2)** Três meses após a resolução da lesão herpética, o ponto de reativação apresenta maior quantidade de linfócitos T CD8+ em relação aos demais pontos; **3)** Os níveis dessas células imunológicas diminuem gradualmente ao longo do tempo (lado esquerdo), tornando esses locais suscetíveis a episódios de eliminação de alto título nas semanas seguintes (lado direito). A recidiva acontece no ponto com menor quantidade de linfócitos T CD8+ (35).

Tendo em vista que acima de 50 % dos linfócitos T CD8+ gerados a partir de uma infecção por HSV em camundongos são contra o peptídeo SSIEFARL e que a geração e presença de células TRM no tecido infectado pode proporcionar uma resposta imune tecidual mais robusta, a hipótese é de que esse epítipo possa ser um candidato promissor para vacinas ou imunoterapia, diminuindo assim a frequência das recidivas virais.

Embora o SSIEFARL seja um potencial candidato para estudos futuros, se trata de um peptídeo pequeno de 8 aminoácidos e, portanto, não pode ser aplicado de maneira livre e direta na mucosa genital. Esse fato é devido à presença de peptídeos antimicrobianos, células do sistema imune e proteínas líticas que estão presentes na mucosa e poderiam degradar o peptídeo, causando a queda de sua bioatividade. Sendo assim, se faz necessário pensar em alternativas para utilização do peptídeo como imunoterapia sem que o mesmo seja degradado antes de ser reconhecido pelo sistema imune.

1.5 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um campo científico-tecnológico abrangente e transformador, dedicado à compreensão, controle e aproveitamento das propriedades da matéria em escala nanométrica, equivalentes a 1 bilionésimo de metro. Materiais com uma dimensão nessa escala podem exibir propriedades e características únicas, suscetíveis de serem exploradas em diversas aplicações tecnológicas. As propriedades dos nanomateriais estão revolucionando não apenas a ciência, mas também os setores industriais, impulsionando a criação de novos produtos e serviços. As inovações nessa área abrangem diferentes setores como energia, saúde e medicina, produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, têxteis, agricultura, alimentos, automotivo, aeroespacial, meio ambiente, entre outras. A nanotecnologia é reconhecida como uma tecnologia estratégica e vital para o desenvolvimento econômico e social de grandes nações e blocos econômicos, incluindo os Estados Unidos, Coreia do Sul, Japão, União Europeia, Suíça, Rússia, Inglaterra e China. Vários desses países e blocos têm iniciativas nacionais dedicadas especificamente à nanotecnologia, destacando sua importância para o avanço global da ciência e da indústria (148).

Richard Feynman, físico norte-americano, introduziu as bases do que viria a ser conhecido como nanotecnologia em sua palestra para a Sociedade Americana de Física, em 29 de dezembro de 1959, embora o termo em si não tenha sido empregado. A palestra intitulada "*There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*" é considerada como o ponto inicial da nanociência e da nanotecnologia (149). Contudo, foi o professor Norio Taniguchi, em 1974, quem cunhou pela primeira vez o termo "Nanotecnologia" para descrever "tecnologias que permitem a construção de materiais em uma escala de 1 nanômetro".

No Brasil, o Marco Legal da Nanotecnologia altera a Lei de Inovação Tecnológica (Lei 10.973/2004) uma vez que inclui a nanotecnologia no conjunto dos setores beneficiados com medidas de incentivo à inovação e à pesquisa científica. Conforme o substitutivo, o Marco Legal da Nanotecnologia precisa fomentar o avanço científico, a investigação e a capacitação na disciplina. As iniciativas inovadoras devem aderir a princípios como precaução, sustentabilidade ambiental, solidariedade, responsabilidade do produtor, boa-

fé, cooperação, lealdade e transparência entre todos os participantes do processo.

A nanotecnologia é aplicada em uma ampla gama de setores, incluindo eletrônicos, medicina, energia, materiais, cosméticos, alimentos e agricultura, entre outros. Segundo relatórios de mercado e análises de várias fontes, como *Grand View Research*, *MarketsandMarkets* e *Research and Markets*, o mercado global de nanotecnologia é significativo e está em constante crescimento. Estima-se que a nanotecnologia valha centenas de bilhões de dólares e continue a crescer nos próximos anos com governos, empresas e instituições acadêmicas investindo bilhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento anualmente. Esses investimentos alimentam a inovação, impulsionam a comercialização de novas tecnologias e contribuem para o crescimento do mercado global, proporcionando um impacto econômico significativo em nível global, criando empregos, impulsionando o crescimento econômico, aumentando a competitividade das empresas e gerando receita por meio da comercialização de produtos.

Nas últimas décadas, a nanotecnologia tem sido amplamente aplicada na pesquisa farmacêutica para a fabricação de eficientes sistemas de entrega de fármacos chamados sistemas de *drug delivery* (SDDs). Conforme o cenário terapêutico tem evoluído, as tecnologias de entrega têm se adaptado rapidamente para atender às mudanças nas necessidades de distribuição de medicamentos. Há algumas décadas, medicamentos com moléculas pequenas dominavam o campo terapêutico e, devido à influência significativa das suas propriedades físico-químicas na biodisponibilidade, os esforços iniciais concentraram-se em melhorar a solubilidade, controlar a liberação, ampliar a atividade e ajustar a farmacocinética desses medicamentos (150,151). Com o tempo, novas classes terapêuticas surgiram, incluindo proteínas e peptídeos, anticorpos monoclonais, ácidos nucleicos e células vivas, oferecendo novas funcionalidades terapêuticas. No entanto, essas novas funcionalidades também trouxeram desafios adicionais, como a estabilidade (especialmente para proteínas e peptídeos), a entrega intracelular (especialmente para ácidos nucleicos) e a viabilidade e expansão celular. Como resultado, as estratégias de *drug delivery* precisaram evoluir para enfrentar esses novos desafios.

As nanopartículas apresentam inúmeras vantagens como biodisponibilidade, bioestabilidade, biocompatibilidade e facilitação do direcionamento de um medicamento de acordo com as características fisiopatológicas de um tecido específico (152). Além disso, os sistemas nanotecnológicos também podem transportar diferentes substâncias numa entrega mais seletiva do que os sistemas convencionais, uma vez que sua superfície pode ser funcionalizada com moléculas específicas que reconhecem e se ligam a alvos específicos no corpo, como células cancerígenas e essa funcionalização permite uma entrega mais direcionada dos ativos. Isso poderia minimizar os efeitos colaterais em tecidos saudáveis. Podem ainda ser projetados nanossistemas para liberar os fármacos de forma controlada e programada através de diferentes mecanismos, como liberação sensível ao pH, liberação estimulada por luz ou liberação controlada por enzimas presentes no ambiente biológico. Esse controle pode aumentar a eficácia terapêutica, proteger os ativos contra a degradação enzimática e a eliminação precoce no organismo, aumentando assim sua estabilidade e tempo de circulação no corpo. Devido à sua capacidade de entrega mais seletiva e eficaz, os sistemas nanotecnológicos podem permitir a redução da dose necessária de fármaco para alcançar o efeito terapêutico desejado (153–157).

A classificação de SDDs é baseada na entrega de substâncias farmacologicamente ativas a um órgão específico, por exemplo, fator de crescimento ou entrega de citocinas para acelerar e melhorar a reparação e a regeneração de tecidos (158–162). A compreensão do transporte de moléculas através do sistema vascular e em tecidos ou células levou ao estabelecimento de princípios farmacocinéticos e farmacodinâmicos (163,164). Como o relacionamento entre farmacocinética, farmacodinâmica e a eficácia, duração da ação e a toxicidade de pequenas moléculas tornou-se mais claro, os primeiros esforços concentraram-se no controle da dose e do regime de dosagem (isto é, a frequência de infusão e taxa de infusão) para melhorar a eficácia do medicamento (165,166). Esses estudos de farmacocinética e investigações clínicas lançaram as bases para SDDs de medicamentos projetados para alcançar cinética previsível de liberação durante um período específico usando quatro mecanismos de liberação de drogas: dissolução,

difusão, osmose e troca iônica (167), com a nanotecnologia desempenhando papel crucial nesse desenvolvimento de SDDs.

Ao considerar aplicações de *drug delivery*, uma ampla categoria de NPs é explorada, pois elas oferecem a viabilidade de serem sintetizadas usando materiais orgânicos e inorgânicos que variam de lipídios, proteínas, polímeros, compostos naturais, metais e nanomateriais à base de carbono (Figura 6) (168,169). Recentemente, há um interesse crescente em nanopartículas biodegradáveis obtidas a partir de diferentes métodos, propriedades e características de liberação controlada, como as nanopartículas poliméricas.

Nanopartículas poliméricas são sistemas vesiculares coloidais que incluem nanocápsulas, micelas poliméricas, nanogéis, nanofibras, nanoesferas e dendrímeros (170), dependendo de sua estrutura e organização. As nanocápsulas são compostas por um núcleo oleoso rodeado por um envelope polimérico, que pode ser constituído com diferentes tipos de polímeros como poli(lactídeo) (PLA), poli(glicolídeo) (PGA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e policaprolactona (PCL) (171), no qual moléculas podem ser dissolvidas dentro do núcleo ou presas na membrana polimérica (172–174). Esses polímeros têm inúmeras vantagens pois oferecem degradação controlada, minimizando a toxicidade e permitindo a liberação gradual de substâncias ativas (175).

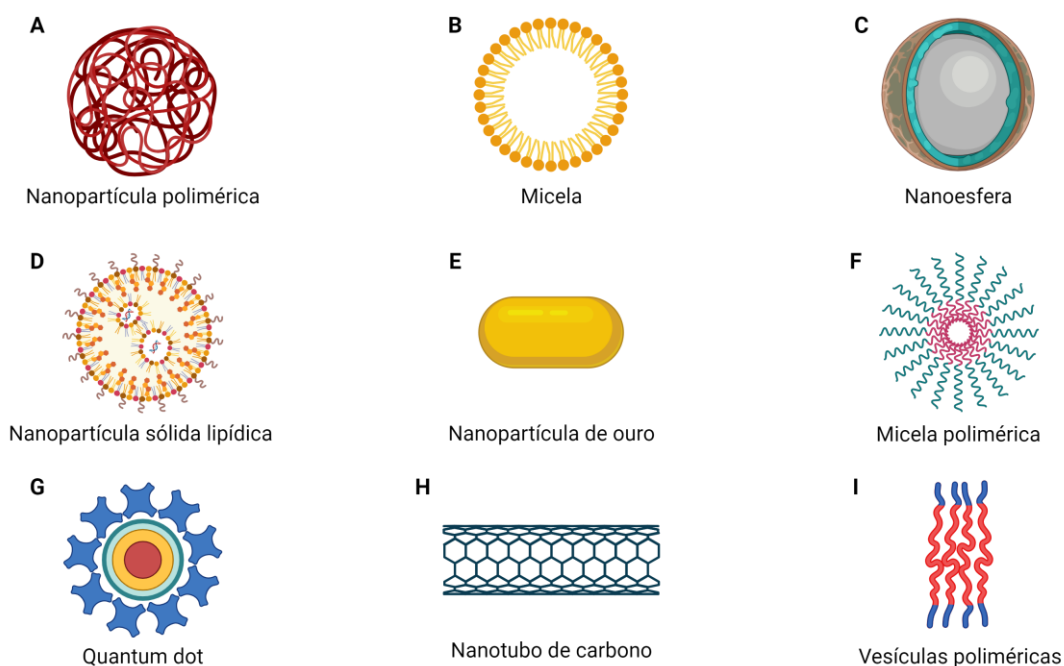


Figura 6. Modelos de nanopartículas. Existem diversos tipos de nanopartículas contendo compostos orgânicos ou inorgânicos que podem ser utilizadas como sistemas de *drug delivery*. A escolha da nanopartícula ideal se dá de acordo com as propriedades de seus compostos e com as características da molécula a ser associada (176).

Dentre os diversos polímeros que podem ser utilizados, destaca-se a PCL, a qual é um polímero biodegradável hidrolisado em condições fisiológicas no corpo humano e é considerado promissor para um SDD, pois também pode ser combinado com outros polímeros, propiciando diferentes propriedades físico-químicas à nanoestrutura e modular a cinética de degradação e os perfis de liberação (177,178). A cinética de degradação do polímero resultante dependerá das propriedades intrínsecas de cada componente na mistura. Por exemplo, se a PCL for misturada com um polímero que degrada mais rapidamente, como o PLA ou o PLGA, a taxa de degradação geralmente será aumentada. Por outro lado, se for misturada com um polímero que degrada mais lentamente, como o poli(óxido de etileno) (PEO), a taxa de degradação pode ser reduzida (179–181).

A degradação *in vivo* da PCL, a qual possui uma temperatura de fusão de 59°C a 64°C (182), é caracterizada pela hidrólise das ligações éster da sua estrutura principal, além do ataque enzimático (183). A hidrólise do PCL ocorre de forma mais rápida em pH básico e em temperaturas mais elevadas, enquanto é mais lenta se comparada a outros polímeros, como o PLA e o PLGA (184). Por isso, essa característica torna a PCL mais adequada para aplicações de administração de medicamentos a longo prazo.

Muitas vezes, as formulações podem ser incompatíveis com certas moléculas. Portanto, compreender as características dos compostos é essencial para garantir a eficácia do sistema. Nanocápsulas de núcleo lipídico formadas por um núcleo de organogel (mistura de monoestearato de sorbitano e triglicerídeo de cadeia média) demonstraram a capacidade de aumentar a capacidade de encapsulamento de ativos lipofílicos em até 40 vezes (185,186). Os triglicerídeos de cadeia média (TCMs) são triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia média, conhecidos por sua rápida absorção e metabolismo no organismo e sua natureza lipofílica os torna ideais para a incorporação e transporte de compostos hidrofóbicos (187). As nanopartículas

baseadas em TCM têm emergido como uma estratégia promissora na entrega eficaz de fármacos, pois utilizam as propriedades desses lipídeos para melhorar a biodisponibilidade e a estabilidade de agentes terapêuticos. A escolha do TCM como núcleo de nanopartículas oferece diversas vantagens, desde a capacidade de transporte de diferentes tipos de fármacos até a minimização de efeitos colaterais (188).

Como as nanopartículas ficam em suspensão aquosa, o uso de tensoativos hidrofílicos em nanoformulações é fundamental para evitar a agregação das nanopartículas na suspensão com formação de micelas na interface (189). O polissorbato 80 (Tween® 80) é um dos mais utilizados em nanoformulações. Sua estrutura química consiste em um grupo hidrofílico de polioxietileno (POE) ligado a uma cadeia lipofílica de sorbitano e essa combinação de características hidrofílicas e lipofílicas confere ao Tween® 80 uma característica de estabilizador da suspensão durante a formulação das nanopartículas através da capacidade de adsorção na interface entre a fase aquosa e a fase lipídica, reduzindo assim a tensão superficial, podendo também influenciar na cinética de liberação de compostos encapsulados, proporcionando uma liberação controlada e prolongada (190–192).

Com a nanotecnologia sendo amplamente aplicada a compostos hidrofóbicos, como fármacos, é possível observar um *gap* na literatura em relação ao encapsulamento e entrega de compostos hidrofílicos, que é o caso de biomoléculas, como os peptídeos, já que elas podem não ser encapsuladas de forma eficiente em núcleos orgânicos ou oleosos de nanocápsulas poliméricas.

1.5.1 Nanotecnologia no carreamento de peptídeos

Os peptídeos, fragmentos de proteínas e, principalmente os que apresentam propriedades bioativas, têm despertado crescente interesse nas áreas farmacêuticas e biomédicas em razão de suas propriedades imunoterapêuticas. Por exemplo, peptídeos tumor-específicos ou tumor-associados podem ser usados para estimular respostas imunes direcionadas contra células cancerosas (193). Em doenças autoimunes, situação na qual o

sistema imunológico ataca erroneamente tecidos saudáveis do corpo, os peptídeos podem ser usados para modular as respostas imunes e restaurar a tolerância imunológica (194). Ainda, peptídeos podem ser usados como imunoterapia para combater doenças infecciosas, incluindo infecções virais, bacterianas, fúngicas (195) e também em doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e psoríase (196).

A aplicação dos peptídeos como moléculas terapêuticas clinicamente viáveis começou com a descoberta e isolamento do hormônio insulina, de 51 aminoácidos, que se tornou o primeiro medicamento peptídico comercialmente disponível, permitindo que pacientes diabéticos atingissem um controle glicêmico rígido (197). A oxitocina, o primeiro hormônio peptídico a ser disponibilizado sinteticamente em 1954, também tem sido exemplificada há muito tempo por sua eficácia clínica na indução do parto em caso de não-progressão do parto (198). Após essa descoberta, o progresso foi lento até 1963, quando Bruce Merrifield desenvolveu uma maneira rápida e fácil de produzir peptídeos por síntese em fase sólida (199). Desde então, a síntese química de peptídeos foi revolucionada e muitos peptídeos foram preparados para essa abordagem terapêutica (200).

No entanto, a aplicação clínica de peptídeos, muitas vezes, é limitada por sua instabilidade, degradação rápida e por sua biodisponibilidade poder variar dependendo da rota de administração, formulação e suas propriedades específicas (201–205). Uma alternativa para superar esses desafios é o uso da nanotecnologia, que proporciona o encapsulamento ou associação de peptídeos, envolvendo a incorporação dessas moléculas em sistemas de entrega para melhorar sua estabilidade e eficácia (201,202). Além disso, peptídeos em um sistema de *drug delivery* apresentam muitas vantagens quando comparados aos sistemas sintéticos, pois apresentam melhor biocompatibilidade, propriedades bioquímicas e biofísicas, e redução/ausência de toxicidade (202). A conjugação de nanopartículas com ligantes específicos, como peptídeos de reconhecimento, pode melhorar a seletividade e direcionar os sistemas de entrega encapsulados para os locais desejados no organismo, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais (202,206).

Até o momento, existem cerca de 60 peptídeos que atingiram o mercado, mais de 150 peptídeos estão em ensaios clínicos ativos, cerca de 260 peptídeos estão, atualmente, sendo testados em humanos e mais de 400 peptídeos em estudos não-clínicos (207). Estudos recentes têm se concentrado no desenvolvimento de métodos eficientes de carregamento de peptídeos. Por exemplo, o encapsulamento de peptídeos anticancerígenos como um SDD tem o potencial de reduzir a toxicidade hemolítica (para peptídeos catiônicos) (208), superar o problema de curta circulação das moléculas, melhorar a estabilidade sérica e metabólica, e oferecer proteção contra a rápida eliminação pelo corpo (209). Ainda, há vantagens como a liberação controlada das moléculas, especificamente no local do tumor, através do projeto de sistemas de distribuição de medicamentos responsivos a estímulos (pH, temperatura e formulações acionadas magneticamente) ou via funcionalização de ligantes de nanocarreadores (210), além de facilitar a entrega intracelular eficiente da substância para atingir alvos subcelulares graças ao uso de materiais fusogênicos e endossomolíticos e a coentrega de múltiplos medicamentos para efeitos sinérgicos usando um único SDD (202).

Diversos sistemas de entrega têm sido explorados, incluindo lipossomas, micelas, nanogéis, nanocápsulas e nanofibras, cada um com suas vantagens e desvantagens (211–215). Os lipossomas são vesículas formadas por bicamadas lipídicas que podem encapsular peptídeos hidrofílicos e hidrofóbicos. Estudos demonstraram que lipossomas modificados com polímeros biocompatíveis podem melhorar a estabilidade dos peptídeos encapsulados e promover uma liberação controlada, aumentando assim a eficácia terapêutica (206,215,216). Nanocápsulas poliméricas também tem se destacado como uma excelente alternativa e pesquisas mostram que elas podem proteger peptídeos contra a degradação enzimática, facilitar sua absorção e prolongar sua circulação sanguínea, resultando em uma melhoria significativa na eficácia terapêutica (217–219). Ainda, o desenvolvimento de nanofibras também tem ganhado destaque, proporcionando um meio eficaz de encapsulamento de peptídeos (170,220–222). Embora os avanços no encapsulamento de peptídeos estejam adiantados, desafios persistem, como a otimização da formulação para diferentes tipos de peptídeos e a garantia de

sua eficácia e segurança para uso a longo prazo. No entanto, representa uma abordagem inovadora para superar os desafios associados à entrega de peptídeos específicos.

A formulação de nanopartículas de núcleo lipídico, onde seus componentes nucleicos exibem altos valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), pode melhorar a eficiência de associação (EA) de moléculas hidrofílicas, como peptídeos (223). Uma nanopartícula polimérica contendo óleo de babaçu (BBS) foi recentemente desenvolvida para encapsular o fármaco diclofenaco sódico como um modelo de substância polar (223) e, portanto, mostra que o óleo de babaçu pode ser uma excelente alternativa para encapsular outras moléculas polares, como é o caso do peptídeo SSIEFARL.

O uso do óleo de babaçu como matéria-prima para nanoformulações ainda é pouco investigado, entretanto sua incorporação dentro do núcleo das nanopartículas pode melhorar o encapsulamento de moléculas, já que é sólido em temperatura ambiente e pode promover a formação de um núcleo viscoso. (224). Contudo, ainda não há certeza sobre o seu ponto de fusão dentro do núcleo da nanopartícula. Um estudo conduzido por Rodrigues e colaboradores, em 2014, revelou que o EHL do óleo de babaçu é de 11,5 (225). Esse valor, que é considerado alto, sugere uma interação com moléculas polares. O EHL é uma propriedade crucial que auxilia na previsão do comportamento do processo de emulsificação, indicando o tipo de emulsão que será formada. Emulsionantes com baixo valor de EHL tendem a favorecer a formação de emulsões água-em-óleo (A/O), enquanto emulsionantes com alto valor de EHL resultam em emulsões óleo-em-água (O/A). Assim, ao conhecer o valor de EHL, é possível antecipar o comportamento esperado da emulsão, oferecendo orientação prática durante o processo (226,227).

1.5.1.1 Babaçu

O babaçu pertence à família *Arecaceae* (*Palmae*) e aos gêneros *Orbignya* e *Attalea*, sendo mais comumente encontrado no Norte e Nordeste do Brasil (228). O fruto desta planta produz amêndoas que são compostas por mais de 60 % de óleo (229). O óleo é extraído do côco de babaçu (Figura 7) e

tem sido utilizado para diversos fins medicinais, pois apresenta propriedades laxantes, vermífugas, antitumorais e anti-inflamatórias (230–234). A exploração do babaçu representa uma excelente estratégia para o uso sustentável da biodiversidade brasileira, devido às suas múltiplas aplicações e usos potenciais. Por ser fonte de renda crucial para muitas famílias do estado do Maranhão (235) - responsável por cerca de 93 % da produção total de babaçu no Brasil -, a exploração do babaçu gera recursos sustentáveis e promove o sustento das comunidades locais e do país (236). Todas as partes da palmeira são aproveitadas: as flores são utilizadas em artesanato, as folhas para construção de telhados e alimentação animal, enquanto o fruto possui diversas aplicações, dependendo da camada correspondente. Por exemplo, o mesocarpo é usado na produção de farinha, etanol e possui também finalidades medicinais (237).

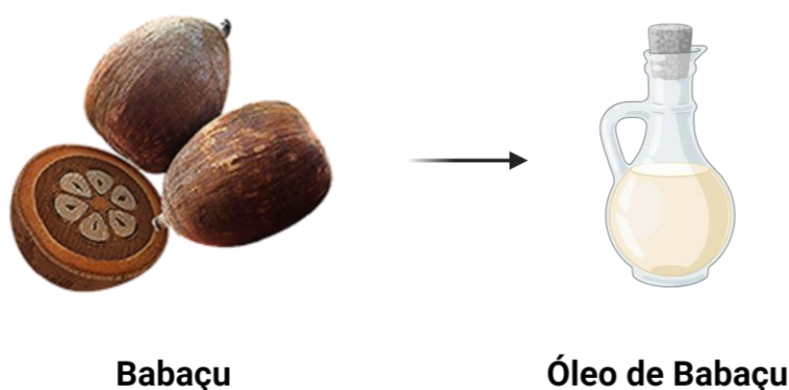


Figura 7. Babaçu e óleo extraído do côco do babaçu. (Imagem adaptada de <https://www.conceptaingredients.com/wp-content/uploads/2021/04/babacu-oil.png>. Acesso em 24 de fevereiro de 2024).

Amplamente utilizado nas regiões tropicais do Brasil, o óleo do babaçu possui um perfil nutricional notável e demonstra potencial em várias áreas, desde a alimentação até a indústria cosmética (229). É composto por uma variedade de ácidos graxos (238), incluindo láurico (40–55 %), mirístico (11–27 %), oleico (ômega 9) (10–16 %), esteárico (1,8 –7,4 %), palmítico (5–11 %), cáprico (1,2–8 %) e caprílico (6 %) (239,240). Sistemas nanoestruturados contendo BBS tem sido investigados como terapia para hiperplasia prostática benigna (241,242). Na imunologia, o extrato de babaçu consegue ativar células

responsáveis pela fagocitose, como os macrófagos e as células dendríticas, podendo ativar o sistema imunológico (243).

1.5.2 Nanotecnologia na produção de produtos imunoterapêuticos

As diversas estratégias e sistemas de entrega desenvolvidos até agora mostram grande potencial para a imunoterapia baseada em peptídeos associados à nanotecnologia. As nanopartículas poliméricas representam uma classe versátil e promissora de nanomateriais com aplicações significativas na medicina e têm sido amplamente exploradas para uma variedade de aplicações, desde a entrega controlada de fármacos até a terapia gênica. Inclusive, muitas já são aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em diversas aplicações biomédicas, incluindo medicamentos, diagnóstico médico e terapia genética (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de fármacos associados a nanopartículas com aprovação do FDA.

Produto	Fármaco	Tipo de NP	Indicação de uso	Referência
Abraxane®	Paclitaxel	Nanopartículas de albumina	Tratamento para câncer de mama, câncer de pulmão e câncer de pâncreas	Professional DH, Lenkowsky A, Manager G, Squibb BM. Subject: Bristol Myers Squibb—Update on Manufacturing-related supply constraints for BMS Product. 2022.
Depo-Provera®	Acetato de medroxiprogesterona	Nanopartículas poliméricas de PLGA	Contraceptivo injetável de longa duração	Alam K. Mechanistic Modeling of Complex Injectables: Recommendations to Navigate Regulatory Challenges SBIA 2022: Advancing Generic Drug Development: Translating Science to Approval [Internet]. 2022. Available from: www.fda.gov
Risperdal Consta®	Risperidona	Microesferas de PLGA	Tratamento de longo prazo para distúrbios psiquiátricos, esquizofrenia e transtorno bipolar	Jiang XJ. Product Characterization and In Vitro Testing for Establishing Equivalence of Complex Products • Complex active ingredients. 2017
Vyvanse®	Lisdexanfetamina	Microesferas de polímero catiônico	Tratamento do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) em crianças e adultos	Administration D. Vyvanse (lisdexamfetamine) Pediatric Focused Safety Review. 2020.

A biodisponibilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFA) é um fator importante no desenvolvimento e aplicação desses ativos, com alguns sendo rejeitados pela indústria farmacêutica devido à baixa biodisponibilidade e/ou desempenho abaixo do ideal. A biodisponibilidade dos fármacos é limitada devido à sua baixa solubilidade em água e/ou baixa permeabilidade da membrana. Sessenta e cinco por cento do corpo humano é composto de água, portanto, um medicamento deve ter uma certa hidrofiliabilidade ou polaridade para ser solúvel em água. Ao mesmo tempo, estes fármacos devem apresentar uma certa lipofiliabilidade ou apolaridade para serem capazes de atravessar as membranas celulares lipofílicas.

Esses requisitos levaram ao sistema de qualificação biofarmacêutica de medicamentos onde: medicamentos de Classe I tem alta biodisponibilidade e não oferecem nenhum desafio; por outro lado, os medicamentos da Classe IV provavelmente nunca chegarão ao mercado; já os medicamentos de Classe II e Classe III tem biodisponibilidade reduzida devido à sua baixa solubilidade e baixa permeabilidade da membrana, respectivamente. O sistema de qualificação biofarmacêutica de medicamentos é um conjunto de práticas e testes utilizados para avaliar e garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. Essa abordagem é essencial para garantir que os medicamentos produzidos e comercializados atendam aos padrões regulatórios e ofereçam os resultados terapêuticos esperados aos pacientes. A qualificação biofarmacêutica envolve uma série de etapas, incluindo a caracterização dos ingredientes ativos e excipientes utilizados na formulação do medicamento, a avaliação da estabilidade do produto ao longo do tempo, a determinação das vias de administração e dosagem adequadas, entre outros. Isso é fundamental para garantir que as diferentes formulações produzam resultados terapêuticos comparáveis (245). Muitas pesquisas são dedicadas à obtenção desses medicamentos baseada no desenvolvimento de SDDs e indicam que polímeros biodegradáveis naturais, seminaturais, sintéticos e híbridos servem como um marco no *design* e desenvolvimento de SDDs, melhorando o manejo e cura do tecido danificado, diminuindo os efeitos colaterais e melhorando a farmacodinâmica do substância (246,247).

1.5.3 Nanotecnologia para drug delivery em mucosas

As nanopartículas enfrentam várias barreiras biológicas durante seu transporte no corpo, o que pode restringir a eficácia da entrega de SDDs baseados em NPs (248). O muco, uma camada viscosa e pegajosa de hidrogel que reveste a superfície de tecidos mucosos, como os olhos, vias aéreas pulmonares, trato gastrointestinal e trato genitourinário, é um exemplo típico de barreira biológica (249). O muco é principalmente composto por fibras de mucina interligadas e entrelaçadas, formando uma estrutura semelhante a uma malha. Assim, o muco evoluiu sua função para proteger a mucosa contra corpos estranhos por meio de obstrução estérica e/ou interações de ligação. As nanopartículas entregues aos tecidos mucosos são facilmente aprisionadas e removidas pelo muco, limitando assim a eficácia desses sistemas (250). Para superar a barreira do muco, nanopartículas mucoadesivas e mucopenetrantes têm sido propostas sucessivamente. Por exemplo, pesquisadores que foram pioneiros no desenvolvimento de nanopartículas muco-penetrantes descrevem que, conjugando as nanopartículas com uma alta densidade de polietilenoglicol (PEG) de baixo peso molecular, é possível observar a absorção aprimorada de fármacos e a melhora no tratamento localizado (251,252).

Outro exemplo é o caso de nanopartículas semi-elásticas relatadas como capazes de atravessar rapidamente o muco intestinal para alcançar uma maior biodisponibilidade oral (253). Esses achados sugerem a viabilidade de modular as propriedades físico-químicas das nanopartículas para superar a barreira do muco, possibilitando a aplicação de sistemas de *drug delivery* em mucosas.

Estima-se que 70 % de todos os patógenos que infectam um hospedeiro o fazem através das mucosas. Isso é devido à proximidade desses sítios com o ambiente externo como, por exemplo, a mucosa vaginal, a qual é continuamente exposta a substâncias externas e patógenos infecciosos (254). Infecções vaginais afetam principalmente mulheres em idade reprodutiva, tornando-se assim a razão mais frequente para consultas ginecológicas. Embora as infecções vaginais não tenham uma taxa de mortalidade alta, esses distúrbios podem estar associados ao parto prematuro, aborto espontâneo,

doença inflamatória pélvica, endometriose e aquisição ou contágio de várias infecções sexualmente transmissíveis, além do estigma associado à infecções genitais (255). O tratamento para tais infecções pode incluir o uso de medicamentos tópicos e/ou sistêmicos. No caso de uma doença ou distúrbio local, o uso tópico de um produto vaginal evita que quantidades significativas do fármaco atinjam o sistema circulatório, reduzindo efeitos colaterais. Além disso, esse tipo de formulação também permite a autoadministração e raramente requer auxílio para a aplicação (256).

Recentemente, tem havido um crescente interesse em nanocarreadores para fármacos vaginais, pois são considerados uma estratégia que oferece propriedades desejáveis como liberação controlada, direcionamento específico para penetração no tecido e entrega intracelular ou extracelular (257,258). Em uma infecção por herpes genital, por exemplo, a maioria dos medicamentos disponíveis são análogos de nucleosídeos que bloqueiam a replicação do DNA viral (259). Esses tratamentos para o HSV são eficazes na redução das manifestações clínicas; no entanto, não previnem casos de recidivas, não curam a infecção e seu uso prolongado pode levar ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos (260). Portanto, novas alternativas têm sido exploradas no desenvolvimento de estratégias de tratamento e prevenção contra o herpes genital.

Encapsular peptídeos em nanopartículas pode ser uma estratégia para a entrega do mesmo na mucosa. Além disso, SSIEFARL é um bom modelo murino para condução de estudos *in vitro* e *in vivo* na infecção por HSV-2. Em modelo humano, estudos também demonstraram peptídeos específicos de HSV-1 e HSV-2 reconhecidos por células T CD4⁺ e T CD8⁺ em biópsias do trato reprodutivo feminino ou por análise de predição de epítomos, mostrando que a utilização de epítomos imunodominantes pode ser uma excelente alternativa para o desenvolvimento de um tratamento eficaz (261,262). Em estudo prévio, o SSIEFARL já foi considerado adequado para nanoencapsulação e o sistema produzido apresentou, ainda, algumas propriedades imunoadjuvantes, mostrando a possibilidade do sistema em ser utilizado para melhorar a resposta imune contra o herpes (97).

Atualmente, nanopartículas estão sendo estudadas para controlar infecções por HSV-2. Como exemplo, nanopartículas de óxido de zinco mostraram atividade antiviral significativa tanto nos modelos *in vitro* quanto nos modelos *in vivo* de infecções por HSV-2. Em um estudo conduzido por Antoine et al. (2012), foram utilizados três diferentes estratégias de tratamento: profilático, terapêutico e de neutralização. Em todos, as nanopartículas de óxido de zinco mostraram resultados no bloqueio de infecções por HSV-2 (263,264). Outro estudo demonstrou a possibilidade de usar nanopartículas poliméricas de PLGA como agentes antivirais, pois as mesmas têm a capacidade de penetrar o muco, mostrando que nanopartículas de aciclovir monofosfato penetram o muco e possuem uma maior retenção e distribuição do fármaco proporcionando assim uma proteção eficaz contra o desafio com HSV-2 (265). Orlowski et al. (2014) desenvolveram nanopartículas de prata modificadas com ácido tânico com boas propriedades antivirais tanto *in vitro* quanto *in vivo*, bloqueando diretamente a ligação e a penetração viral. No geral, os autores demonstraram que as nanopartículas de prata modificadas com ácido tânico representam um potencial microbicida para infecção por HSV nos tecidos mucosos (266). Produtos antivirais com propriedades adjuvantes adicionais impulsionaram a resposta imunológica antiviral, não apenas durante a infecção primária, mas também mais tarde, durante infecções recorrentes (267).

Outros estudos envolveram o desenvolvimento de nanopartículas de PLGA carregadas com moléculas para a administração intravaginal de siRNA para a prevenção de infecções genitais por HSV-2 em camundongos. As nanopartículas de PLGA foram projetadas para interferir na infecção por HSV-2 por meio da redução mediada por siRNA da nectina, uma proteína da célula hospedeira. Dessa forma, a sobrevivência dos camundongos, inoculados intravaginalmente com uma dose letal de HSV-2 e tratados com nanopartículas de PLGA, aumentou consideravelmente para mais de 28 dias em comparação com os camundongos não-tratados. Além disso, esse sistema oferece uma plataforma de entrega segura que emprega materiais já aprovados pela FDA e que podem ser modificados para melhorar a entrega de outros microbicidas (268). Em outro estudo, as nanopartículas carregadas com o fármaco

Ftibamzone, o qual é utilizado no tratamento para HSVs pois inibe a replicação viral, aumentaram significativamente a solubilidade e a absorção da ftibamzona em comparação com o fármaco livre, e mostraram um potencial para serem usadas como um sistema de entrega eficaz para tratar o herpes genital (269). Mais recentemente, pesquisadores mostraram que a entrega de nanopartículas de curcumina no trato vaginal poderia reduzir a inflamação local nos tecidos causada pelo HSV-2, e as suas propriedades anti-inflamatórias no trato vaginal poderiam potencialmente reduzir a gravidade da infecção por HSV-2 (270).

No entanto, a principal limitação da via vaginal é representada pelos mecanismos fisiológicos de remoção devido à dinâmica dos fluidos vaginais e às forças biomecânicas naturais que são responsáveis pela baixa permanência das formulações no local de ação/absorção (271). Uma abordagem proposta na literatura para solucionar esse problema consiste no uso de formulações mucoadesivas, que são capazes de prolongar a permanência do medicamento na mucosa vaginal ao formar ligações físicas e químicas com o muco, como os hidrogéis. Os hidrogéis têm emergido como uma plataforma versátil para *drug delivery*. Estudos como o de García-Astrain et al. (2021) indicam que hidrogéis podem ser projetados para fornecer uma liberação sustentada de fármacos, sendo particularmente úteis em aplicações locais, como no tratamento de feridas ou doenças articulares (272).

1.5.4 Nanopartículas em um sistema de hidrogel

Géis são redes que possuem tanto as propriedades coesivas dos sólidos quanto as características de transporte difusivo dos líquidos. Copolímeros em bloco são amplamente utilizados industrialmente nos estados sólido e borrachoso e são utilizados como elastômeros termoplásticos, com aplicações em modificação de impacto e adesão sensível à pressão (273). São sólidos porosos e tendem a ser elasticamente macios e reativos osmoticamente. Géis reversíveis referem-se àqueles que têm a capacidade de criar, quebrar e modificar as ligações responsáveis por manter a rede unida. Géis que não têm essa capacidade porque são mantidos juntos por ligações covalentes são chamados de géis permanentes (274).

O Pluronic® F-127 (Poloxâmero 407, PF-127) é um gel (275–278) utilizado como veículo para a maioria das vias de administração, incluindo tópica (279,280), intranasal (281), vaginal (282), retal (283), e o potencial uso do PF-127 como uma pele artificial também foi relatado (275). Nos últimos anos, o PF-127 tem atraído interesse no desenvolvimento de sistemas de entrega dérmica e transdérmica, com o objetivo de promover, melhorar ou retardar a permeação de medicamentos através da pele, considerando que, para sistemas de entrega tópicos, é desejável a acumulação na pele com permeação mínima, enquanto para entrega sistêmica, o comportamento oposto é preferido (284). Ainda, é considerado termossensível e termorreversível, uma vez que permanece solúvel em temperaturas de 2 a 10° C e geleifica acima dessa temperatura (283), podendo ser transformado da forma solúvel para a forma geleificada e vice-versa.

Esse polímero tribloco, composto por blocos de polietileno e polipropileno, demonstra propriedades únicas que o tornam ideal para formulações nanotecnológicas (278,285). Uma das aplicações mais notáveis do gel na nanotecnologia é sua capacidade de formar micelas inversas na formulação de micelas nanométricas, proporcionando um sistema eficaz para a solubilização de compostos hidrofóbicos, essencial em diversas áreas, como a entrega de fármacos (286). Pesquisas exploraram o uso de géis termossensíveis como o PF-127 para a entrega localizada de fármacos, permitindo a liberação controlada e prolongada (287–291). Além disso, o gel tem sido empregado como agente redutor e estabilizante na síntese de nanopartículas metálicas (288,292–294) e na engenharia de tecidos e regeneração celular (295–297). Ainda, podem ser adaptados para fornecer suporte mecânico e ambiental para o crescimento celular, permitindo a criação de estruturas tridimensionais que mimetizam o microambiente natural (298).

NanoSSIEFARL é uma suspensão aquosa esbranquiçada. Todavia, esse sistema é demasiado líquido para ser aplicado na mucosa genital de camundongos, uma vez que os animais precisariam ser anestesiados durante um longo período para que ocorresse a absorção das NPs na mucosa antes que os animais pudessem lamber a região, removendo a suspensão.

Portanto, uma alternativa seria transformar a nanopartícula em um sistema de hidrogel para facilitar sua aplicação *in vivo* na mucosa. Alguns testes foram feitos utilizando o PF-127 com a NanoSSIEFARL – denominado GelNanoSSIEFARL (Figura 8), transformando o sistema líquido em um termohidrogel para facilitar a aplicação na mucosa. Outros estudos já demonstraram o uso do PF-127 para aumentar a permeação das nanopartículas e o uso do gel no desenvolvimento de medicamentos já foi aprovado pelo FDA em concentrações de até 40 % (299,300). Estudo desenvolvido por Cone et. al em 2012 mostrou que nanopartículas de poliestireno penetram rapidamente no muco cervicovaginal humano se o mesmo foi pré-tratado com concentrações suficientes de PF-127 (301). Portanto, o pré-tratamento das mucosas com PF-127 pode melhorar a eficácia das nanotecnologias convencionais de *drug delivery* de forma segura e se torna uma alternativa promissora para o desenvolvimento de nanopartículas a serem aplicadas na mucosa vaginal.

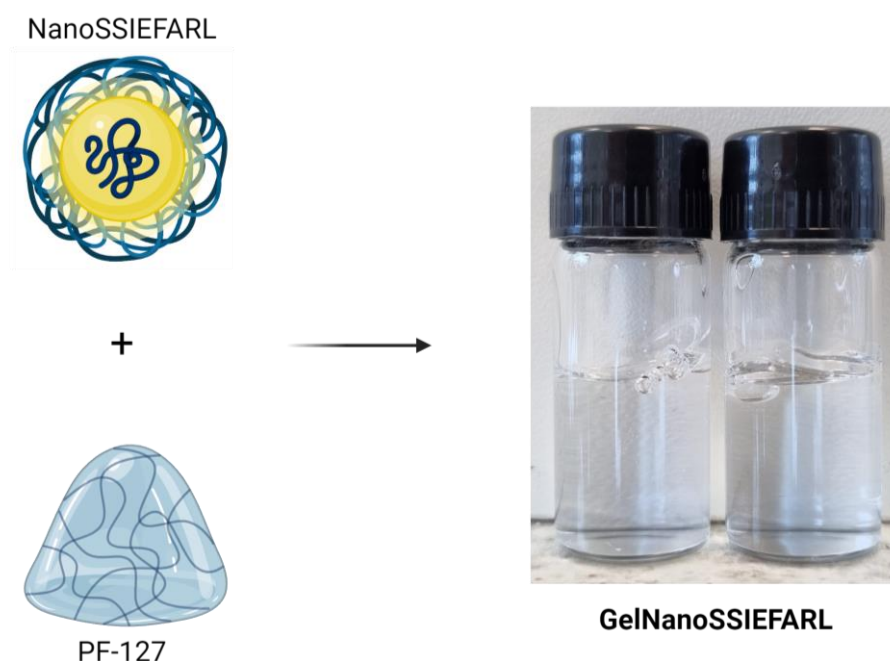


Figura 8. GelNanoSSIEFARL. A nanopartícula previamente produzida contendo o peptídeo SSIEFARL (NanoSSIEFARL) foi incorporada ao gel PF-127 na concentração de 20 %.

1.5.5 Aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) na Nanotecnologia

Para caracterizar sistemas de *drug delivery* como nanopartículas poliméricas, são necessários métodos de quantificação adequados e validados para avaliar parâmetros farmacêuticos, como o teor. A pesquisa conduzida por Li et al. em 2017 destaca como a técnica é empregada para determinar a pureza de nanofármacos, avaliar a eficiência de encapsulação de fármacos em nanocarreadores e monitorar a liberação controlada de fármacos ao longo do tempo (302).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem desempenhado um papel crucial na análise e caracterização de moléculas associadas à nanoestruturas. A capacidade da CLAE de separar, identificar e quantificar componentes em uma amostra, aliada à sua sensibilidade e precisão, tornou-a uma ferramenta essencial para assegurar a qualidade dos produtos na escala nanométrica e a técnica tem sido amplamente utilizada para a análise de moléculas associadas à nanopartículas, nanotubos, nanofibras e nanocompósitos, pois representa uma importante ferramenta para a caracterização físico-química desses sistemas (303). Vários parâmetros cromatográficos são avaliados para otimizar e validar um método analítico: deve-se encontrar uma fase móvel apropriada, temperatura da coluna, comprimento de onda e gradiente que proporcione compatibilidade e estabilidade adequadas da substância, bem como dos produtos de degradação e impurezas.

A validação de metodologia analítica é um processo crucial na indústria farmacêutica para garantir que os métodos utilizados para testar a qualidade, segurança e eficácia dos produtos sejam confiáveis, precisos e robustos. O Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Medicamentos de Uso Humano (ICH) fornece diretrizes abrangentes para a validação de metodologia analítica, conhecidas como ICH Q2(R1) (304). De acordo com as diretrizes do ICH, a validação de metodologia analítica deve abordar os seguintes parâmetros principais:

- Especificidade: o método deve ser capaz de distinguir a substância de interesse de outros componentes presentes na amostra, como impurezas, degradantes e matriz da formulação;
- Precisão: refere-se à proximidade entre resultados obtidos em repetições do mesmo experimento, indicando a reprodutibilidade e a variabilidade do método;
- Exatidão: avalia o quão próximo o valor medido está do valor real ou aceito, fornecendo uma medida da acurácia do método;
- Linearidade: verifica a resposta do método em relação à concentração da substância analisada dentro de um intervalo específico, demonstrando se a resposta é proporcional à concentração;
- Intervalo: determina a faixa de concentração em que o método é preciso, exato e linear;
- Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ): são os níveis mais baixos de concentração da substância que podem ser detectados e quantificados com precisão e confiabilidade pelo método.

Além desses parâmetros, o ICH também enfatiza a importância da validação do sistema cromatográfico, se aplicável, incluindo a escolha da fase móvel, coluna cromatográfica, condições de separação e detecção. Após a conclusão da validação, um relatório de validação deve ser preparado, documentando todos os experimentos realizados e os resultados obtidos. Este relatório é submetido às autoridades regulatórias como parte do processo de registro do novo medicamento. A conformidade com as diretrizes de validação analítica do ICH é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados dos testes e a segurança dos produtos farmacêuticos.

Outro aspecto relevante é a caracterização de nanomateriais em produtos comerciais, já que a CLAE tem sido utilizada para verificar a uniformidade de lotes de nanomateriais em produtos como protetores solares, produtos cosméticos e alimentos, podendo ser aplicada para analisar a presença e a concentração de substâncias em formulações comerciais,

garantindo a conformidade com regulamentações de segurança (305). Além disso, a CLAE é frequentemente complementada por outras técnicas, como a Espectrometria de Massas (MS), para uma caracterização mais abrangente.

Neste projeto, foi possível desenvolver, caracterizar e validar uma metodologia específica para a quantificação do peptídeo imunodominante SSIEFARL do HSV utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

Uma metodologia de cromatografia já foi previamente apresentada na análise de uma nanopartícula para encapsular o peptídeo SSIEFARL (97). Contudo, a metodologia não tinha sido validada seguindo as recomendações do ICH e foi feita utilizando CLAE com detector de fluorescência. Ainda, se tratava de uma nanopartícula com propriedades diferentes. Portanto, a importância de uma metodologia analítica específica e validada para o SSIEFARL é porque a mesma poderia ter a capacidade de ser aplicada para a detecção e caracterização de outras nanopartículas poliméricas que encapsulam diferentes peptídeos, já que, como mencionado anteriormente, o encapsulamento de biomoléculas é um processo que possui inúmeras dificuldades e a validação de uma metodologia é um grande passo para que novas nanopartículas e metodologias possam surgir.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolvimento de um sistema nanoestruturado para o encapsulamento de peptídeos para aplicação em mucosa genital e validação de metodologia analítica específica.

2.1.1 Específicos

- Validação de metodologia analítica para SSIEFARL utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Associar o peptídeo SSIEFARL a nanopartículas poliméricas de núcleo lipídico contendo óleo de babaçu;
- Caracterizar as nanopartículas em termos de distribuição de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH;
- Incorporar SSIEFARL às nanopartículas e caracterizá-las quanto distribuição de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, morfologia, teor e eficiência de encapsulação;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do SSIEFARL associado nas nanopartículas;
- Avaliar a citotoxicidade e a fagocitose de NanoSSIEFARL.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

POLYMERIC NANOPARTICLES INCORPORATING SSIEFARL: PRODUCTION, ANALYSIS, AND A NOVEL QUANTIFICATION METHODOLOGY

Manuscrito submetido ao periódico *Polímeros: Ciência e Tecnologia*

Fator de impacto: 1.6

1 Polymeric Nanoparticles Incorporating SSIEFARL: Production, Analysis, and a Novel Quantification
2 Methodology

3 Renata Zorzetto^a, Flávia Pires Peña^b, Aline Cláudio de Oliveira^a, Jayme de Castilhos Ferreira Neto^a,
4 Gabriel Tardín Mota Hilario^a, Fernanda Teresa Bovi Frozza^c, Marvin Paulo Lins^c, Fernanda Poletto^d,
5 Marcelo Jung Eberhardt^d, Pedro Roosevelt Torres Romão^a, Tanira Alessandra Silveira Aguirre^{b†},
6 Luiz Carlos Rodrigues Junior^{a†}

7
8 ^aLaboratório de Imunovirologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 90050-
9 170, Porto Alegre, RS, Brasil.

10 ^bLaboratório de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,
11 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

12 ^cLaboratório de Imunoterapia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 90050-
13 170, Porto Alegre, RS, Brasil.

14 ^d Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio
15 Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brasil.

16 ^eLaboratório de Imunologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre,
17 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

18

19 *Corresponding author. E-mail address: tanira@ufcspa.edu.br

20 † These authors made equal contributions

21

22 **Abstract:**

23 This study focused on utilizing the immunodominant peptide SSIEFARL, derived from viral
24 glycoprotein B of *Herpes simplex virus 2*, in conjunction with nanotechnology as a potential therapeutic
25 approach against genital herpes. A nanoparticle (NanoSSIEFARL) was developed and characterized
26 for its physicochemical and immunomodulatory properties. Moreover, a novel high-performance liquid
27 chromatography method was validated for SSIEFARL quantification.

28

29 **Keywords:** polymeric drug carrier, peptide delivery, HPLC.

30

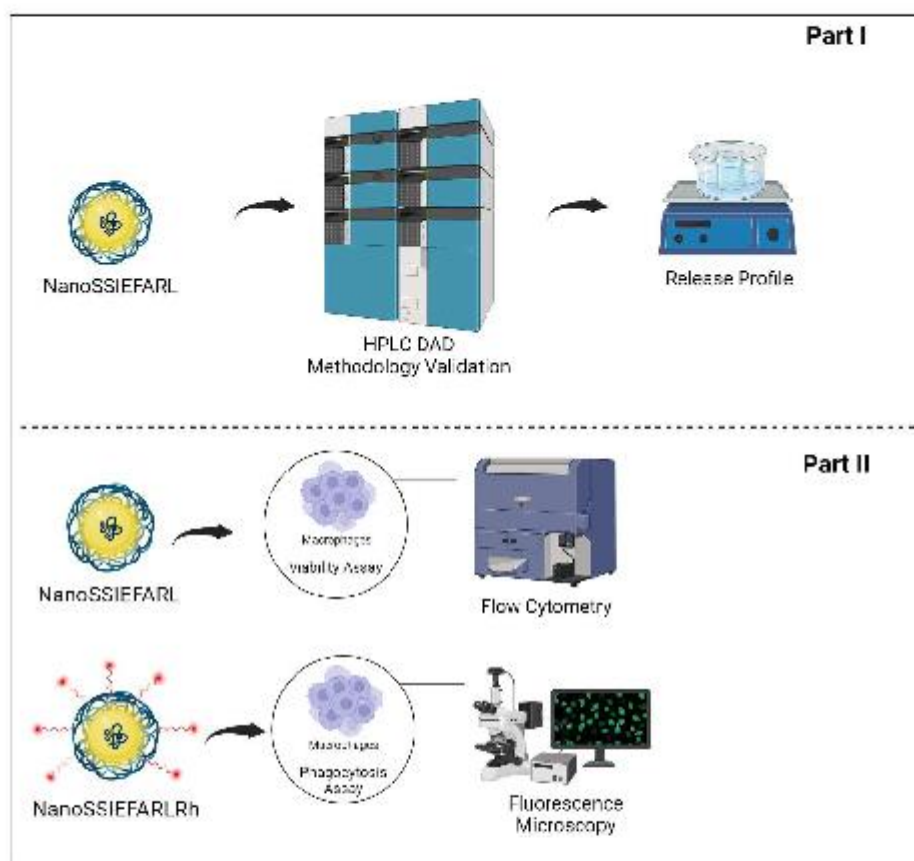
31

32

33

34 **Graphical abstract**

35



36

37

38

39

40

41 **Highlights**

42

- The polymeric nanoparticle containing behenic oil is suitable for SSIEFARL association.

43

- A novel HPLC methodology was developed and validated to quantify SSIEFARL.

44

- NanoSSIEFARL was proven to be non-cytotoxic after 24 h in J774.A1 macrophages.

45

- Uptake of NanoSSIEFARL by macrophages was observed after 4 h.

46

47 1. Introduction

48 *Herpes simplex virus* types 1 and 2 (HSV-1, HSV-2) cause oral and genital herpes,
 49 respectively [1, 2]. However, studies have already shown that both types can infect both regions.
 50 According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that 3.7 billion people under the
 51 age of 50 are infected with HSV-1 (87 %), and 481 million between the ages of 15 and 49 are infected
 52 with HSV-2 (13 %) [3]. HSVs can establish a latent infection in neural ganglia and, upon reactivation,
 53 can cause recurrent episodes of oral and/or genital ulcers called *sores*. Latency is controlled by
 54 CD4⁺ helper T lymphocytes and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes that keep juxtaposed to the nerve
 55 sheath [4–6]. In mice, most of these HSV-specific CD8⁺ T lymphocytes are against the
 56 immunodominant peptide SSIEFARL in the viral glycoprotein B [7, 8]. Therefore, SSIEFARL could be
 57 a promising candidate for vaccine or immunotherapy against HSVs. Human studies have also
 58 demonstrated specific HSV-1 and HSV-2 peptides recognized by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in biopsies
 59 of the female reproductive tract (FRT) or by epitope prediction analysis [9, 10]. Currently, there are no
 60 approved vaccines, and the treatment against HSVs includes antiviral drugs such as Aciclovir™,
 61 Famciclovir™ and Valaciclovir™. Although they might work for some patients, their effectiveness is
 62 limited, and drug resistance has been widely described [11–13].

63 Although SSIEFARL is a potent immunodominant peptide for the induction of specific CD8⁺ T
 64 response and protection in a herpes model because it is a small biomolecule, it cannot be applied
 65 freely and directly to the genital mucosa due to possible degradation and low bioactivity. Thus,
 66 developing a nanoparticle system containing SSIEFARL may be crucial for a safe and efficient release
 67 of therapeutic/immunostimulant peptide into the mucosa for studies of immunogenicity/vaccination-
 68 challenge and evaluation of protection mechanisms.

69 Polymeric nanoparticles are colloidal systems that include nanospheres and nanocapsules,
 70 depending on their structure and organization. Nanocapsules are composed of an oily core
 71 surrounded by a polymeric envelope, in which drugs or molecules can be dissolved inside the core or
 72 entrapped in the polymeric membrane [14–16]. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biodegradable
 73 polymer hydrolyzed in physiological conditions in the human body and has called the attention of drug
 74 delivery since it can also blend with other polymers and modulate degradation kinetics and release
 75 profiles [17, 18]. Besides the polymer, the core of some nanoparticles are formed by lipophilic
 76 substances chosen following criteria such as drug solubility, absence of toxicity, low risk of polymer
 77 degradation, and low oil solubility within the polymer or vice-versa [19]. Medium-chain triglycerides
 78 (MCT), such as capric/caprylic triglycerides, are commonly used as lipophilic cores of nanocapsules
 79 [20].

80 Nanoparticles with an oily core of babassu (BBB) are relatively new in the literature. Although

81 BBS-based microemulsions have already been tested as a nanostructured delivery system [21–23],
 82 the first study showing a polymeric nanoparticle containing poly (ϵ -caprolactone) and babassu oil as
 83 a drug delivery system for hydrophilic molecules was developed and characterized by our group [24].
 84 Babassu belongs to the family *Arecaceae* (*Palmae*) and genera *Orbignyia* and *Attalea*, most commonly
 85 found in northern and northeastern Brazil [23]. The oil is extracted from babassu coconuts and has
 86 been traditionally used for several medical purposes, presenting laxative, vermifuge, and anti-
 87 inflammatory properties [25–29]. It is composed of different fatty acids [30], such as lauric (40–55 %),
 88 myristic (11–27 %), oleic (omega 9) (10–15 %), stearic (1.6–7.4 %) palmitic (5–11 %), capric (1.2–6
 89 %) and caprylic acids (8 %) [31, 32]. This oil has emollient properties with an extensive history of use
 90 in humans for skin care [33]. Studies have shown that BBS has antitumor [34] and anti-inflammatory
 91 properties [35], and nanostructured systems containing BBS have been studied as a therapy for
 92 benign prostatic hyperplasia [36]. Studies found that the required hydrophilic-lipophilic balance (HLB)
 93 for BBS is 11.5 [32], and this elevated HLB value suggests the potential for interaction with polar
 94 molecules, such as peptides [24]. Moreover, BBS activates human phagocytes, activating the immune
 95 system [21].

96 Babassu extractivism forms the primary income source for many families in Maranhão,
 97 contributing significantly to Brazil's babassu production, accounting for 85 % of the total output and
 98 promoting sustainable livelihoods for local communities and the nation [37, 38]. Babassu extraction is
 99 vital for the sustainable use of Brazilian biodiversity due to its diverse applications and economic
 100 importance. Given the wide availability of babassu oil and the successful development of nanoparticle
 101 formulations by our group for diclofenac sodium delivery, we aim to demonstrate the capability of these
 102 nanoparticles to encapsulate smaller polar biomolecules, such as the HBV peptide SBIEFARL.

103 Nanoparticles have shown promising results in mucosal immunotherapy, offering tailored
 104 delivery systems for antigens and immunomodulatory agents. They enhance local immune responses,
 105 which are crucial for combating infections in mucosal surfaces like the respiratory, gastrointestinal,
 106 and urogenital tracts. Specifically, in the genital mucosa, nanoparticles provide an efficient means to
 107 deliver immunotherapeutic agents, potentially preventing sexually transmitted infections. Studies
 108 demonstrate their effectiveness in experimental models, highlighting their potential for preventive and
 109 therapeutic strategies in this context. In summary, nanoparticles represent an innovative avenue for
 110 developing targeted approaches against genital infections and other pathological conditions in
 111 mucosal tissues [39–45].

112 In order to assure feasibility, this nanocarrier needs to be non-cytotoxic and present a
 113 reasonable pharmaceutical loading capability and targeting, as well as controlled release features [46].
 114 This study aims to develop and characterize a nanostructured system containing the peptide

SSIEFARIL and develop, characterize, and validate a specific high-performance liquid chromatography (HPLC) methodology to quantify the peptide. To our knowledge, this is a first-time attempt to describe a polymeric nanoparticle delivery system using babassu oil to encapsulate a peptide for further use in genital mucosa murine models and to validate a specific HPLC quantification methodology for SSIEFARIL.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Babassu oil (*Orbignya oleifera*, Mundo dos Óleos™, Brazil), poly(ϵ -caprolactone) (Sigma-Aldrich™, Brazil), SSIEFARIL 85 % purity (GenScript™, NJ, USA), medium-chain triglycerides (capric and caprylic acids, Delonars™, Brazil), polysorbate 80 (Tween™ 80, Sigma-Aldrich, Brazil), acetone (Neon™, Brazil), ethanol (Dinâmica™, Brazil), acetonitrile (ACN) (Neon™, Brazil) and trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma-Aldrich™, Brazil). Babassu oil study was registered at SisGen (Identification ABCECDB).

2.2 Experimental methods

2.2.1 Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Methodology

The experiments were performed on a Prominence UFLC chromatographic system (Shimadzu™) consisting of a binary pump (model: LC-20AT), online degasser (model: DGU-20A5), ALS autosampler (model: SIL-20A), column oven (model: CTO-20A), PDA detector (model: SPD-M20A) and communication module (model: CBM-20A). Shimadzu LC-Solution™ software was used for data collection. All spectra were collected for peak identification and peak purity calculations.

2.2.2 Preparation of the Polymeric Nanoparticles

The preparation of nanoparticles containing babassu oil was carried out according to de Oliveira, J.V.R. *et al.* [24] through interfacial polymer deposition.

2.2.3 Physicochemical Characterization of the Polymeric Nanoparticles

For each batch, the volume-weighted mean diameter ($d_{4,3}$) and the polydispersity index (Span) were assessed using laser diffraction (Mastersizer™ 2000, Malvern Instruments, Ltd., Malvern, UK). Samples were diluted with ultrapure water to verify the z-average (mean diameters),

polydispersity index (PDI) by dynamic light scattering, and zeta potential by electrophoretic mobility, using Zetasizer™ nano-ZS ZEN 3600 (NanoSeries™, Malvern, UK). The pH was determined by a potentiometer PH2600 (Instrutherm™, São Paulo, Brazil). To determine the association efficiency (AE %) of the peptide SSIEFARL into the nanoparticles, the ultrafiltration-centrifugation method was carried out using centrifugal filter units of 10 kDa (Millipore™, Cork, Ireland). Transmission electron microscopy (TEM) (Tecnai™ G2-12, SpiritBiowin FEI, 120 kV operating at 80 kV) of NanoSSIEFARL was used to evaluate nanoparticle morphology.

2.2.4 Release Profile of SSIEFARL from Polymeric Nanoparticles

The release profile experiments were conducted using acetate buffer pH 4.5 (2.28 g of sodium acetate trihydrate + 1.91 mL acetic acid diluted in 1 L of ultrapure water).

2.2.5 Cell Viability Assay

Cell viability was assessed by flow cytometry using a viability dye. After, cells were analyzed by flow cytometry on FACSCanto™ II (BD Biosciences, USA).

2.2.6 Phagocytosis Assay

J774.A1 macrophages were used in this assay. The images were analyzed on EVOS FL Auto 2 Imaging Microscope (Invitrogen™, MA, USA).

2.2.7 Statistical Analysis

Data were analyzed by GraphPad™ Prism version 9.0.0 (La Jolla, CA, USA), and FlowJo™ Software (BD Biosciences, USA). The results are presented as the mean standard error of the mean (SEM) or mean standard deviation (SD). Student's *t*-test and ANOVA were also performed.

Acknowledgements

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), and Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Declarations of Interest: none.

References

- 1 Gupta, R., Warren, T., Wald, A.: 'Genital herpes' *Lancet*, 2007, 370, (9605), pp. 2127–2137.
- 2 Looker, K.J., Garnett, G.P.: 'A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2' *Sex. Transm. Infect.*, 2005, 81, (2), pp. 103–107.
- 3 Looker, K.J., Magaret, A.S., May, M.T., *et al.*: 'Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012' 2015, pp. 1–17.
- 4 Peng, Q.-C., Jones, C.: 'Towards an Understanding of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Reactivation Cycle' *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2010, 2010, pp. 1–18.
- 5 Garner, J.A.: 'Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells' *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, 55, (11), pp. 1497–1513.
- 6 Frank, G.M., Lepisto, A.J., Freeman, M.L., Sheridan, B.S., Charpes, T.L., Hendricks, R.L.: 'Early CD4 + T Cell Help Prevents Partial CD8 + T Cell Exhaustion and Promotes Maintenance of Herpes Simplex Virus 1 Latency' *J. Immunol.*, 2010, 184, (1), pp. 277–286.
- 7 St. Leger, A.J., Peters, B., Sidney, J., Sette, A., Hendricks, R.L.: 'Defining the Herpes Simplex Virus-Specific CD8 + T Cell Repertoire in C57BL/6 Mice' *J. Immunol.*, 2011, 186, (7), pp. 3927–3933.
- 8 Bonneau, R.H., Salucci, L.A., Johnson, D.C., Tewethia, S.S.: 'Epitope Specificity of H-2Kb-Restricted, HSV-1-, and HSV-2-Cross-Reactive Cytotoxic T Lymphocyte Clones' *Virology*, 1993, 198, (1), pp. 62–70.
- 9 Mahmood, A., Kaushik, A.C., Wei, D.: 'Prediction and validation of potent peptides against herpes simplex virus type 1 via immunoinformatics and systems biology approach' *Chem. Biol. Drug Des.*, 2019, 94, (5), pp. 1868–1883.
- 10 Koelle, D.M., Dong, L., Jing, L., *et al.*: 'HSV-2-Specific Human Female Reproductive Tract Tissue Resident Memory T Cells Recognize Diverse HSV Antigens' *Front. Immunol.*, 2022, 13, (March), pp. 1–18.
- 11 Resurdon, J.E., Spector, T.: 'Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase' *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, (13), pp. 7406–7411.
- 12 Kest, R.G., Hill, E.L., Tigges, M., Straus, S.E.: 'Recurrent Acyclovir-Resistant Genital Herpes in an Immunocompetent Patient' *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329, (24), pp. 1777–1782.
- 13 Kimberlin, D.W., Crumpecker, C.S., Straus, S.E., *et al.*: 'Antiviral resistance in clinical practice' *Antiviral Res.*, 1995, 28, (4), pp. 423–438.
- 14 Hanke, T., Graham, F.L., Rosenfield, K.L.: '(1991,Hanke)Identification of an Immunodominant cytotoxic T-lymphocyte recognition site gB of herpes simplex virus by using recombinant

- adenovirus vectors' *Vaccine*, 1991, 9, (3), pp. 1177–1188.
- 15 Quburu, N., Kim, R., Guitard, G.C., *et al.*: 'A Prime-Pull-Amplify Vaccination Strategy To Maximize Induction of Circulating and Germinal-Center Intraepithelial CD8 + Memory T Cells' *J. Immunol.*, 2019, 202, (4), pp. 1250–1264.
- 16 Schaffazick, S.R., Gutierrez, S.S., Freitas, L. de L., Pohlmann, A.R.: 'Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos' *Quim. Nova*, 2008, 31, (5), pp. 728–737.
- 17 Kumar, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C.: 'Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems' *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2010, 75, (1), pp. 1–18.
- 18 Woodruff, M.A., Hubmacher, D.W.: 'The return of a forgotten polymer - Polyisopropylene in the 21st century' *Prog. Polym. Sci.*, 2010, 35, (10), pp. 1217–1256.
- 19 Limayem Blouza, I., Charcoset, C., Star, S., Feil, H.: 'Preparation and characterization of spirinolactone-loaded nanocapsules for paediatric use' *Int. J. Pharm.*, 2008, 325, (1–2), pp. 124–131.
- 20 Rai, L.A., Contri, R.V., Bica, J.F., *et al.*: 'Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies' *Nanoscale Res. Lett.*, 2014, 9, (1), p. 233.
- 21 Honorio-França, A., Passos, R., França, E., *et al.*: 'Microemulsion of babassu oil as a natural product to improve human immune system function' *Drug Des. Devel. Ther.*, 2014, 8, p. 21.
- 22 de Sousa, V., Green, Borges, *et al.*: 'Nanostructured systems containing babassu (*Orbignya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia' *Int. J. Nanomedicine*, 2013, 8, p. 3129.
- 23 Reis, M.Y.F.A., Santos, B.M. dos, Silva, D.R., *et al.*: 'Anti-Inflammatory Activity of Babassu Oil and Development of a Microemulsion System for Topical Delivery' *Evidence-Based Complementary Altern. Med.*, 2017, 2017, pp. 1–14.
- 24 de Oliveira, J.V.R., Silveira, P.L., Spingolon, G., Alves, G.A.L., Pavia, F.P., Aguiar, T.A.S.: 'Polymeric nanoparticles containing babassu oil: A proposed drug delivery system for controlled release of hydrophilic compounds' *Chem. Phys. Lipids*, 2023, 263, p. 105304.
- 25 Bleick, I.G.C., Leoni, M., Arnsperger, J.T., *et al.*: 'Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil' *J. Ethnopharmacol.*, 2016, 173, pp. 383–423.
- 26 Souza, M.H.S.L., Monteiro, C.A., Figueiredo, P.M.S., Nascimento, F.R.F., Guerra, R.N.M.: 'Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil' *J. Ethnopharmacol.*, 2011, 133, (1), pp. 1–6.

- 250 27 Araújo, F.R., González-Pérez, B.E., Lopes, M.A., Viégas, I. de J.M.: 'Ethnobotany of babassu
251 palm (*Attalea speciosa* Mart.) in the Tucuruí Lake Protected Areas Mosaic - eastern
252 Amazon' *Acta Bot. Brasiliensia*, 2018, 30, (2), pp. 193–204.
- 253 28 Inthaphuak, S., Khonsung, P., Panthong, A.: 'Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic
254 activities of virgin coconut oil' *Pharm. Biol.*, 2010, 48, (2), pp. 151–157.
- 255 29 Almeida Campos, J.L., da Silva, T.L.L., Albuquerque, U.P., Peroni, N., Lima Araújo, E.:
256 'Knowledge, Use, and Management of the Babassu Palm (*Attalea speciosa* Mart. ex Spring)
257 In the Araripe Region (Northeastern Brazil)' *Econ. Bot.*, 2013, 66, (3), pp. 240–250.
- 258 30 Santos, D.S., Da Silva, I.G., Araújo, B.Q., *et al.*: 'Extraction and evaluation of fatty acid
259 composition of *Orbignya phalerata* martius oils (Arecaceae) from Maranhão state, Brazil' *J.*
260 *Braz. Chem. Soc.*, 2013, 24, (2), pp. 355–362.
- 261 31 'Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes Third Edition David
262 Fennell, Editor' (no date)
- 263 32 Rodrigues, E. da C.R., Ferreira, A.M., Vilhena, J.C.E., *et al.*: 'Development of babassu oil
264 based nanoemulsions' *Lat. Am. J. Pharm.*, 2015, 34, (2), pp. 338–343.
- 265 33 Gurniero, V.G., da Rocha Filho, P.A.: 'Babassu Nanoemulsions Have Physical and Chemical
266 Stability' *J. Dispens. Sci. Technol.*, 2012, 33, (11), pp. 1569–1573.
- 267 34 Nascimento, F.R.F., Barroqueiro, E.S.B., Azevedo, A.P.S., *et al.*: 'Macrophage activation
268 Induced by *Orbignya phalerata* Mart.' *J. Ethnopharmacol.*, 2006, 103, (1), pp. 53–58.
- 269 35 da Silva, B.P., Parente, J.P.: 'An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide
270 from *Orbignya phalerata*' *Fitoterapia*, 2001, 72, (8), pp. 887–893.
- 271 36 da Sousa, V.P., Green, J., Borges, V.R. de A., *et al.*: 'Nanostructured systems containing
272 babassu (*Orbignya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic
273 hyperplasia' *Int. J. Nanomedicine*, 2013, 8, pp. 3129–3139.
- 274 37 IBGE: 'Senhoras das palmeiras' 15, 2019, pp. 1–26.
- 275 38 SARAIVA, A., OLIVEIRA, N., PEDROZA FILHO, M., LOPES, W.: 'Cadeia Produtiva Do
276 Babassu Em Cidelandia-Ma: Uma Análise a Partir Da Abordagem Da Cadeia Global De
277 Valor' *Rev. Braz. Geodito e Desenvol. Reg.*, 2019, 15, (2).
- 278 39 Plaza-Oliver, M., Santander-Ortega, M.J., Lozano, M.V.: 'Current approaches in lipid-based
279 nanocarriers for oral drug delivery' *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2021, 11, (2), pp. 471–497.
- 280 40 Leyva-Gómez, G., Piñón-Segundo, E., Mendoza-Muñoz, N., Zambrano-Zaragoza, M.L.,
281 Mendoza-Elvira, S., Quintanar-Guerrero, D.: 'Approaches in polymeric nanoparticles for
282 vaginal drug delivery: A review of the state of the art' *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19, (6), pp. 1–18.
- 283 41 Ensign, L.M., Lai, S.K., Wang, Y.Y., *et al.*: 'Pretreatment of human cervicovaginal mucous with

- 284 pluronic F127 enhances nanoparticle penetration without compromising mucous barrier
 285 properties to herpes simplex virus' *Biomacromolecules*, 2014, 15, (12), pp. 4403–4408.
- 286 42 Ensign, L.M., Cone, R., Hanes, J.: 'Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A
 287 review' *J. Control. Release*, 2014, 190, pp. 500–514.
- 288 43 Shapiro, R.L., DeLong, K., Zulfiqar, F., Carter, D., Better, M., Ensign, L.M.: 'In vitro and ex
 289 vivo models for evaluating vaginal drug delivery systems' *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2022, 191,
 290 pp. 1–39.
- 291 44 Nayak, R., Kar, B., Ghosh, G., Rath, G.: 'Current trends in chitosan based
 292 nanopharmaceuticals for topical vaginal therapies' *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, 183, (PB), pp.
 293 2140–2152.
- 294 45 Vitali, D., Bagri, P., Weesels, J.M., *et al.*: 'Curcumin can decrease tissue inflammation and the
 295 severity of HSV-2 infection in the female reproductive mucosa' *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21, (1).
- 296 46 Selvamuthukumar, S., Velmurugan, R.: 'Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug
 297 carrier for cancer chemotherapy' *Lipids Health Dis.*, 2012, 11, (1), p. 159.
- 298 47 Poiatto, F.S., Fiel, L.A., Lopes, M. V., *et al.*: 'Fluorescent-Labeled Poly(ϵ -caprolactone)
 299 Lipid-Core Nanocapsules: Synthesis, Physicochemical Properties and Macrophage Uptake' *J.*
 300 *Colloid Sci. Biotechnol.*, 2012, 1, (1), pp. 89–98.
- 301 48 Zhao, B., Li, X., Kong, Y., *et al.*: 'Recent advances in nano-drug delivery systems for
 302 synergistic antitumor immunotherapy' *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10, (September), pp.
 303 1–18.
- 304 49 Gu, Z., Yan, L., Tian, G., Li, S., Chai, Z., Zhao, Y.: 'Recent advances in design and
 305 fabrication of upconversion nanoparticles and their safe theranostic applications' *Adv. Mater.*,
 306 2013, 25, (28), pp. 3758–3778.
- 307 50 Hileto, G.M., Sulczewski, F.B., Lixinski, R., *et al.*: 'Development and immunobiological
 308 evaluation of nanoparticles containing an immunodominant epitope of herpes simplex
 309 virus' *RET Microbiotechnology*, 2021, 15, (8), pp. 532–544.
- 310 51 Saúde, M. de; A.N. de V.S.: 'RDC nº 186 de 24 de Julho de 2017.' (2017), 2017, p. 22
- 311 52 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL
 312 REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE:
 313 'VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)'
 314 (2014), 50, p. 17
- 315 53 Justus, B., Kanunire, C.C., Budel, J.M., *et al.*: 'New Insights into the mechanisms of French
 316 lavender essential oil on non-small-cell lung cancer cell growth' *Ind. Crops Prod.*, 2019, 136,
 317 (April), pp. 28–36.

- 318 64 Lopes, G.E., Langoski, G., Klein, T., Ferrari, P.G., Farago, P.V.: 'A simple hpc method for the
319 determination of halcinonide in lipid nanoparticles: Development, validation, encapsulation
320 efficiency, and in vitro drug permeation' *Brazilian J. Pharm. Sci.*, 2017, 53, (2).
- 321 65 Sulariya, V., Wehrung, D., Goldenhuys, W.J.: 'Development and Validation of a Novel RP-
322 HPLC Method for the Analysis.pdf'2012, pp. 271–276.
- 323 56 Neves, J., Arau, F., Andrade, F., *et al.*: 'In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Polymeric
324 Nanoparticles for Vaginal and Rectal Delivery of the Anti-HIV Drug Dapivirine'2013.
- 325 57 Chaudhari, S.P., Dugar, R.P.: 'Application of surfactants in solid dispersion technology for
326 improving solubility of poorly water soluble drugs' *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2017, 41, pp.
327 68–77.
- 328 58 Ravichandran, V., Lee, M., Gao, T.G.N., Shim, M.S.: 'Polyorbato-based drug formulations
329 for brain-targeted drug delivery and anticancer therapy' *Appl. Sci.*, 2021, 11, (19).
- 330 69 Gomes, M.L.B., da Silva Nascimento, N., Borsato, D.M., *et al.*: 'Long-lasting anti-platelet
331 activity of clostazol from poly(-caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend
332 nanocapsules' *Mater. Sci. Eng. C*, 2019, 94, (February 2018), pp. 694–702.
- 333 60 Fontana, M.C.: 'Nanopartículas Contendo Propionato De Clobetasol : Preparação ,
334 Caracterização'2010.
- 335 61 Bruinsmann, F.A., Buse, J.H., Souto, G.D., *et al.*: 'Erlotinib-Loaded Poly(-Caprolactone)
336 Nanocapsules Improve In Vitro Cytotoxicity and Anticancerogenic Effects on Human A549 Lung
337 Cancer Cells' *AAPS PharmSciTech*, 2020, 21, (6), pp. 1–12.
- 338 62 Raphael, E., Ferrari, J., Lyon, J., Schlegel, M., Gontijo, L., Santos, D.: 'pH effect on the
339 synthesis of different size silver nanoparticles evaluated by DLS and their size-dependent
340 antimicrobial activity Efeito do pH na síntese de diferentes tamanhos de nanopartículas de
341 prata avaliadas por EDL e sua atividade antimicrobiana' *J. Microbiol. (Rio Janeiro)*, 2020, 25, p.
342 e-12845.
- 343 63 Patel, A; Patel, M; Yang, X; Mitra, A.: 'Recent Advances In Protein and Peptide Drug
344 Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles' *Protein Pept. Lett.*, 2014, 21, (11).
- 345 64 Kim, M.H., Fang, T., Zhang, Q., Chan, H.Y.E., Chau, Y.: 'Co-encapsulation and co-delivery of
346 peptide drugs via polymeric nanoparticles' *Polymers (Basel)*, 2019, 11, (2), pp. 1–16.
- 347 65 McClements, D.J.: 'Encapsulation , protection , and delivery of bioactive proteins and peptides
348 using nanoparticles and microparticles systems : A review' *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2018,
349 253, pp. 1–22.
- 350 66 Sharma, R., Raghev, R., Priyanka, K., *et al.*: 'Exploiting chitosan and gold nanoparticles for
351 antimycobacterial activity of in silico identified antimicrobial motif of human neutrophil

- peptide-1' *Sci. Rep.*, 2018, 8, (1), pp. 1–14.
- 67 Hasean, A., Ibram, A., Raza, A., *et al.*: 'Therapeutic potential of novel mastoparan-chitosan nanoconstructs against clinical MDR *Acinetobacter baumannii*: in silico, in vitro and in vivo Studies' *Int. J. Nanomedicine*, 2021, 16, pp. 3765–3773.
- 68 Feliciani, C., Zevolini, F., Brunetti, J., *et al.*: 'Antimicrobial peptide-loaded nanoparticles as Inhalation therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections' *Int. J. Nanomedicine*, 2020, 15, pp. 1117–1128.
- 69 Casciaro, B., D'Angelo, I., Zhang, X., *et al.*: 'Poly(lactide- co-glycolide) Nanoparticles for Prolonged Therapeutic Efficacy of Esquilarin-1a-Derived Antimicrobial Peptides against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection: In Vitro and In Vivo Studies' *Biomacromolecules*, 2018, 20, (5), pp. 1876–1888.
- 70 Chi, Y., Zhu, S., Wang, C., *et al.*: 'Glioma homing peptide-modified PEG-PCL nanoparticles for enhanced anti-glioma therapy' *J. Drug Target.*, 2016, 24, (3), pp. 224–232.
- 71 Tanaka, K., Kanazawa, T., Shibata, Y., *et al.*: 'Development of cell-penetrating peptide-modified MPEG-PCL diblock copolymeric nanoparticles for systemic gene delivery' *Int. J. Pharm.*, 2010, 396, (1–2), pp. 229–238.
- 72 Lu, N., Li, R., Liu, Q., *et al.*: 'Antitumor and antimetastatic effects of pemetrexed-loaded targeted nanoparticles in B16 bearing mice' *Drug Deliv.*, 2016, 23, (7), pp. 2568–2574.
- 73 Pourcelle, V., Devouge, S., Garriot, M., Priat, V., Marchand-Brynaert, J.: 'PCL-PEG-based nanoparticles grafted with GRGDs peptide: Preparation and surface analysis by XPS' *Biomacromolecules*, 2007, 8, (12), pp. 9977–9983.
- 74 da Oliveira, J.V.R., Silveira, F.L., Spingolon, G., Alves, G.A.L., Paiva, F.P., Aguiar, T.A.S.: 'Polymeric nanoparticles containing babassu oil: A proposed drug delivery system for controlled release of hydrophilic compounds' *Chem. Phys. Lipids*, 2023, 253, (February).
- 75 Wu, X., Guy, R.H.: 'Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics' *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2008, 18, (6), pp. 371–384.
- 76 Frank, L.A., Contri, R. V, Beck, R.G.R., Pohlmann, A.R., Gutierrez, S.S.: 'Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules' 2015.
- 77 Contri, R. V, Bonferoni, M.C., Caramella, C., Frank, A.G., Pohlmann, A.R., Gutierrez, S.S.: 'Chitosan gel containing polymeric nanocapsules : a new formulation for vaginal drug delivery' 2014, pp. 3151–3181.
- 78 Frank, L.A., Chaves, P.S., Amora, C.M.D., *et al.*: 'European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules : Increasing penetration and adhesion of Imiquimod in vaginal tissue' *Eur. J.*

- 386 *Pharm. Biopharm.*, 2017, 114, pp. 202–212.
- 387 79 Kopp, M., Aufderhorst, U.W., Alt, M., *et al.*: 'Induction of herpes simplex virus type 1 cell-to-cell spread inhibiting antibodies by a calcium phosphate nanoparticle-based vaccine' *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2019, 18, pp. 138–148.
- 389 80 Fotioclila, T., Vecchione, R., Scognumiglio, P.L., *et al.*: 'Enhanced Drug Delivery into Cell Cytosol via Glycoprotein H-Derived Peptide Conjugated Nanoemulsions' *ACS Nano*, 2017, 11, (10), pp. 9802–9813.
- 391 81 Falanga, A., Tarallo, R., Carberry, T., Galdiero, M., Weck, M., Galdiero, S.: 'Elucidation of the Interaction mechanism with liposomes of gH625-peptide functionalized dendrimers' *PLoS One*, 2014, 9, (11).
- 393 82 Gong, E., Matthews, B., McCarthy, T., *et al.*: 'Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses' *Antiviral Res.*, 2005, 66, (3), pp. 139–148.
- 395 83 Harehyno, L.A., Watkins, S.C., Gambotto, A., Barnatt-Boyes, S.M.: 'Dendritic Cells Acquire Antigen from Live Cells for Cross-Presentation to CTL' *J. Immunol.*, 2001, 166, (6), pp. 3717–3723.
- 397 84 Nayak, J.V., Holey, D.A., Larregina, A., *et al.*: 'Phagocytosis Induces Lysosome Remodeling and Regulated Presentation of Particulate Antigen by Activated Dendritic Cells' *J. Immunol.*, 2008, 177, (12), pp. 8493–8503.
- 400 85 Kong, B., Seog, J.H., Graham, L.M., Lee, S.B.: 'Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles' *Nanomedicine*, 2011, 6, (5), pp. 929–941.
- 402 86 Embgenbroich, M., Burgdorf, S.: 'Current concepts of antigen cross-presentation' *Front. Immunol.*, 2018, 9, (JUL).
- 404
- 405
- 406
- 407
- 408
- 409

4 PRODUÇÃO DE GelNanoSSIEFARL

Considerando que um dos objetivos seria utilizar NanoSSIEFARL para aplicação tópica na mucosa de camundongos, a nova formulação de nanopartículas incorporadas em uma matriz de hidrogel foi preparada utilizando o polímero Pluronic® F-127 (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemanha) como termohidrogel para facilitar seu uso em locais da mucosa e para aumentar a mucoadesão (306–309).

5 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Para avaliar se havia a presença de infiltrado inflamatório na mucosa tratada com NanoSSIEFARL, foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas com 8 semanas de idade (n = 4).

6 DISCUSSÃO

Nosso grupo já desenvolveu uma nanopartícula contendo SSIEFARL com uma metodologia específica de CLAE (97). Porém, a mesma apresentou baixa eficiência de associação do peptídeo (< 5 %), se tornando uma nanopartícula inviável para ensaios futuros. Ainda, a metodologia desenvolvida se baseava nos compostos da nanopartícula, os quais possuem diferenças para esta nova NP apresentada. Além disso, não foi demonstrada a validação da metodologia CLAE de acordo com as diretrizes do ICH. Portanto, aqui desenvolvemos uma nova formulação e validamos uma metodologia de acordo com o ICH considerando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

7 CONCLUSÕES

Esta tese de doutorado teve como objetivo validar uma metodologia específica de CLAE para quantificar o peptídeo SSIEFARL – metodologia essa inédita na literatura - que apresentou parâmetros ótimos de caracterização exigidos pelo ICH. Ainda, produzir e caracterizar uma nanopartícula polimérica

de núcleo lipídico contendo óleo de babaçu para associar o peptídeo imunodominante SSIEFARL (NanoSSIEFARL).

8 REFERÊNCIAS

1. Looker KJ, Garnett GP. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect.* 2005;81(2):103–7.
2. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet* [Internet]. 2007 Dec;370(9605):2127–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607619084>
3. Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KME, Vickerman P, Gottlieb SL, et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. 2015;1–17.
4. Pereira M, Santos DM, Pacheco M, Assis L De, Daniela D, Fonseca D, et al. Herpesvírus humano : tipos , manifestações orais e tratamento Human herpes virus : types , oral manifestations and treatment. 2012;11(3):191–6.
5. Murray PR, Rosenthal KS PM. Medical microbiology. 2015.
6. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human Herpes Simplex Virus : Life Cycle and Development of Inhibitors. 2014;79(13):1635–52.
7. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection : overview on relevant clinico-pathological features *. 2008;107–21.
8. Roizman B, Knipe DM WR. Herpes simplex viruses. In: *Fields Virology*. 2007.
9. Silva S BW. Herpes virus amplicon vectors. In: *Viruses*. 2009.
10. Whitley RJ. Herpes simplex virus infection. *Semin Pediatr Infect Dis* [Internet]. 2002 Jan;13(1):6–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045187002500340>
11. Giovine P, Settembre EC, Bhargava AK, Luftig MA, Lou H, Cohen GH, et al. Structure of herpes simplex virus glycoprotein d bound to the human receptor nectin-1. *PLoS Pathog.* 2011;7(9).
12. Li L, Qiu Z, Li Y, Liang F, Ye H, Cai Y, et al. Herpes B virus gD interaction with its human receptor - An in silico analysis approach. *Theor Biol Med Model.* 2014;11(1):1–16.
13. Cliffe AR, Knipe DM. Herpes Simplex Virus ICP0 Promotes both Histone Removal and Acetylation on Viral DNA during Lytic Infection. *J Virol.* 2008;82(24):12030–8.
14. Cardone G, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Steven AC. Procapsid assembly, maturation, nuclear exit: Dynamic steps in the production of infectious herpesvirions. *Adv Exp Med Biol.* 2012;726:423–39.
15. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS M, SA MT. Herpesvirus. In: *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 2012.
16. World Health Organization. Herpes simplex virus [Internet]. 2015. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/en/
17. Boralevi F, Geniaux M. Herpes genital. *Rev du Prat.* 1996;46(16):1952–60.
18. Prasad KM, Watson AMM, Dickerson FB, Yolken RH, Nimgaonkar VL.

- Exposure to herpes simplex virus type 1 and cognitive impairments in individuals with schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2012;38(6):1137–48.
19. Kimberlin DW, Crumpacker CS, Straus SE, Biron KK, Drew WL, Hayden FG, et al. Antiviral resistance in clinical practice. *Antiviral Res* [Internet]. 1995 Apr;26(4):423–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016635429500031G>
 20. Kost RG, Hill EL, Tigges M, Straus SE. Recurrent Acyclovir-Resistant Genital Herpes in an Immunocompetent Patient. *N Engl J Med* [Internet]. 1993 Dec 9;329(24):1777–82. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199309303291401>
 21. Reardon JE, Spector T. Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. *J Biol Chem* [Internet]. 1989 May;264(13):7405–11. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83248-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83248-3)
 22. America N. Henry masur,. 1992;92(Cmv):1–2.
 23. Arellano-Galindo J, Lilia B, Vargas-Infante Y, Santos-Esteban E, Carmen Herrera-Martinez E del, Velazquez-Guadarrama N, et al. Point Mutations and Antiviral Drug Resistance. *Point Mutat.* 2012;
 24. Field HJ, Anthony Vere Hodge R. Recent developments in anti-herpesvirus drugs. *Br Med Bull.* 2013;106(1):213–49.
 25. Chatis PA, Crumpacker CS. Analysis of the thymidine kinase gene from clinically isolated acyclovir-resistant herpes simplex viruses. *Virology.* 1991;180(2):793–7.
 26. Kurokawa M, Shimizu T, Takeshita Y, Takamori Y, Kai H, Sawamura R, et al. Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2011;2011.
 27. Jang MH, Piao XL, Kim JM, Kwon SW, Park JH. Inhibition of cholinesterase and amyloid- β aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phyther Res* [Internet]. 2008;22(4):544–549. Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117934759/abstract>
 28. Hemilä H. Vitamin C and infections. *Nutrients.* 2017;9(4).
 29. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Immune-enhancing role of Vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann Nutr Metab.* 2006;50(2):85–94.
 30. Agyemang E, Magaret AS, Selke S, Johnston C, Corey L, Wald A. Herpes simplex virus shedding rate: Surrogate outcome for genital herpes recurrence frequency and lesion rates, and phase 2 clinical trials end point for evaluating efficacy of antivirals. *J Infect Dis.* 2018;218(11):1691–9.
 31. You S, Yaesoubi R, Lee K, Li Y, Eppink ST, Hsu KK, et al. Lifetime quality-adjusted life years lost due to genital herpes acquired in the United States in 2018: a mathematical modeling study. *Lancet Reg Heal - Am* [Internet]. 2023;19(February):100427. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2023.100427>
 32. Usatine R, Tinitigan R. Nongenital Herpes Simplex Virus - American Family Physician. *Am Fam Physician* [Internet]. 2010;1075–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21121552/>
 33. Sethi G. Genital Herpes [Internet]. *Ridley's The Vulva. ACADEMIC PRESS*; 2022. 94–98 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0->

- 12-288145-9.50028-0
34. Benedetti J, Corey L, Ashley R. Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. *Ann Intern Med.* 1994;121(11):847–54.
 35. Schiffer JT, Corey L. Rapid host immune response and viral dynamics in herpes simplex virus-2 infection. *Nat Med.* 2013;19(3):280–90.
 36. Chentoufi AA, Benmohamed L. Mucosal herpes immunity and immunopathology to ocular and genital herpes simplex virus infections. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012.
 37. Yamada S ichi, Kameyama T, Nagaya S, Hashizume Y, Yoshida M. Relapsing herpes simplex encephalitis: Pathological confirmation of viral reactivation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74(2):262–4.
 38. Lahat E, Barr J, Barkai G, Paret G, Brand N, Barzilai A. Long term neurological outcome of herpes encephalitis. *Arch Dis Child.* 1999;80(1):69–71.
 39. DeBiasi RL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Richardson-Burns S, Tyler KL. Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis. *J Infect Dis.* 2002;186(11):1547–57.
 40. De Tiège X, Rozenberg F, Burlot K, Gaudelus J, Ponsot G, Héron B. Herpes simplex encephalitis: Diagnostic problems and late relapse. *Dev Med Child Neurol.* 2006;48(1):60–3.
 41. McGrath N, Anderson NE, Croxson MC, Powell KF. Herpes simplex encephalitis treated with acyclovir: Diagnosis and long term outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;63(3):321–6.
 42. Celum C, Levine R, Weaver M, Wald A. Genital herpes and human immunodeficiency virus: Double trouble. *Bull World Health Organ.* 2004;82(6):447–53.
 43. Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(21):1604–13.
 44. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: Systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Aids.* 2006;20(1):73–83.
 45. Horbul JE, Schmechel SC, Miller BRL, Rice SA, Southern PJ. Herpes simplex Virus-Induced epithelial damage and susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in human cervical organ culture. *PLoS One.* 2011;6(7).
 46. Kimberlin DW, Baley J. Guidance on management of asymptomatic neonates born to women with active genital herpes lesions. *Pediatrics.* 2013;131(2):635–46.
 47. Brown ZA, Wald A, Morrow RA, Zeh J, Corey L. Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *J Am Med Assoc.* 2003;289(2):203–9.
 48. Jamehdar SA, Mammouri G, Hoseini MRS, Nomani H, Afzalaghade M, Boskabadi H, et al. Herpes simplex virus infection in neonates and young infants with sepsis. *Iran Red Crescent Med J.* 2014;16(2).
 49. Wang K, Merin A, Rendina HJ, Pachankis JE, Division BS. of a Highly Prevalent Yet Hidden Public Health Problem. 2019;3(1):27–34.
 50. Clemens SAC, Farhat CK. Soroprevalência de anticorpos contra vírus

- herpes simples 1-2 no Brasil. Rev Saude Publica. 2010;44(4):726–34.
51. No Titleبييب.
52. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Immunologia. Vol. 27, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1985. 53–54 p.
53. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc London Ser B - Biol Sci. 1957;147(927):258–67.
54. Haven N. Innate immunity : impact on the adaptive immune response Ruslan Medzhitov and Charles A Janeway Jr. Heal San Fr [Internet]. 1997;9(1):4–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039775>
55. Johnston C, Corey L. Current concepts for genital herpes simplex virus infection: Diagnostics and pathogenesis of genital tract shedding. Clin Microbiol Rev. 2015;29(1):149–61.
56. Norberg P, Bergström T, Rekabdar E, Lindh M, Liljeqvist J-Å. Phylogenetic Analysis of Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Isolates Identified Three Genetic Groups and Recombinant Viruses. J Virol. 2004;78(19):10755–64.
57. Kaerner HC, Schröder CH, Ott-Hartmann A, Kümel G, Kirchner H. Genetic variability of herpes simplex virus: development of a pathogenic variant during passaging of a nonpathogenic herpes simplex virus type 1 virus strain in mouse brain. J Virol. 1983;46(1):83–93.
58. Paludan SR, Bowie AG. Immune Sensing of DNA. Immunity [Internet]. 2013;38(5):870–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.004>
59. Jones C, Perng GC. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2010;2010.
60. Su C, Zhan G, Zheng C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. Virol J [Internet]. 2016;13(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0495-5>
61. Melchjorsen J, Matikainen S, Paludan SR. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. Viruses. 2009;1(3):737–59.
62. Nicoll MP, Proença JT, Efsthathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(3):684–705.
63. Leib DA, Bogard CL, Kosz-Vnenchak M, Hicks KA, Coen DM, Knipe DM, et al. A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. J Virol. 1989;63(7):2893–900.
64. Justin I. Odegaard, Chawla A. 基因的改变NIH Public Access. Bone. 2008;23(1):1–7.
65. O’Neil JE, Loutsch JM, Aguilar JS, Hill JM, Wagner EK, Bloom DC. Wide Variations in Herpes Simplex Virus Type 1 Inoculum Dose and Latency-Associated Transcript Expression Phenotype Do Not Alter the Establishment of Latency in the Rabbit Eye Model. J Virol. 2004;78(10):5038–44.
66. Wilcox CL, Johnson EM. Nerve growth factor deprivation results in the reactivation of latent herpes simplex virus in vitro. J Virol. 1987;61(7):2311–5.

67. Wilcox CL, Johnson EM. Characterization of nerve growth factor-dependent herpes simplex virus latency in neurons in vitro. *J Virol*. 1988;62(2):393–9.
68. Wilcox CL, Smith RL, Freed CR, Johnson EM. Nerve growth factor-dependence of herpes simplex virus latency in peripheral sympathetic and sensory neurons in vitro. *J Neurosci*. 1990;10(4):1268–75.
69. Arthur JL, Scarpini CG, Connor V, Lachmann RH, Tolkovsky AM, Efsthathiou S. Herpes Simplex Virus Type 1 Promoter Activity during Latency Establishment, Maintenance, and Reactivation in Primary Dorsal Root Neurons In Vitro. *J Virol*. 2001;75(8):3885–95.
70. Danaher RJ, Jacob RJ, Miller CS. Establishment of a quiescent herpes simplex virus type 1 infection in neurally-differentiated PC12 cells. *J Neurovirol*. 1999;5(3):258–67.
71. Colgin MA, Smith RL, Wilcox CL. Inducible Cyclic AMP Early Repressor Produces Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus Type 1 in Neurons In Vitro. *J Virol*. 2001;75(6):2912–20.
72. Smith RL, Pizer LI, Johnson EM, Wilcox CL. Activation of second-messenger pathways reactivates latent herpes simplex virus in neuronal cultures. *Virology*. 1992;188(1):311–8.
73. Moriya A, Yoshiki A, Kita M, Fushiki S, Imanishi J. Heat shock-induced reactivation of herpes simplex virus type 1 in latently infected mouse trigeminal ganglion cells in dissociated culture. *Arch Virol*. 1994;135(3–4):419–25.
74. Halford WP, Gebhardt BM, Carr DJ. Mechanisms of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Virol*. 1996;70(8):5051–60.
75. Perng G-C, Jones C. Towards an Understanding of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Reactivation Cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis* [Internet]. 2010;2010:1–18. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2010/262415/>
76. Garner JA. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2003 Nov;55(11):1497–513. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X03001650>
77. Frank GM, Lepisto AJ, Freeman ML, Sheridan BS, Cherpes TL, Hendricks RL. Early CD4 + T Cell Help Prevents Partial CD8 + T Cell Exhaustion and Promotes Maintenance of Herpes Simplex Virus 1 Latency. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jan 1;184(1):277–86. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0902373>
78. Frank GM, Lepisto AJ, Freeman ML, Sheridan BS, Cherpes TL, Hendricks RL. Early CD4+ T Cell Help Prevents Partial CD8+ T Cell Exhaustion and Promotes Maintenance of Herpes Simplex Virus 1 Latency. *J Immunol*. 2010;184(1):277–86.
79. Liu T, Khanna KM, Carriere BN, Hendricks RL. Gamma Interferon Can Prevent Herpes Simplex Virus Type 1 Reactivation from Latency in Sensory Neurons. *J Virol*. 2001;75(22):11178–84.
80. Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Noncytotoxic Lytic Granule-Mediated CD8 + T Cell Inhibition of HSV-1 Reactivation from Neuronal Latency. *Science* (80-) [Internet]. 2008 Oct 10;322(5899):268–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728>

- .pdf%0Ahttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2688697/pdf/nihms-110443.pdf
81. Plotkin, S. A., Orenstein, W. A., & Offit PA. *Vaccines*. 2017. 1720 p.
 82. Jackson LA, Anderson EJ, Rouphael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2020;383(20):1920–31.
 83. Corey L, Wald A. Maternal and Neonatal HSV Infections. *N Engl J Med*. 2009;361(14):1376–85.
 84. Bastidas A, De La Serna J, El Idrissi M, Oostvogels L, Quittet P, López-Jiménez J, et al. Effect of Recombinant Zoster Vaccine on Incidence of Herpes Zoster after Autologous Stem Cell Transplantation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2019;322(2):123–33.
 85. Bernstein DI, Pullum DA, Cardin RD, Bravo FJ, Dixon DA, Kousoulas KG. The HSV-1 live attenuated VC2 vaccine provides protection against HSV-2 genital infection in the guinea pig model of genital herpes. *Vaccine* [Internet]. 2019;37(1):61–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.042>
 86. Straus SE, Savarese B, Krause PR, Kost RG, Meier JL, Corey L, et al. Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet*. 1994;343(8911):1460–3.
 87. Wan M, Yang X, Chen Z, Su W, Cai L, Hou A, et al. Comparison of effects of multiple adjuvants and immunization routes on the immunogenicity and protection of HSV-2 gD subunit vaccine. *Immunol Lett* [Internet]. 2023;260(November 2022):11–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2023.06.004>
 88. Bourne N, Keith CA, Miller AL, Pyles RB, Cohen G, Milligan GN. Boosting of vaginal HSV-2-specific B and T cell responses by intravaginal therapeutic immunization results in diminished recurrent HSV-2 disease. Cliffe AR, editor. *J Virol* [Internet]. 2023 Sep 28;97(9). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.00669-23>
 89. Shin H, Iwasaki A. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature*. 2012;491(7424):463–7.
 90. Gopinath S, Lu P, Iwasaki A. Cutting Edge: The Use of Topical Aminoglycosides as an Effective Pull in “Prime and Pull” Vaccine Strategy. *J Immunol*. 2020;204(7):1703–7.
 91. Bernstein DI, Cardin RD, Bravo FJ, Awasthi S, Lu P, Pullum DA, et al. Successful application of prime and pull strategy for a therapeutic HSV vaccine. *npj Vaccines* [Internet]. 2019;4(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41541-019-0129-1>
 92. Mulvey PBM, Trim LK, Aaskov JG, Bryan ER, Sweeney EL, Kollipara A, et al. Primary oral vaccination followed by a vaginal pull protects mice against genital HSV-2 infection. *Am J Reprod Immunol*. 2023;89(3):1–11.
 93. Solís-Cruz GY, Alvarez-Roman R, Rivas-Galindo VM, Galindo-Rodríguez SA, Silva-Mares DA, Marino-Martínez IA, et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles loaded with riolozatrione: a promising nanoformulation with potential antiherpetic activity. *Acta Pharm*. 2023;73(3):457–73.
 94. Pan X, Zhang Y, Zhao Y, Yao S, Guan C, Wang L, et al. Inhibitory activity

- and mechanism of silver nanoparticles against herpes simplex virus type 1. *Arch Virol* [Internet]. 2022;167(8):1619–36. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05467-x>
95. Bernstein DI, Cardin RD, Bravo FJ, Hamouda T, Pullum DA, Cohen G, et al. Intranasal nanoemulsion-adjuvanted HSV-2 subunit vaccine is effective as a prophylactic and therapeutic vaccine using the guinea pig model of genital herpes. *Vaccine*. 2019;37(43):6470–7.
 96. Donalisio M, Leone F, Civra A, Spagnolo R, Ozer O, Lembo D, et al. Acyclovir-loaded chitosan nanospheres from nano-emulsion templating for the topical treatment of herpesviruses infections. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):1–12.
 97. Hilario GM, Sulczewski FB, Liszbinski R, Mello LD, Hagen G, Fazolo T, et al. Development and immunobiological evaluation of nanoparticles containing an immunodominant epitope of herpes simplex virus. *IET Nanobiotechnology*. 2021;15(6):532–44.
 98. Krzyzowska M, Janicka M, Chodkowski M, Patrycy M, Obuch-Woszczatyńska O, Tomaszewska E, et al. Epigallocatechin Gallate-Modified Silver Nanoparticles Show Antiviral Activity against Herpes Simplex Type 1 and 2. *Viruses*. 2023;15(10).
 99. Sangboonruang S, Semakul N, Sookkree S, Kantapan J, Ngo-Giang-huong N, Khamduang W, et al. Activity of Propolis Nanoparticles against HSV-2: Promising Approach to Inhibiting Infection and Replication. *Molecules*. 2022;27(8):1–16.
 100. Krzyzowska M, Chodkowski M, Janicka M, Dmowska D, Tomaszewska E, Ranoszek-Soliwoda K, et al. Lactoferrin-Functionalized Noble Metal Nanoparticles as New Antivirals for HSV-2 Infection. *Microorganisms*. 2022;10(1).
 101. Awasthi S, Friedman HM. An mRNA vaccine to prevent genital herpes. *Transl Res*. 2022;242(January):56–65.
 102. Neyts J, Kristmundsdóttir T, Clercq E De, Thormar H. Hydrogels Containing Monocaprin Prevent Intravaginal and Intracutaneous Infections With HSV-2 in Mice. *J Med Virol*. 2000;110(July 1999):107–10.
 103. Kretschmer M, Ceña-Diez R, Butnarusu C, Silveira V, Dobryden I, Visentin S, et al. Synthetic Mucin Gels with Self-Healing Properties Augment Lubricity and Inhibit HIV-1 and HSV-2 Transmission. *Adv Sci*. 2022;9(32):1–12.
 104. Alkhatib MH, Aly MM, Rahbeni RA, Balamash KS. Antimicrobial activity of biocompatible microemulsions against *Aspergillus niger* and herpes simplex virus type 2. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(9).
 105. Argenta DF, Bidone J, Koester LS, Bassani VL, Simões CMO, Teixeira HF. Topical Delivery of Coumestrol from Lipid Nanoemulsions Thickened with Hydroxyethylcellulose for Antiherpes Treatment. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(1):192–200.
 106. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;65(3):259–69.
 107. Mamo T, Moseman EA, Kolishetti N, Salvador-Morales C, Shi J, Kuritzkes DR, et al. Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention. *Nanomedicine*. 2010;5(2):269–85.

108. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A review. *J Control Release*. 2014;190:500–14.
109. Reiss P, Jong MD d. Antiviral drugs. *Side Eff Drugs Annu*. 1999;22:317–20.
110. Snoeck R, Andrei G, De Clercq E. Current pharmacological approaches to the therapy of varicella zoster virus infections. A guide to treatment. *Drugs*. 1999;57(2):187–206.
111. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: Mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(2):459–72.
112. De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol*. 2004;30(2):115–33.
113. Treat BR, Bidula SM, Ramachandran S, St Leger AJ, Hendricks RL, Kinchington PR. Influence of an immunodominant herpes simplex virus type 1 CD8+T cell epitope on the target hierarchy and function of subdominant CD8+T cells. *PLoS Pathog*. 2017;13(12):1–25.
114. Altman JD, Davis MM. MHC-peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells. *Curr Protoc Immunol*. 2003;Chapter 17:1–33.
115. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(3):187–207.
116. St. Leger AJ, Peters B, Sidney J, Sette A, Hendricks RL. Defining the Herpes Simplex Virus-Specific CD8 + T Cell Repertoire in C57BL/6 Mice . *J Immunol* [Internet]. 2011 Apr 1;186(7):3927–33. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1003735>
117. Bonneau RH, Salvucci LA, Johnson DC, Tevethia SS. Epitope Specificity of H-2Kb-Restricted, HSV-1-, and HSV-2-Cross-Reactive Cytotoxic T Lymphocyte Clones. *Virology* [Internet]. 1993 Jul 1;195(1):62–70. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1003735>
118. Turner SJ, Jameson SC CF. Functional mapping of the orientation for TCR recognition of an H2-Kb-restricted ovalbumin peptide suggests that the beta-chain subunit can dominate the determination of peptide side chain specificity. *J Immunol*.
119. Wallace ME, Keating R, Heath WR, Carbone FR. The Cytotoxic T-Cell Response to Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of C57BL/6 Mice Is Almost Entirely Directed against a Single Immunodominant Determinant. *J Virol*. 1999;73(9):7619–26.
120. Gierynska M, Kumaraguru U, Eo S-K, Lee S, Krieg A, Rouse BT. Induction of CD8 T-Cell-Specific Systemic and Mucosal Immunity against Herpes Simplex Virus with CpG-Peptide Complexes. *J Virol*. 2002;76(13):6568–76.
121. Mueller SN, Jones CM, Smith CM, Heath WR, Carbone FR. Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J Exp Med*. 2002;195(5):651–6.
122. Toka FN, Gieryńska M, Suvas S, Schoenberger SP, Rouse BT. Rescue of memory CD8 + T cell reactivity in peptide/TLR9 ligand immunization by codelivery of cytokines or CD40 ligation. *Virology*. 2005;331(1):151–8.

123. Toka FN, Rouse BT. Mucosal application of plasmid-encoded IL-15 sustains a highly protective anti-Herpes simplex virus immunity. *J Leukoc Biol.* 2005;78(1):178–86.
124. Rodrigues L, Nandakumar S, Bonorino C, Rouse BT, Kumaraguru U. IL-21 and IL-15 cytokine DNA augments HSV specific effector and memory CD8+ T cell response. *Mol Immunol.* 2009;46(7):1494–504.
125. St. Leger AJ, Peters B, Sidney J, Sette A, Hendricks RL. Defining the Herpes Simplex Virus-Specific CD8 + T Cell Repertoire in C57BL/6 Mice. *J Immunol [Internet].* 2011 Apr 1;186(7):3927–33. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1003735>
126. Sheridan BS, Cherpes TL, Urban J, Kalinski P, Hendricks RL. Reevaluating the CD8 T-Cell Response to Herpes Simplex Virus Type 1: Involvement of CD8 T Cells Reactive to Subdominant Epitopes. *J Virol.* 2009;83(5):2237–45.
127. St. Leger AJ, Peters B, Sidney J, Sette A, Hendricks RL. Defining the Herpes Simplex Virus-Specific CD8+ T Cell Repertoire in C57BL/6 Mice. *J Immunol [Internet].* 2011 Apr 1;186(7):3927–33. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/186/7/3927/85159/Defining-the-Herpes-Simplex-Virus-Specific-CD8-T>
128. Rajasagi NK, Rouse BT. IL-2 complex treatment amplifies CD8+ T cell mediated immunity following herpes simplex virus-1 infection. *Microbes Infect [Internet].* 2016 Dec;18(12):735–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457916301691>
129. Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8+ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4+ T-cell help. *Nature [Internet].* 2009 Nov 8;462(7272):510–3. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature08511>
130. Abul K. Abbas, Lichtman, MD SP. *Cellular and Molecular Immunology.* 2020. 552 p.
131. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature [Internet].* 1999 Oct;401(6754):708–12. Available from: www.nature.com
132. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential Localization of Effector Memory Cells in Nonlymphoid Tissue. *Science (80-) [Internet].* 2001 Mar 23;291(5512):2413–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1058867>
133. Masopust D, Choo D, Vezys V, Wherry EJ, Duraiswamy J, Akondy R, et al. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med.* 2010;207(3):553–64.
134. Lo CG, Xu Y, Proia RL, Cyster JG. Cyclical modulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 surface expression during lymphocyte recirculation and relationship to lymphoid organ transit. *J Exp Med.* 2005;201(2):291–301.
135. Grayson JM, Murali-Krishna K, Altman JD, Ahmed R. Gene Expression in Antigen-Specific CD8+ T Cells During Viral Infection. *J Immunol.* 2001;166(2):795–9.
136. Cyster JG, Schwab SR. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:69–94.
137. Casey KA, Fraser KA, Schenkel JM, Moran A, Abt MC, Beura LK, et al.

- Antigen-Independent Differentiation and Maintenance of Effector-like Resident Memory T Cells in Tissues. *J Immunol* [Internet]. 2012 May 15;188(10):4866–75. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/188/10/4866/85537/Antigen-Independent-Differentiation-and>
138. Tan JT, Surh CD. T cell memory. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;311:85–115.
 139. Content R. Cutting Edge : Gut Microenvironment Promotes. 2009;
 140. Campbell DJ, Butcher EC. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4+ T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med*. 2002;195(1):135–41.
 141. Justin I. Odegaard, Chawla A. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
 142. MacKay LK, Rahimpour A, Ma JZ, Collins N, Stock AT, Hafon ML, et al. The developmental pathway for CD103+ CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nat Immunol*. 2013;14(12):1294–301.
 143. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity* [Internet]. 2014 Dec;41(6):886–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476131400449X>
 144. Koyama S, Podolsky DK. Rapid Publication Differential Expression of Transforming Growth Factors α and β in Rat Intestinal Epithelial Cells. 1989;83(May):1768–73.
 145. Weisberg SP, Carpenter DJ, Chait M, Dogra P, Robyn D, Chen AX, et al. in the Human Pancreas through the PD-1 / PD-L1 Pathway. 2020;29(12):3916–32.
 146. Kumar B V., Ma W, Miron M, Granot T, Guyer RS, Carpenter DJ, et al. Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell Rep* [Internet]. 2017;20(12):2921–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.078>
 147. Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: Local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(2):79–89.
 148. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações [Internet]. 2024. Available from: [https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/tecnologia/tecnologias_convergentes/paginas/nanotecnologia/NANOTECONOLOGIA.html#:~:text=Nanotecnologia é um campo científico,a 1 bilionésimo do metro\).](https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/tecnologia/tecnologias_convergentes/paginas/nanotecnologia/NANOTECONOLOGIA.html#:~:text=Nanotecnologia%20%C3%A9%20um%20campo%20cient%C3%ADfico,a%201%20bilion%C3%A9simo%20do%20metro).)
 149. Eberhard WG, Wcislo WT. Plenty of room at the bottom? *Am Sci*. 2012;100(3):226–33.
 150. Gidal BE, Decerze J, Bockbrader HN, Gonzalez J, Kruger S, Pitterle ME, et al. Gabapentin bioavailability : effect of dose and frequency of administration in adult patients with epilepsy. 1998;31:91–9.
 151. Brunswick N. Solid Dispersion of Poorly Water-Soluble Drugs : Early Promises , Subsequent Problems , and Recent Breakthroughs. 1999;88(10).
 152. Vasir JK, Labhasetwar V. Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2005 Aug 24;4(4):363–74. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/153303460500400405>
 153. Feng S-S, Mu L, Win K, Huang G. Nanoparticles of Biodegradable

- Polymers for Clinical Administration of Paclitaxel. *Curr Med Chem* [Internet]. 2004 Feb 1;11(4):413–24. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=11&issue=4&spage=413>
154. de Kozak Y, Andrieux K, Villarroya H, Klein C, Thillaye-Goldenberg B, Naud M-C, et al. Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol* [Internet]. 2004 Dec;34(12):3702–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.200425022>
 155. Thomas M, Klibanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2003 Aug 5;100(16):9138–43. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1233634100>
 156. Amirnasr M, Fallah tafti T, Sankian M, Rezaei A, Tafaghodi M. Immunization against HTLV-I with chitosan and tri-methylchitosan nanoparticles loaded with recombinant env23 and env13 antigens of envelope protein gp46. *Microb Pathog*. 2016;97:38–44.
 157. Kabiri M, Sankian M, Sadri K, Tafaghodi M. Robust mucosal and systemic responses against HTLV-1 by delivery of multi-epitope vaccine in PLGA nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;
 158. Sultankulov B, Berillo D, Kauanova S, Mikhalovsky S. Composite Cryogel with Polyelectrolyte Complexes for Growth Factor Delivery. :1–15.
 159. Saparov A. No Title.
 160. Jimi S, Jaguparov A, Nurkesh A, Sultankulov B. Sequential Delivery of Cryogel Released Growth Factors and Cytokines Accelerates Wound Healing and Improves Tissue Regeneration. 2020;8(April):1–14.
 161. Nurkesh A, Jaguparov A, Jimi S, Saparov A, Francesco F De, Giordano A. Recent Advances in the Controlled Release of Growth Factors and Cytokines for Improving Cutaneous Wound Healing. 2020;8(July):1–7.
 162. Smagul S, Kim Y, Smagulova A, Raziyeveva K, Nurkesh A, Saparov A. Biomaterials Loaded with Growth Factors / Cytokines and Stem Cells for Cardiac Tissue Regeneration. 2020;
 163. Article R. *Pharmaceutical Sciences*. 1961;(March).
 164. Teorell T. Kinetics of distribution of substances administered to the body, II : The intravascular modes of administration. *Arch Int Pharmacodyn Ther* [Internet]. 57th ed. 1937;226–40. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:53883583>
 165. Chien S, Rogge MC, Gisclon LEEG, Curtin C, Wong F, Natarajan J, et al. Pharmacokinetic Profile of Levofloxacin following Once-Daily 500-Milligram Oral or Intravenous Doses. 1997;41(10):2256–60.
 166. Kubitza D, Becka M, Voith B, Zuehlsdorf M, Wensing G. PHARMACODYNAMICS AND DRUG ACTION Safety , pharmacodynamics , and pharmacokinetics of single doses of BAY 59-7939 , an oral , direct factor Xa inhibitor. 2005;412–21.
 167. Park K. NIH Public Access. 2015;3–8.
 168. Adir O, Poley M, Chen G. Europe PMC Funders Group Integrating Artificial Intelligence and Nanotechnology for Precision Cancer Medicine. 2021;32(13):1–28.
 169. Cheng H, Yang N, Lu Q, Zhang Z, Zhang H. Syntheses and Properties of Metal Nanomaterials with Novel Crystal Phases. *Adv Mater*.

- 2018;30(26):1–23.
170. Pathak C, Vaidya FU, Pandey SM. Mechanism for Development of Nanobased Drug Delivery System. In: Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems [Internet]. Elsevier; 2019. p. 35–67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012814029100003X>
 171. Aleksandra Zielińska 1 2, , Filipa Carreiró 1, Ana M. Oliveira 1, Andreia Neves 1 BP 1, 3 DNV, 4 AD, , Massimo Lucarini 4 PE 5, Amélia M. Silva 6 7, et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*. 2020;25:3731.
 172. Hanke T, Graham FL, Rosenthal KL. (1991,Hanke)Identification of an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte recognition site gB of herpes simplex virus by using recombinant adenovirus vectors . 1991;65(3):1177–86.
 173. Çuburu N, Kim R, Guittard GC, Thompson CD, Day PM, Hamm DE, et al. A Prime-Pull-Amplify Vaccination Strategy To Maximize Induction of Circulating and Genital-Resident Intraepithelial CD8 + Memory T Cells . *J Immunol*. 2019;202(4):1250–64.
 174. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas L de L, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova* [Internet]. 2003 Oct;26(5):726–37. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000500017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 175. Parmar K, Patel J, Pathak Y. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Pharmacokinet Pharmacodyn Nanoparticulate Drug Deliv Syst*. 2022;5(4):261–72.
 176. Das KP, Chandra J. Nanoparticles and convergence of artificial intelligence for targeted drug delivery for cancer therapy: Current progress and challenges. *Front Med Technol*. 2022;4(January):1–14.
 177. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2010 Jan;75(1):1–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776509004111>
 178. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010;35(10):1217–56.
 179. Langer R, Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*. 1976;263(5580):797–800.
 180. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. 2003;90:261–80.
 181. Sharifabad ME, Mercer T, Sen T. The fabrication and characterization of stable core-shell superparamagnetic nanocomposites for potential application in drug delivery. *J Appl Phys*. 2015;117(17):9–10.
 182. Kimura H, Ogura Y. Biodegradable Polymers for the. *Source Sci New Ser*. 2002;297(5582):803–7.
 183. Gavasane AJ. Synthetic Biodegradable Polymers Used in Controlled Drug Delivery System: An Overview. *Clin Pharmacol Biopharm*. 2014;3(2).
 184. Abraham S, Amitai VCH G, McLean Grogan BW, Collins Marcel J.

- Calcium Channel Modulators in Heart and Smooth Muscle. Basic Mechanisms and Pharmacological Aspects. Edited by. 1990;54:1990.
185. Pohlmann AR, Fonseca FN, Paese K, Detoni CB, Coradini K, Beck RC, et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(5):623–38.
 186. Sousa-Batista AJ, Poletto FS, Philipon CIMS, Guterres SS, Pohlmann AR, Rossi-Bergmann B. Lipid-core nanocapsules increase the oral efficacy of quercetin in cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 2017;144(13):1769–74.
 187. Shahba AAW, Mohsin K, Alanazi FK, Abdel-Rahman SI. Optimization of self-nanoemulsifying formulations for weakly basic lipophilic drugs: Role of acidification and experimental design. *Brazilian J Pharm Sci*. 2016;52(4):653–68.
 188. Parhi R, Suresh P. Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles-A Review. *Curr Drug Discov Technol*. 2012;9(1):2–16.
 189. Cé R, Marchi JG, Bergamo VZ, Fuentefria AM, Lavayen V, Guterres SS, et al. Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* spp. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2016;511:153–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.086>
 190. Jafari, Seid Mahdi McClements DJ. *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. 2018. 642 p.
 191. Walia N, Zhang S, Wismer W, Chen L. A low energy approach to develop nanoemulsion by combining pea protein and Tween 80 and its application for vitamin D delivery. *Food Hydrocoll Heal* [Internet]. 2022;2(June):100078. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100078>
 192. Hasani F, Pezeshki A, Hamishehkar H. Effect of surfactant and oil type on size droplets of betacarotene bearing nanoemulsions. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2015;4(9):146–55.
 193. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;
 194. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Publ Gr*. 2012;12(April).
 195. Plotkin SA. Correlates of Vaccine-Induced Immunity. 2008;18902.
 196. Smolen JS, Aletaha D, Mcinnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* [Internet]. 2023;388(10055):2023–38. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
 197. Belgi A, Hossain MA, Tregear GW, Wade JD. *The Chemical Synthesis of Insulin : From the Past to the Present*. 2011;40–7.
 198. Ottenhausen M, Bodhinayake I, Banu MA, Stieg PE, Schwartz TH. Vincent du Vigneaud: following the sulfur trail to the discovery of the hormones of the posterior pituitary gland at Cornell Medical College. 2015;1–5.
 199. Lau JL, Dunn MK. Bioorganic & Medicinal Chemistry Therapeutic peptides : Historical perspectives , current development trends , and future directions. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2018;26(10):2700–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
 200. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. Synthetic

- therapeutic peptides : science and market. 2010;15(January).
201. Liu M, Fang X, Yang Y, Wang C. Peptide-Enabled Targeted Delivery Systems for Therapeutic Applications. 2021;9(July):1–15.
 202. Berillo D, Yeskendir A, Zharkinbekov Z, Raziyeva K, Saparov A. Peptide-Based Drug Delivery Systems. 2021;
 203. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Neurobiology of Disease Structure and function of the blood – brain barrier. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2010;37(1):13–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
 204. Ilangala AB, Lechanteur A, Fillet M. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Therapeutic peptides for chemotherapy : Trends and challenges for advanced delivery systems. 2021;167(June):140–58.
 205. Hao D, Lopez J, Chen J, Iavorovschi AM, Lelivelt NM, Wang A. Engineering Extracellular Microenvironment for Tissue Regeneration. 2022;1–17.
 206. Al Musaimi O, Lombardi L, Williams DR, Albericio F. Strategies for Improving Peptide Stability and Delivery. *Pharmaceutics*. 2022;15(10).
 207. Rastogi S, Shukla S, Kalaivani M, Singh GN. Peptide-based therapeutics : quality specifications , regulatory considerations , and prospects. 2019;24(1).
 208. Chiangjong W, Chutipongtanate S, Hongeng S. Anticancer peptide : Physicochemical property , functional aspect and trend in clinical application (Review). 2020;678–96.
 209. Rezaei N, Mehrnejad F, Vaezi Z, Sedghi M, Asghari SM. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Encapsulation of an endostatin peptide in liposomes : Stability , release , and cytotoxicity study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2020;185(May 2019):110552. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110552>
 210. Shi K, Li J, Cao Z, Yang P, Qiu Y, Yang B, et al. A pH-responsive cell-penetrating peptide-modified liposomes with active recognizing of integrin $\alpha v \beta 3$ for the treatment of melanoma. *J Control Release* [Internet]. 2015;217:138–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.009>
 211. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, et al. Renal clearance of quantum dots. 2007;25(10):1165–70.
 212. Bachran C, Leppla SH. Tumor Targeting and Drug Delivery by Anthrax Toxin. 2016;1–16.
 213. Date AA, Hanes J, Ensign LM. Nanoparticles for oral delivery : Design , evaluation and state-of-the-art. *J Control Release* [Internet]. 2016;240:504–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.016>
 214. Venkataraman S, Hedrick JL, Yuin Z, Yang C, Lai P, Ee R, et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery ☆. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2011;63(14–15):1228–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.06.016>
 215. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems : From concept to clinical applications ☆. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2013;65(1):36–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
 216. Plaza-Oliver M, Santander-Ortega MJ, Lozano MV. Current approaches

- in lipid-based nanocarriers for oral drug delivery. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 2021;11(2):471–97. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00908-7>
217. Patel, A; Patel, M; Yang, X; Mitra A. Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. *Protein Pept Lett*. 2014;21(11).
 218. Kim MR, Feng T, Zhang Q, Chan HYE, Chau Y. Co-encapsulation and co-delivery of peptide drugs via polymeric nanoparticles. *Polymers (Basel)*. 2019;11(2):1–15.
 219. Mcclements DJ. Encapsulation , protection , and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems : A review. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2018;253:1–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.02.002>
 220. Chan Z, Chen Z, Zhang A, Hu J, Wang X, Yang Z. Electrospun nanofibers for cancer diagnosis and therapy. *Biomater Sci*. 2016;4(6):922–32.
 221. Article R. Review article. 2018;1360–74.
 222. Hiwrale A, Bharati S, Pingale P, Rajput A. Heliyon Nanofibers : A current era in drug delivery system. *Heliyon* [Internet]. 2023;9(9):e18917. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18917>
 223. de Oliveira JVR, Silveira PL, Spingolon G, Alves GAL, Peña FP, Aguirre TAS. Polymeric nanoparticles containing babassu oil: A proposed drug delivery system for controlled release of hydrophilic compounds. *Chem Phys Lipids*. 2023;253(February).
 224. Reis MYFA, Santos SM, Silva DR, Silva M V, Correia MTS, Navarro DMAF, et al. Anti-Inflammatory Activity of Babassu Oil and Development of a Microemulsion System for Topical Delivery. 2017;2017.
 225. Rodrigues E da CR, Ferreira AM, Vilhena JCE, de Almeida FB, Cruz RAS, Rodríguez Amado JR, et al. Development of babassu oil based nanoemulsions. *Lat Am J Pharm*. 2015;34(2):338–43.
 226. 1980ICI_Surfactants_-_The_HLB_system_-_A_time_saving_guide_to_emulsifier_selection.pdf.
 227. Federal U, Federal U, Federal U, Federal U. Create PDF with GO2PDF for free , if you wish to remove this line , click here to buy Virtual PDF Printer. :3–7.
 228. Reis MYFA, Santos SM dos, Silva DR, Silva M V., Correia MTS, Navarro DMAF, et al. Anti-Inflammatory Activity of Babassu Oil and Development of a Microemulsion System for Topical Delivery. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2017;2017:1–14. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/3647801/>
 229. Rodrigues JS, Malveira JQ, Filho JASR, Albuquerque G. Avaliação físico-química dos óleos de babaçu (*Orbignya speciosa*) e coco (*Cocos nucifera*) com elevado índice de acidez e dos ácidos graxos (C6 a C16). 2017;13:1–8.
 230. Souza MHSL, Monteiro CA, Figueredo PMS, Nascimento FRF, Guerra RNM. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011 Jan;133(1):1–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037887411000629X>
 231. Araújo FR, González-Pérez SE, Lopes MA, Viégas I de JM. Ethnobotany of babassu palm (*Attalea speciosa* Mart.) in the Tucuruí Lake Protected

- Areas Mosaic - eastern Amazon. *Acta Bot Brasilica* [Internet]. 2016 Apr 1;30(2):193–204. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062016000200193&lng=en&tlng=en
232. Almeida Campos JL, da Silva TLL, Albuquerque UP, Peroni N, Lima Araújo E. Knowledge, Use, and Management of the Babassu Palm (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) in the Araripe Region (Northeastern Brazil). *Econ Bot* [Internet]. 2015 Sep 20;69(3):240–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12231-015-9315-x>
 233. Bieski IGC, Leonti M, Arnason JT, Ferrier J, Rapinski M, Violante IMP, et al. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015 Sep;173:383–423. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.025>
 234. da Silva BP, Parente JP. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia* [Internet]. 2001;72(8):887–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731113>
 235. Oliveira NM De, Xavier M, Filho P, Lopes WS, Valor CG De. CADEIA PRODUTIVA DO BABAÇU EM CIDELÂNDIA-MA : UMA ANÁLISE A PARTIR DA ABORDAGEM DE CADEIA GLOBAL DE VALOR BABAÇU PRODUCTION CHAIN OF BABAÇU IN CIDELÂNDIA – MA , BRAZIL : AN ANALYSIS FROM THE APPROACH OF THE GLOBAL. 2019;13–23.
 236. IBGE. Senhoras das palmeiras. 15. 2019;1–28.
 237. Tradicionais C. Comunidades Tradicionais Reflexões e aprendizados.
 238. Santos DS, Da Silva IG, Araújo BQ, Júnior CAL, Monção NBN, Citó AMDGL, et al. Extraction and evaluation of fatty acid composition of *orbignya phalerata* martius oils (Arecaceae) from Maranhão state, Brazil. *J Braz Chem Soc*. 2013;24(2):355–62.
 239. Rodrigues ECR, Ferreira AM, Vilhena JCE, Almeida FB De, Cruz RAS, Amado JRR. Development of Babassu Oil Based Nanoemulsions. 2015;34(2):338–43.
 240. Physical and Chemical Characteristics of Oils , Fats , and Waxes Third Edition David Firestone , Editor.
 241. Costa C da L, França ET de R, Santos DS, Costa MCP, Barbosa M do CL, Nascimento M do DSB. Caracterização físico-química de óleos fixos artesanais do coco Babaçu (*Orbignya phalerata*) de regiões ecológicas do Estado do Maranhão, Brasil. *Pesqui em Foco*. 2015;20(1):27–38.
 242. de Sousa V, Crean, Borges, Tajber, Boylan F, Rodrigues C, et al. Nanostructured systems containing babassu (*Orbignya speciosa*) oil as a potential alternative therapy for benign prostatic hyperplasia. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2013 Aug;8:3129. Available from: <http://www.dovepress.com/nanostructured-systems-containing-babassu-orbignya-speciosa-oil-as-a-p-peer-reviewed-article-IJN>
 243. Intahphuak S, Khonsung P, Panthong A. Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of virgin coconut oil. *Pharm Biol* [Internet]. 2010 Feb;48(2):151–7. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880200903062614>
 244. Yu M, Wang J, Yang Y, Zhu C, Su Q, Guo S, et al. Rotation-Facilitated Rapid Transport of Nanorods in Mucosal Tissues. *Nano Lett*.

- 2016;16(11):7176–82.
245. Nanotechnologies D. Carrier-Based Drug Delivery. :2–23.
 246. Yoo J, Park C, Yi G, Lee D, Koo H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. 2019;
 247. Ogay V, Mun EA, Kudaibergen G, Baidarbekov M. Progress and Prospects of Polymer-Based Drug Delivery Systems for Bone Tissue Regeneration. 2020;1–25.
 248. Dünnhaupt S, Kammona O, Waldner C, Kiparissides C, Bernkop-Schnürch A. Nano-carrier systems: Strategies to overcome the mucus gel barrier. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;96:447–53.
 249. Lai SK, Wang YY, Wirtz D, Hanes J. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev [Internet].* 2009;61(2):86–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.012>
 250. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: A review. *J Control Release [Internet].* 2014;190:500–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.033>
 251. Mastorakos P, Zhang C, Song E, Kim YE, Park HW, Berry S, et al. Biodegradable brain-penetrating DNA nanocomplexes and their use to treat malignant brain tumors. *J Control Release [Internet].* 2017;262(June):37–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.009>
 252. Osman G, Rodriguez J, Chan SY, Chisholm J, Duncan G, Kim N, et al. PEGylated enhanced cell penetrating peptide nanoparticles for lung gene therapy. *J Control Release.* 2018;285(July):35–45.
 253. Yu M, Xu L, Tian F, Su Q, Zheng N, Yang Y, et al. Rapid transport of deformation-tuned nanoparticles across biological hydrogels and cellular barriers. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–11.
 254. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:275–300.
 255. Machado D, Castro J, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J, Cerca N. Bacterial vaginosis biofilms: Challenges to current therapies and emerging solutions. *Front Microbiol.* 2016;6(JAN).
 256. Neves J das, Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Rodrigues F, Sarmiento B. Vaginal Mucosa and Drug Delivery. *Mucoadhesive Mater Drug Deliv Syst.* 2014;9781119941:99–132.
 257. das Neves J, Nunes R, Machado A, Sarmiento B. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev [Internet].* 2015;92:53–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.12.004>
 258. Liu M, Zhang J, Shan W, Huang Y. Developments of mucus penetrating nanoparticles. *Asian J Pharm Sci [Internet].* 2014;10(4):275–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.12.007>
 259. Shiraki K. Antiviral drugs against alphaherpesvirus. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1045:103–22.
 260. Rabelo VWH, Romeiro NC, Paixão ICN de P, Abreu PA. Mechanism of resistance to acyclovir in thymidine kinase mutants from Herpes simplex virus type 1: a computational approach. *J Biomol Struct Dyn [Internet].* 2020;38(7):2116–27. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1625443>

261. Mehmood A, Kaushik AC, Wei D. Prediction and validation of potent peptides against herpes simplex virus type 1 via immunoinformatic and systems biology approach. *Chem Biol Drug Des* [Internet]. 2019 Nov 12;94(5):1868–83. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbdd.13602>
262. Koelle DM, Dong L, Jing L, Laing KJ, Zhu J, Jin L, et al. HSV-2-Specific Human Female Reproductive Tract Tissue Resident Memory T Cells Recognize Diverse HSV Antigens. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Mar 31;13(March):1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.867962/full>
263. Antoine TE, Mishra YK, Trigilio J, Tiwari V, Adelung R, Shukla D. Prophylactic, therapeutic and neutralizing effects of zinc oxide tetrapod structures against herpes simplex virus type-2 infection. *Antiviral Res* [Internet]. 2012 Dec;96(3):363–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354212002276>
264. Jaishankar D, Shukla D. Genital herpes: Insights into sexually transmitted infectious disease. *Microb Cell*. 2016;3(9):438–50.
265. Ensign LM, Tang BC, Wang Y-Y, Tse TA, Hoen T, Cone R, et al. Mucus-Penetrating Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery Protect Against Herpes Simplex Virus. *Sci Transl Med* [Internet]. 2012 Jun 13;4(138):1–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3003453>
266. Orłowski P, Tomaszewska E, Gniadek M, Baska P, Nowakowska J, Sokolowska J, et al. Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection. *PLoS One*. 2014;9(8):1–15.
267. Orłowski P, Kowalczyk A, Tomaszewska E, Ranoszek-Soliwoda K, Węgrzyn A, Grzesiak J, et al. Antiviral activity of tannic acid modified silver nanoparticles: Potential to activate immune response in herpes genitalis. *Viruses*. 2018;10(10):1–15.
268. Steinbach JM, Weller CE, Booth CJ, Saltzman WM. Polymer nanoparticles encapsulating siRNA for treatment of HSV-2 genital infection. *J Control Release* [Internet]. 2012 Aug;162(1):102–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365912005019>
269. Kim MS, Dao-Tran A, Davidowitz E, Tseng T, Gilsanz V, Ryabets-Lienhard A, et al. Carotid Intima-Media Thickness Is Associated with Increased Androgens in Adolescents and Young Adults with Classical Congenital Adrenal Hyperplasia. *Horm Res Paediatr* [Internet]. 2016;85(4):242–9. Available from: <https://karger.com/doi/10.1159/000444169>
270. Vitali D, Bagri P, Wessels JM, Arora M, Ganugula R, Parikh A, et al. Curcumin can decrease tissue inflammation and the severity of HSV-2 infection in the female reproductive mucosa. *Int J Mol Sci*. 2020;21(1).
271. Srikrishna S, Cardozo L. The vagina as a route for drug delivery: A review. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2013;24(4):537–43.
272. Nii T. 38. Honary, S.; Zahir, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems. *Molecules*. 2021;26(22):1–45.
273. Ian W. Hamley - *The Physics of Block Copolymers* -Oxford University Press, USA (1999). 1999.
274. Addad JPC. *Physical Properties of Polymeric Gels*. 1996. 328 p.

275. DiBiase MD, Rhodes CT. Formulation and evaluation of epidermal growth factor in Pluronic F-127 gel. *Drug Dev Ind Pharm*. 1996;22(8):823–31.
276. Gilbert JC, Hadgraft J, Bye A, Brookes LG. Drug release from Pluronic F-127 gels. *Int J Pharm*. 1986;32(2–3):223–8.
277. Takeshi N. NII-Electronic Library Service. *Chem Pharm Bull* [Internet]. 1977;57(534):364–70. Available from: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>
278. Kim SY, Ha JC, Lee YM. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres: II. Thermo- responsive drug release behaviors. *J Control Release*. 2000;65(3):345–58.
279. Pires IS, Hammond PT, Irvine DJ. Engineering Strategies for Immunomodulatory Cytokine Therapies: Challenges and Clinical Progress. *Adv Ther*. 2021;4(8):1–29.
280. Padilla M, Clark GT, Merrill RL. Topical medications for orofacial neuropathic pain: A review. *J Am Dent Assoc* [Internet]. 2000;131(2):184–95. Available from: <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0146>
281. Chonkar A, Nayak U, Udupa N. Smart polymers in nasal drug delivery. *Indian J Pharm Sci*. 2015;77(4):367–75.
282. Carvalho GC, Araujo VHS, Fonseca-Santos B, de Araújo JTC, de Souza MPC, Duarte JL, et al. Highlights in poloxamer-based drug delivery systems as strategy at local application for vaginal infections. *Int J Pharm*. 2021;602(April).
283. MIYAZAKI S, YOKOUCHI C, NAKAMURA T, HASHIGUCHI N, HOU W-M, TAKADA M. Pluronic F-127 gels as a novel vehicle for rectal administration of indomethacin. *Chem Pharm Bull* [Internet]. 1986;34(4):1801–8. Available from: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>
284. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci*. 2006;9(3):339–58.
285. Majithiya RJ, Ghosh PK, Umrethia ML, Murthy RSR. Thermoreversible-mucoadhesive gel for nasal delivery of sumatriptan. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(3).
286. Santos MS, Tavares FW, Biscaia EC. Molecular thermodynamics of micellization: Micelle size distributions and geometry transitions. *Brazilian J Chem Eng*. 2016;33(3):515–23.
287. Lu H, Zhao X, Tian W, Wang Q, Shi J. Pluronic F127-folic acid encapsulated nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics for targeted cellular imaging. *RSC Adv*. 2014;4(35):18460–6.
288. Sokolsky-Papkov M, Kabanov A. Synthesis of well-defined gold nanoparticles using Pluronic: The role of radicals and surfactants in nanoparticles formation. *Polymers (Basel)*. 2019;11(10).
289. Abuelsamen A, Mahmud S, Mohd Kaus NH, Farhat OF, Mohammad SM, Al-Suede FSR, et al. Novel Pluronic F-127-coated ZnO nanoparticles: Synthesis, characterization, and their in-vitro cytotoxicity evaluation.

- Polym Adv Technol. 2021;32(6):2541–51.
290. Dintcheva NT, Catalano G, Arrigo R, Morici E, Cavallaro G, Lazzara G, et al. Pluronic nanoparticles as anti-oxidant carriers for polymers. *Polym Degrad Stab* [Internet]. 2016;134:194–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.10.008>
 291. Hosseinzadeh H, Atyabi F, Dinarvand R, Ostad SN. Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: Preparation and in vitro study. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1851–63.
 292. Sakai T, Alexandridis P. Single-step synthesis and stabilization of metal nanoparticles in aqueous pluronic block copolymer solutions at ambient temperature. *Langmuir*. 2004;20(20):8426–30.
 293. Gomes DSB, Paterno LG, Santos ABS, Barbosa DPP, Holtz BM, Souza MR, et al. UV-Accelerated Synthesis of Gold Nanoparticle–Pluronic Nanocomposites for X-ray Computed Tomography Contrast Enhancement. *Polymers (Basel)*. 2023;15(9).
 294. Braga TL, Conrado PCV, Silva LGZ, Bergmann EV, da Silva ACP, de Souza Bonfim de Mendonça P, et al. Pluronic® P-123 as a reductant and stabilizing agent for gold nanoparticles (AuNPs) combined with methylene blue for photodynamic and photothermal therapy. *J Mol Liq* [Internet]. 2023;383(December 2022):122111. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122111>
 295. Zhou Y, Zhang XL, Lu ST, Zhang NY, Zhang HJ, Zhang J, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):1–17.
 296. Yang F, Li L, Li Z, Cai Z, He Y, Ke C, et al. Pluronic F-127 Hydrogel Loaded with Human Adipose-Derived Stem Cell-Derived Exosomes Improve Fat Graft Survival via HIF-1 α -Mediated Enhancement of Angiogenesis. *Int J Nanomedicine*. 2023;18(November):6781–96.
 297. Diniz IMA, Chen C, Xu X, Ansari S, Zadeh HH, Marques MM, et al. Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(3):1–10.
 298. Yang R, Chen F, Guo J, Zhou D, Luan S. Recent advances in polymeric biomaterials-based gene delivery for cartilage repair. *Bioact Mater* [Internet]. 2020;5(4):990–1003. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.06.004>
 299. Shoman NA, Gebreel RM, El-Nabarawi MA, Attia A. Optimization of hyaluronan-enriched cubosomes for bromfenac delivery enhancing corneal permeation: characterization, ex vivo, and in vivo evaluation. *Drug Deliv* [Internet]. 2023 Dec 31;30(1):2162162. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2162162>
 300. Sreeharsha N, Prasanthi S, Mahalakshmi SVVNS, Goudanavar PS, Naveen NR, Gowthami B, et al. Enhancement of Anti-Tumoral Properties of Paclitaxel Nano-Crystals by Conjugation of Folic Acid to Pluronic F127: Formulation Optimization, In Vitro and In Vivo Study. *Molecules* [Internet]. 2022 Nov 16;27(22):7914. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/22/7914>
 301. Ensign LM, Lai SK, Wang YY, Yang M, Mert O, Hanes J, et al. Pretreatment of human cervicovaginal mucus with pluronic F127

- enhances nanoparticle penetration without compromising mucus barrier properties to herpes simplex virus. *Biomacromolecules*. 2014;15(12):4403–9.
302. Coty JB, Vauthier C. Characterization of nanomedicines: A reflection on a field under construction needed for clinical translation success. *J Control Release* [Internet]. 2018;275:254–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.013>
 303. Jehangir M. Nano 2020 : Development and validation of HPLC method-a review - Muhammad Jehangir - Senior Manager Quality Control and Validations Novamed Group. 2020;4(4):2020.
 304. Dagron S. Die International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *Handbuch Ethik und Recht der Forschung am Menschen* 2014 p. 541–5.
 305. A HPLC–ICP-MS/MS method for size-dependent cellular uptake and toxicity studies of gold nanoparticles in both hollow and solid morphologies.
 306. Zhang X, Zhang H, Wu Z, Wang Z, Niu H, Li C. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68(3):526–34.
 307. Hanafy NAN, Leporatti S, El-Kemary MA. Mucoadhesive hydrogel nanoparticles as smart biomedical drug delivery system. *Appl Sci*. 2019;9(5).
 308. Shin BK, Baek EJ, Choi SG, Davaa E, Nho YC, Lim YM, et al. Preparation and irradiation of Pluronic F127-based thermoreversible and mucoadhesive hydrogel for local delivery of naproxen. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39(12):1874–80.
 309. Şenyiğit ZA, Karavana SY, Eraç B, Gürsel Ö, Limoncu MH, Baloğlu E. Evaluation of chitosan based vaginal bioadhesive gel formulations for antifungal drugs. *Acta Pharm*. 2014;64(2):139–56.
 310. Masuda S, Deguchi S, Ogata F, Yoshitomi J, Otake H, Kanai K, et al. Nasal Absorption Enhancement of Mometasone Furoate Nanocrystal Dispersions. *Int J Nanomedicine*. 2023;18(October):5685–99.
 311. Justus B, Kanunfre CC, Budel JM, de Faria MF, Raman V, de Paula JP, et al. New insights into the mechanisms of French lavender essential oil on non-small-cell lung cancer cell growth. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2019 Sep;136(April):28–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.051>
 312. Furman C, Carpentier R, Barczyk A, Chavatte P, Betbeder D, Lipka E. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the quantification of paclitaxel in different PLGA nanocarriers. *Electrophoresis*. 2017;38(19):2536–41.
 313. Lopes CE, Langoski G, Klein T, Ferrari PC, Farago PV. A simple hplc method for the determination of halcinonide in lipid nanoparticles: Development, validation, encapsulation efficiency, and in vitro drug permeation. *Brazilian J Pharm Sci*. 2017;53(2).
 314. Sutariya V, Wehrung D, Geldenhuys WJ. Development and Validation of a Novel RP-HPLC Method for the Analysis.pdf. 2012;271–6.
 315. de Oliveira JVR, Silveira PL, Spingolon G, Alves GAL, Peña FP, Aguirre TAS. Polymeric nanoparticles containing babassu oil: A proposed drug delivery system for controlled release of hydrophilic compounds. *Chem*

- Phys Lipids [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2023 May 14];253:105304. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308423000269>
316. Neves J, Arau F, Andrade F, Michiels J, Arie KK, Vanham G, et al. In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Polymeric Nanoparticles for Vaginal and Rectal Delivery of the Anti-HIV Drug Dapivirine. 2013;
 317. Gomes MLS, da Silva Nascimento N, Borsato DM, Pretes AP, Nadal JM, Novatski A, et al. Long-lasting anti-platelet activity of cilostazol from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) blend nanocapsules. Mater Sci Eng C [Internet]. 2019;94(February 2018):694–702. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.029>
 318. Neves J, Rocha CMR, Pilar M, Carrier RL, Amiji M, Bahia MF, et al. Interactions of Microbicide Nanoparticles with a Simulated Vaginal Fluid. 2012;
 319. Fontana MC. Nanopartículas Contendo Propionato De Clobetasol : Preparação , Caracterização. 2010;
 320. Bruinsmann FA, Buss JH, Souto GD, Schultze E, de Cristo Soares Alves A, Seixas FK, et al. Erlotinib-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Improve In Vitro Cytotoxicity and Anticlonogenic Effects on Human A549 Lung Cancer Cells. AAPS PharmSciTech. 2020;21(6):1–12.
 321. Imperlini E, Massaro F, Buonocore F. Antimicrobial Peptides against Bacterial Pathogens: Innovative Delivery Nanosystems for Pharmaceutical Applications. Antibiotics [Internet]. 2023 Jan 16;12(1):184. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/1/184>
 322. Sharma R, Raghav R, Priyanka K, Rishi P, Sharma S, Srivastava S, et al. Exploiting chitosan and gold nanoparticles for antimycobacterial activity of in silico identified antimicrobial motif of human neutrophil peptide-1. Sci Rep. 2019;9(1):1–14.
 323. Hassan A, Ikram A, Raza A, Saeed S, Paracha RZ, Younas Z, et al. Therapeutic potential of novel mastoparan-chitosan nanoconstructs against clinical MDR *Acinetobacter baumannii*: In silico, in vitro and in vivo Studies. Int J Nanomedicine. 2021;16:3755–73.
 324. Falciani C, Zevolini F, Brunetti J, Riolo G, Gracia R, Marradi M, et al. Antimicrobial peptide-loaded nanoparticles as inhalation therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. Int J Nanomedicine. 2020;15:1117–28.
 325. Casciaro B, D'Angelo I, Zhang X, Loffredo MR, Conte G, Cappiello F, et al. Poly(lactide- co-glycolide) Nanoparticles for Prolonged Therapeutic Efficacy of Esculentin-1a-Derived Antimicrobial Peptides against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection: In Vitro and in Vivo Studies. Biomacromolecules. 2019;20(5):1876–88.
 326. Chi Y, Zhu S, Wang C, Zhou L, Zhang L, Li Z, et al. Glioma homing peptide-modified PEG-PCL nanoparticles for enhanced anti-glioma therapy. J Drug Target. 2016;24(3):224–32.
 327. Tanaka K, Kanazawa T, Shibata Y, Suda Y, Fukuda T, Takashima Y, et al. Development of cell-penetrating peptide-modified MPEG-PCL diblock copolymeric nanoparticles for systemic gene delivery. Int J Pharm [Internet]. 2010;396(1–2):229–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.06.028>
 328. Lu N, Li R, Liu Q, Hu B, Xu X, Ji C, et al. Antitumor and antimetastatic

- effects of pemetrexed-loaded targeted nanoparticles in B16 bearing mice. *Drug Deliv*. 2016;23(7):2566–74.
329. Pourcelle V, Devouge S, Garinot M, Pr  at V, Marchand-Brynaert J. PCL-PEG-based nanoparticles grafted with GRGDS peptide: Preparation and surface analysis by XPS. *Biomacromolecules*. 2007;8(12):3977–83.
 330. Wu X, Guy RH. Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2009;19(6):371–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224709500809>
 331. Modena MM, R  hle B, Burg TP, Wuttke S. Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Adv Mater*. 2019;31(32):1–26.
 332. Falanga A, Del Genio V, Kaufman EA, Zannella C, Franci G, Weck M, et al. Engineering of janus-like dendrimers with peptides derived from glycoproteins of herpes simplex virus type 1: Toward a versatile and novel antiviral platform. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12).
 333. Kopp M, Aufderhorst UW, Alt M, Dittmer U, Eis-H  binger AM, Giebel B, et al. Induction of herpes simplex virus type 1 cell-to-cell spread inhibiting antibodies by a calcium phosphate nanoparticle-based vaccine. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2019;16:138–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.12.002>
 334. Fotticchia T, Vecchione R, Scognamiglio PL, Guarnieri D, Calcagno V, Di Natale C, et al. Enhanced Drug Delivery into Cell Cytosol via Glycoprotein H-Derived Peptide Conjugated Nanoemulsions. *ACS Nano* [Internet]. 2017 Oct 24;11(10):9802–13. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.7b03058>
 335. Falanga A, Tarallo R, Carberry T, Galdiero M, Weck M, Galdiero S. Elucidation of the interaction mechanism with liposomes of gH625-peptide functionalized dendrimers. *PLoS One*. 2014;9(11).
 336. Gong E, Matthews B, McCarthy T, Chu J, Holan G, Raff J, et al. Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. *Antiviral Res* [Internet]. 2005 Dec;68(3):139–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354205001749>
 337. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* [Internet]. 2000 Jul;85(1):9–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62426-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62426-X)
 338. Liu J, Liu Z, Pang Y, Zhou H. The interaction between nanoparticles and immune system: application in the treatment of inflammatory diseases. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2022;20(1):1–25. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01343-7>
 339. Wolf-Grosse S, Rokstad AM, Ali S, Lambris JD, M  llnes TE, Nilsen AM, et al. Iron oxide nanoparticles induce cytokine secretion in a complement-dependent manner in a human whole blood model. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3927–40.
 340. Khan HA, Alamery S, Ibrahim KE, El-Nagar DM, Al-Harbi N, Rusop M, et al. Size and time-dependent induction of proinflammatory cytokines expression in brains of mice treated with gold nanoparticles. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2019;26(3):625–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.012>
 341. Elsabahy M, Wooley KL. Cytokines as biomarkers of nanoparticle

- immunotoxicity. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2013;42(12):5552. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs60064e>
342. Hussain S, Vanoirbeek JAJ, Hoet PHM. Interactions of nanomaterials with the immune system. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2012;4(2):169–83.
 343. Dobrovolskaia MA, Germolec DR, Weaver JL. Evaluation of nanoparticle immunotoxicity. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(7):411–4.
 344. Dwivedi PD, Tripathi A, Ansari KM, Shanker R, Das M. Impact of nanoparticles on the immune system. *J Biomed Nanotechnol*. 2011;7(1):193–4.
 345. Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. Dendritic Cells Acquire Antigens from Live Cells for Cross-Presentation to CTL. *J Immunol* [Internet]. 2001 Mar 15;166(6):3717–23. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/166/6/3717/70383/Dendritic-Cells-Acquire-Antigens-from-Live-Cells>
 346. Nayak J V., Hokey DA, Larregina A, He Y, Salter RD, Watkins SC, et al. Phagocytosis Induces Lysosome Remodeling and Regulated Presentation of Particulate Antigens by Activated Dendritic Cells. *J Immunol* [Internet]. 2006 Dec 15;177(12):8493–503. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/177/12/8493/73994/Phagocytosis-Induces-Lysosome-Remodeling-and>
 347. Liu C, Zou Q, Tang H, Liu J, Zhang S, Fan C, et al. Melanin nanoparticles alleviate sepsis-induced myocardial injury by suppressing ferroptosis and inflammation. *Bioact Mater* [Internet]. 2023 Jun;24(August 2022):313–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.12.026>
 348. Journal AI, Prakash SK. Immunogenic antitumor potential of Prakasine nanoparticles in zebrafish by gene expression stimulation gene expression stimulation. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2023;51(1):41–56. Available from: <https://doi.org/10.1080/21691401.2023.2173217>
 349. Arkaban H, Jaber J, Bahramifar A, Zolfaghari Emameh R, Farnoosh G, Arkaban M, et al. Fabrication of Fe(III)-doped mesoporous silica nanoparticles as biocompatible and biodegradable theranostic system for Remdesivir delivery and MRI contrast agent. *Inorg Chem Commun* [Internet]. 2023 Apr;150(January):110398. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387700323000102>
 350. Kong B, Seog JH, Graham LM, Lee SB. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2011;6(5):929–41.
 351. Kłodzińska SN, Molchanova N, Franzyk H, Hansen PR, Damborg P, Nielsen HM. Biopolymer nanogels improve antibacterial activity and safety profile of a novel lysine-based α -peptide/ β -peptoid peptidomimetic. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2018;128:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.03.012>
 352. Ghaeini-Hesaroeiye S, Boddohi S, Vasheghani-Farahani E. Dual responsive chondroitin sulfate based nanogel for antimicrobial peptide delivery. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;143:297–304. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.026>
 353. Alipoor R, Ayan M, Hamblin MR, Ranjbar R, Rashki S. Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials as a New Approach to the Treatment and Prevention of Bacterial Infections. *Front Bioeng Biotechnol*.

- 2022;10(June):1–15.
354. Chowdary KPR, Rao YS. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(11):1717–24.
 355. Services USD of H and H. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. 2013. p. 5–6. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm>
 356. Kankala RK, Han Y, Na J, Lee C, Sun Z, Wang S, et al. Nanoarchitected Structure and Surface Biofunctionality of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Adv Mater* [Internet]. 2020 Jun 21;32(23):1907035. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.201907035>
 357. Zhang Z, Kuo JCT, Yao S, Zhang C, Khan H, Lee RJ. CpG Oligodeoxynucleotides for Anticancer Monotherapy from Preclinical Stages to Clinical Trials. *Pharmaceutics.* 2022;14(1):1–15.
 358. Tang C, Wang H, Guo L, Zou C, Hu J, Zhang H, et al. CpG-Conjugated Silver Nanoparticles as a Multifunctional Nanomedicine to Promote Macrophage Efferocytosis and Repolarization for Atherosclerosis Therapy. 2023;
 359. Chen W, Jiang M, Yu W, Xu Z, Liu X, Jia Q, et al. CpG-based nanovaccines for cancer immunotherapy. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:5281–99.
 360. Bourne N, Keith CA, Miller AL, Pyles RB, Cohen G, Milligan GN. Boosting of vaginal HSV-2-specific B and T cell responses by intravaginal therapeutic immunization results in diminished recurrent HSV-2 disease. *J Virol.* 2023;97(9):1–15.

ANEXO A - PARECER DO CEUA



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 260/19

2) DATA DO PARECER: 13/01/2021

3) TÍTULO DO PROJETO:

Desenvolvimento de Sistema Imunoterapêutico Nanoestruturado para Herpes Simplex Vírus

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Luiz Carlos Rodrigues Júnior

5) RESUMO DO PROJETO:

O HSV-1 e HSV-2 são vírus dermatotópicos presente em mais de 90% da população mundial, sendo que não existe cura ou vacina. O vírus se estabelece no indivíduo permutando entre o estado de latência e recidiva (anual, semestral ou até mensal). A intensidade e frequência da recidiva associa-se ao herpes neonatal, bem como aumento da transmissão de outras infecções sexualmente transmissíveis, reclusão sexual, qualidade de vida e problemas psíquicos. Durante os episódios de infecção aguda, a resposta imune é constituída por linfócitos citotóxicos (linfócitos T CD8 em 80% dos casos), os quais reagem contra o epítipo imunodominante SSIEFARL desse vírus. Apesar do SSIEFARL ser imunogênico para humanos, ele é instável e de baixa biodisponibilidade quando utilizado de forma isolada em imunização. Por isso, o estudo visa encapsular o peptídeo em uma matriz polimérica nanoparticulada com vistas de promover estabilidade, aumento no tempo de retenção em sítios específicos, aumento de fagocitose e compatibilidade para aplicação em mucosa e pele (locais de infecção e recidiva dos HSV). A hipótese é que o peptídeo SSIEFARL administrado em sistema nanoestruturado aumente a resposta protetora/resolutiva local mediada por linfócitos TCD8 residentes na pele ou mucosa, o que poderá prevenir significativamente a frequência de recidivas de indivíduos infectados. Para tal, serão utilizado o camundongo C57B1/6 em dois modelos de infecção herpética (HSV-1 no dorso das costas e HSV-2 na mucosa genital).

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Produzir e caracterizar um produto tópico nanoestruturado, assim como avaliar a eficiência desse sistema como imunoterapêutico para otimização de resposta local mediada por linfócitos TCD8 contra o Herpes Simplex Vírus- 1 e 2.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Aprimoramento da Metodologia: ☐ Sim ☒ Não
Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório): Biotério UFCSPA

Outra Instituição. Qual? Instituto do Cérebro (PUC-RS)

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
4º trimestre após início do estudo	Camundongos	F	240



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Aprimoramento da Metodologia: ☐ Sim ☒ Não
Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório): Biotério UFCSPA

Outra Instituição. Qual? Instituto do Cérebro (PUC-RS)

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
4º trimestre após início do estudo	Camundongos	F	240



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

☒ Aprovado

☐ Com Pendência

☐ Não aprovado

Data de início 17/10/2019 Data de Término 15/07/2022

Comentários gerais sobre o projeto:

Os pesquisadores apontaram que o título original do projeto será mantido, bem como realizaram as descrições solicitadas no projeto. No entanto, a CEUA recomenda que os pesquisadores monitorem a temperatura do ar-condicionado do carro durante o transporte dos animais para que a mesma permaneça em temperatura máxima de 22°C.

A CEUA informa que conforme a Portaria nº 29/2020/Reitoria, de 3/julho/2020 da UFCSPA, as atividades presenciais seguem suspensas, sendo assim os cronogramas experimentais dos projetos devem atender o apresentado pela UFCSPA. Modificações na liberação das atividades presenciais por parte da Universidade, necessitará ajustes nos cronogramas quando necessário.

ANEXO B - CURRÍCULO LATTES

26/12/23, 16:31

Currículo Lattes

Imprimir
currículo**Renata Zorzetto**Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/1897246252169385>

Última atualização do currículo em 26/12/2023

Resumo informado pelo autor

Biomédica. CRBM 2003. Habilitações: Patologia Clínica e Biologia Molecular. Bacharelado em Biomedicina com graduação sanduíche: Universidade Franciscana (Santa Maria, Brasil) - Universidade de Toronto (Toronto, Canadá) através do Programa Ciência Sem Fronteiras. Experiência profissional e acadêmica em análises clínicas, pesquisa científica, pesquisa clínica e docência. Mestrado em Bioexperimentação pela Universidade de Passo Fundo (Linha de pesquisa: Etiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial de doenças transmissíveis e não transmissíveis). Atualmente, bolsista CAPES no curso de Doutorado em Biociências pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (Linha de pesquisa: Imunologia de vírus e nanotecnologia).

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Renata Zorzetto

Dados pessoais

Nascimento 07/06/1990 - Campinas do Sul/RS - Brasil

CPF 014.388.230-96

Formação acadêmica/titulação

- 2020** Doutorado em BIOCIÊNCIAS.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Porto Alegre, Brasil
Título: Desenvolvimento de imunoterapêutico nanoestruturado contra o Herpes simplex virus genital
Orientador: Luiz Carlos Rodrigues Júnior
Co-orientador: Tanira Alessandra Aguirre
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2017 - 2020** Mestrado em Bioexperimentação.
Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, Brasil
Título: EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE E NO RIO GRANDE DO SUL, Ano de obtenção: 2020
Orientador: Luiz Carlos Kreutz
Bolsista do(a): Bolsa Institucional UPF
- 2010 - 2014** Graduação em Biomedicina.
Universidade Franciscana, UFN, Santa Maria, Brasil
com período sanduíche em University of Toronto (Orientador: Patrick T. Gunning)
Título: Development of small molecule inhibitors of Stat3 protein for cancer therapy
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005 - 2007** Ensino Médio (2o grau).
Instituto Anglicano Barão do Rio Branco, IABRB, Erechim, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSA

Vínculo institucional

- 2020 - Atual** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Aluna de Doutorado, Carga horária: 44, Regime: Integral
Outras informações:
Doutorado em Biociências. Linha de pesquisa: Imunologia de vírus.

2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Vínculo institucional

- 2020 - 2022** Vínculo: Voluntário, Enquadramento funcional: Voluntário, Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Estudo VIR-7831: Estudo randomizado, multicêntrico, duplo-cego, controlado por placebo para avaliar a segurança e a eficácia do anticorpo monoclonal VIR-7831 no tratamento precoce da doença por coronavírus 2019 (COVID-19) em pacientes não hospitalizados. Investigador principal: Dr. Diego Falci.
Estudo ACTIV-1 IM: Protocolo Mestre Randomizado para imunomoduladores para o Tratamento de COVID-19. Investigador principal: Dr. Eduardo Sprinz. Estudo VERU-111: Estudo de fase 3 randomizado, controlado por placebo, para avaliar a eficácia e segurança de VERU-111 para o tratamento da Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) em Pacientes com Alto Risco de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Investigador principal: Dr. Eduardo Sprinz. Estudo Rigel: Um Estudo Duplo-Cego, Randomizado, Placebo-Controlado, de Desenho Adaptativo, Multicêntrico, de Fase 3 para Avaliar a Eficácia e Segurança de Fostamatinib em Indivíduos com COVID-19. Investigador principal: Dr. Eduardo Sprinz.

3. UNYLEYA EDITORA E CURSOS S/A - Unyleya

Vínculo
institucional

2021 - 2023 Vínculo: Tutor , Enquadramento funcional: Tutora e Conteudista , Carga horária: 8, Regime: Parcial

1. Universidade de Passo Fundo - UPF

Vínculo
institucional

2017 - 2019 Vínculo: Scholarship , Enquadramento funcional: Aluna de Mestrado , Carga horária: 20, Regime: Parcial Outras informações:
Mestrado em Bioexperimentação. Linha de pesquisa: Etiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial de doenças transmissíveis e não transmissíveis.

2. Hospital Cristo Redentor S/A - CRISTO REDENTOR

Vínculo
institucional

2019 - 2019 Vínculo: Empregada , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 44, Regime: Integral

3. Laboratório Sani - SANI

Vínculo
institucional

2017 - 2019 Vínculo: Empregada , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 44, Regime: Integral

4. Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul - FASURGS

Vínculo
institucional

2017 - 2017 Vínculo: Professor Visitante , Enquadramento funcional: Professor de Inglês Instrumental , Carga horária: 6, Regime: Parcial

5. Laboratório Widai - LW

Vínculo
institucional

2015 - 2017 Vínculo: Empregada , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

6. CCAA Paissandu - CCAA

Vínculo
institucional

2015 - 2017 Vínculo: Empregada , Enquadramento funcional: Instrutora de Idiomas , Carga horária: 20, Regime: Parcial

7. Laboratório Ticiani - LT

Vínculo
institucional

2013 - 2014 Vínculo: Empregada , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 44, Regime: Dedicção exclusiva

8. University of Toronto - UTORONTO

Vínculo

1. Laboratório Oswaldo Cruz - OC

Vínculo
institucional

2014 - 2014 **Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 8, Regime: Parcial**

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. LIMA, K.; FONTOURA, J. C.; SOUZA, P. O.; FAZOLO, T.; HILARIO, G.; **ZORZETTO, R.**; RODRIGUES JUNIOR, L. C.; BORIN, A.; COIMBRA, L. D.; BISPO-DOS-SANTOS, K.; GRANJA, F.; MARQUES, R. E.; ZAVAGLIA, G. O.; FERNANDES, I. F.; **POLESE**, F. H.; POLESE-BONATTO, M.; TONINI, M. L.; CARMO, G. M. I.; ALMEIDA, W. A. F.; BORGES, T. J.; NAKAYA, H. I.; PROENÇA-MODENA, J. L.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; SCOTTA, M. C.; STEIN, R. T.; BONORINO, C.

SARS-CoV-2 infected children form early immune memory responses dominated by nucleocapsid-specific CD8+ T cells and antibodies. *Frontiers in Immunology*, v.13, p.364 - , 2022.

2. FAZOLO, TIAGO; LIMA, KAPINA; FONTOURA, JULIA C.; DE SOUZA, PRISCILA OLIVEIRA; HILARIO, GABRIEL; **ZORZETTO, RENATA**; JUNIOR, LUIZ RODRIGUES; PSCHIEDT, VERIDIANE MARIA; DE CASTILHOS FERREIRA NETO, JAYME; HAUBERT, ALISSON F.; GAMBIN, IZZA; OLIVEIRA, **JOAO**; VELLO, RAISSA S.; DE BASTOS BALBE E GUTIERRES, MATHEUS; GASSEN, RODRIGO BENEDETTI; COIMBRA, LAIS DURÇO; BORIN, ALEXANDRE; MARQUES, RAFAEL ELIAS; SARTOR, IVANE TAIS SAUTHIER; ZAVAGLIA, GABRIELA OLIVEIRA; FERNANDES, INGRID RODRIGUES; NAKAYA, HELDER I.; VARELA, FERNANDA HAMMES; POLESE-BONATTO, MÁRCIA; BORGES, **JOAO** J.; CALLEGARI-JACQUES, SÍDIA MARIA; DA COSTA, MARCELA SANTOS CORREA; DE ARAUJO SCHWARTZ, JAQUELINE; SCOTTA, MARCELO COMERLATO; STEIN, RENATO T.; BONORINO, CRISTINA

Pediatric COVID-19 patients in South Brazil show abundant viral mRNA and strong specific anti-viral responses. *Nature Communications*, v.12, p.6844 - , 2021.

3. **ZORZETTO, RENATA**; KLEIN, RAFAELA LUIZA; ERPEN, LUANA MARINA SHEER; KLEIN, BÁRBARA DIEL; GIACOBBO, IGOR; DA SILVEIRA, RAFAEL ARRUA; FRANDOLOSO, RAFAEL; KREUTZ, LUIZ CARLOS

Unusual high prevalence of antibodies to hepatitis E virus in South Brazil. *FEMS Microbiology Letters*, v.368, p.fnab076 - , 2021.

4. ZORZETTO, R.; Saraiva, L.C.; Costa, L.; Palma, T. V.; Couto, J.C.M.; Augusti, L.M.; Leal, G.T.; Quadros, F.P.; Fernandes, G.M.; Kolling, Jenifer; Nussbaumer, A.; Santini, C.S.; Schuh, G.; Ságrio, M.; VIZZOTTO, B. S.

TÉCNICA DE PCR SIMPLEX ASSOCIADA A MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE BAIXO CUSTO PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DE SHIGELLA SPP. DISCIPLINARUM SCIENTIA. SÉRIE CIÊNCIAS DA SAÚDE, v.16, p.11 - 17, 2015.

Livros organizados

1. **ZORZETTO, R.**; RODRIGUES JUNIOR, L. C.; RAMOS JUNIOR, A.; COELHO, D. F.; HILARIO, G. T. M.; LIMA, K. R.; ROCHA, M. S.; SILVA, P. E. C.

Interfaces entre saúde e educação: saberes, práticas e olhares interdisciplinares. Curitiba: Bagai, 2023, v.1. p.166.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **ZORZETTO, RENATA**; HILARIO, G. T. M. **Classificação dos tumores**, 2021. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)
2. **ZORZETTO, RENATA** **Métodos de Diagnóstico**, 2021. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 26/12/2023 às 16:31:46.

ANEXO C – COAUTORIA DE ARTIGO 1 (PROJETO COVIDa*)

*Projeto desenvolvido junto ao Laboratório de Imunoterapia durante a pandemia da COVID-19.



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27120-y>

OPEN

Pediatric COVID-19 patients in South Brazil show abundant viral mRNA and strong specific anti-viral responses

Tiago Fazolo^{1,10}, Karina Lima², Julia C. Fontoura^{1,10}, Priscila Oliveira de Souza¹, Gabriel Hilario¹, Renata Zorzetto¹, Luiz Rodrigues Júnior¹, Veridiane Maria Pscheidt¹, Jayme de Castilhos Ferreira Neto¹, Alisson F. Haubert¹, Izza Gambin¹, Aline C. Oliveira¹, Raissa S. Mello¹, Matheus de Bastos Balbe e Gutierrez¹, Rodrigo Benedetti Gassen², Lais Durço Coimbra³, Alexandre Borin³, Rafael Elias Marques³, Ivaine Tais Sauthier Sartor⁴, Gabriela Oliveira Zavaglia⁴, Ingrid Rodrigues Fernandes⁴, Helder I. Nakaya⁵, Fernanda Hammes Varela^{4,6}, Márcia Polese-Bonatto⁴, Thiago J. Borges², Sidia Maria Callegari-Jacques⁷, Marcela Santos Correa da Costa⁸, Jaqueline de Araujo Schwartz⁸, Marcelo Comerlato Scotta^{4,6}, Renato T. Stein^{4,6} & Cristina Bonorino^{1,9}✉

COVID-19 manifests as a milder disease in children than adults, but the underlying mechanisms are not fully characterized. Here we assess the difference in cellular or humoral immune responses of pediatric and adult COVID-19 patients to see if these factors contribute to the severity dichotomy. Children's non-specific immune profile is dominated by naïve lymphocytes and HLA-DR^{high}CX3CR1^{low} dendritic cells; meanwhile, children show strong specific antibody and T cell responses for viral structural proteins, with their T cell responses differing from adults by having weaker CD8⁺TNF⁺ T cells responses to S peptide pool but stronger responses to N and M peptide pools. Finally, viral mRNA is more abundant in pediatric patients. Our data thus support a scenario in which SARS-CoV-2 infected children contribute to transmission yet are less susceptible to COVID-19 symptoms due to strong and differential responses to the virus.

¹ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ² Center for Transplantation Sciences, Department of Surgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. ³ Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEN), Campinas, São Paulo, Brazil. ⁴ Social Responsibility - PROADI-SUS, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ⁵ Hospital Israelita Albert Einstein, Jardim Leonor, São Paulo, Brazil. ⁶ Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ⁷ Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ⁸ Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações, Departamento de Imunizações e doenças transmissíveis, Secretaria de vigilância em saúde - Ministério da Saúde (CGPNI/DEIDT/SVS/MS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ⁹ Department of Surgery, University of California at San Diego - UCSD, La Jolla, CA, USA. ¹⁰ These authors contributed equally: Tiago Fazolo, Karina Lima, Julia C. Fontoura. ✉email: cristinabonorino@gmail.com

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a complex disease with multisystemic involvement, and an array of clinical manifestations that can vary from asymptomatic to severe outcomes leading to death¹ constituting an ongoing worldwide emergency². Epidemiological evidence of less severe forms of the disease and reduced mortality in children upon infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is consistent^{3,4}, except for a multisystem inflammatory syndrome (MISC) associated with co-morbidities in a relatively low percentage of children⁵. The pediatric population (0–19 years old) represents more than 25% of the Brazilian population, however, it is observed that this group corresponds to only 1.9% (19,589/989,170) of all cases of COVID-19 reported in the past 12 months. Mortality (case fatality rate, or CFR—the proportion of deaths in identified confirmed cases), among children, represented 0.5% (1564/321,659) of all deaths due to the disease reported in the same period. The lethality in children and adolescents hospitalized due to SARS by COVID-19 was 8.0% (1574/19,589), while the overall lethality in all age groups was 32.5% (321,659/989,170), in the observed period (data from SIVEP-Gripe/Influenza Epidemiological Surveillance Information System, Brazilian Ministry of Health). Thus, a significantly lower number of children and adolescents have severe clinical presentations with the need for hospitalization, or that will lead to death when compared to other age groups.

Different hypotheses are used to explain this phenomenon^{6,7}. Milder disease in children can result from a reduced expression of the viral receptor Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), leading to lower levels of viral replication⁸. Alternatively, a differential immune response in children leads to a distinct infection course from adults⁹ or yet the pre-existence of neutralizing antibodies to seasonal coronaviruses could confer some cross-protection against SARS-CoV-2 induced disease. Children are considered one of the main reservoirs for these viruses¹⁰, even though some studies show large circulation also among college students¹¹. At present, the scarcity of data prevents a clear understanding of the striking differences between the pediatric and adult outcomes after infection by SARS-CoV-2.

Comprehensive studies have characterized immune responses in adults with mild or severe forms of COVID-19^{12–15}. However, considerably fewer studies have focused on pediatric patients. This is a subject of paramount importance, not only because it is central to the design of public policies regulating school opening (and all the activities associated with it) during the pandemic, but also because understanding the milder disease presentation in children may provide important clues for the design of prevention strategies as well as novel therapeutic pathways for the management of COVID-19.

Here, we present a detailed characterization of plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from adult and pediatric COVID-19 patients by multi-parameter flow cytometry, defining 78 immune cell subsets. Using a systems approach, we analyze 38,670 data points, including anti-SARS-CoV-2 IgA and IgG antibodies, and frequencies of specific effector T cells. Taken together, our findings suggest that children produce a strong, yet differential immune response when compared to adults, which associates with the mild manifestation in pediatric COVID-19.

Results

Unsupervised analysis of non-specific immune responses in pediatric patients and adults with mild or severe disease. The study design is summarized in Fig. 1A. We have recruited a total of 92 patients (25 children; 34 adults with mild disease—AMD; and 33 adults with severe disease—ASD). All subjects had COVID-19 confirmed by PCR detecting SARS-CoV-2 infection.

All children had mild disease and were treated as outpatients. Their characteristics are described in Table 1. The youngest individual enrolled was 7 months old—which does not appear in the table because only the interquartile interval (IQR) is shown. Most individuals were Caucasian. As expected, comorbidities were concentrated in the group with severe disease, which was also the group with a higher mean age. Some symptoms are probably not accurately assessed in some children, such as anosmia or dysgeusia, due to the age of some individuals in this group. Dyspnea was significantly less frequent in children. Median cycle threshold (Ct) levels for all three probes used in PCR were higher in AMD, and not different between ASD and children.

Comprehensive immune profiling of PBMCs from pediatric and adult patients was performed using flow cytometry, generating 77 variables (frequencies of cell subpopulations and geometric Mean Fluorescent Intensity/gMFI of activation markers). Gating strategies are detailed in Supplementary Fig. 1A–H). To reduce the dimensionality of the numerous variables, a PCA analysis was carried out. A biplot graphic representation of principal component scores PC1 and PC2 indicated that some of the pediatric patients were separated from the mild adult patients (AMD), and the severe adult patients (ASD) (Fig. 1B). Although some overlapping between groups was seen for a few individuals from each group, PC1 separated most of the ASD patients from the pediatric patients, while PC2 separated AMD patients from severe ones and pediatric patients (Fig. 1B). The absence of a perfect separation among groups of patients was not unexpected since some of the individuals from different groups may have similar cell frequency profiles. The PC scores from the three groups were plotted and the significance of the differences was evaluated by a KW test (Fig. 1C). Children had the highest mean score value for PC1 (2.765), followed by AMD (0.142) and ASD (−2.351), and these differences were highly significant (Fig. 1C). For PC2, AMD had a mean score of 2.079, higher ($p < 0.0001$) than children and ASD (mean scores of −1.585 and −1.180, respectively, $p > 0.999$). To further assess the immune responses of each group, we performed a hierarchical clustering analysis based on the original data. The results (Fig. 1E) showed three main clusters—highlighted in different shades of gray. The first cluster is mainly composed of adults with mild disease; the second cluster, mainly of children; and the third, mainly of adults with severe disease. In spite of the resulting clusters not being composed uniquely by individuals of the same group of patients, mild cases represent 72% of the cases in the first cluster whereas children slightly predominate in the second one, and ASD in the third one. Thus, the hierarchical clustering analysis supported the findings from PCA, showing that the immune responses of most of the children differ from adult individuals with severe COVID-19. We also examined principal components PC3, PC4 and PC5 scores for additional information about the differences in the profiles of child and adult patients. PC3 separated children from ASD, as already seen using PC1, whereas PC4 and PC5 did not separate the groups at all (Supplementary Fig. 2A). Principal components are calculated based on correlations among variables, and to interpret the meaning of each PC we analyzed the positive or negative contributions (loadings) of each variable in each PC. The variables with the main positive and negative contributions (loadings) are identified in Fig. 1D, for PC1 and PC2. Respective loadings values are listed in Supplementary Table 1. PC1 had positive inputs mainly by IgM⁺ memory B cells, naïve B cells, and cDC1 DR expression; and main negative contributions by proliferating B cells; plasmablasts; and CX3CR1⁺ expression in dendritic cells (DC). That indicated that the group with the highest mean scores for PC1 (children) would be characterized by a profile of predominantly naïve or low-affinity memory B cells,

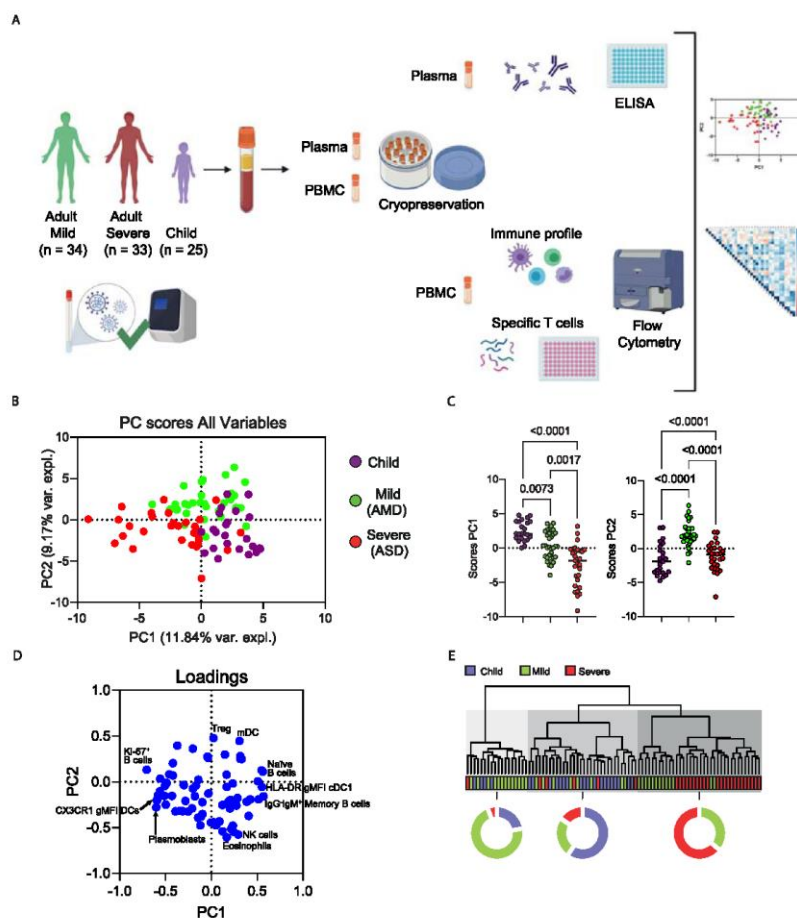


Fig. 1 Experimental approach and differential immune profile of children, mild and adult patients by principal component analysis. **A** Graphical representation of the study design; **B–E** Principal component analysis of the clusters of pediatric (purple) and adult patients with mild (green) and severe (red) disease; each dot represents a patient, color coded. **B** Distribution of clusters by PC1 and PC2; **C** comparison of scores for each PC by analysis of variance (Kruskal-Wallis) with P values indicated over brackets, the horizontal bar representing the median. **D** Contribution of variables (loadings) to PC1xPC2. Each blue dot is a variable. **E** Hierarchical clustering analysis of immune variables. Each shade of gray is a cluster with a representative distribution between groups. Graphical study design was created with biorender.com (accessed on 20 October 2021). Source data are provided as a Source Data file.

not activated/differentiated; and their dendritic cells would be high in DR, but low in CX3CR1. The opposite would be true for individuals with the lowest mean scores (ASD), while AMD would be characterized by an intermediate profile for these variables. The main positive influences for PC2 were T regs, myeloid dendritic cells (mDCs), and TEMRA cells, indicating mild adult patients present significantly higher frequencies of these cell subpopulations. The main negative influences for PC2 were eosinophils, natural killer (NK) cells, and granulocytes, and these should be the lowest in AMD. To verify these PCA interpretations, we compared them to the analysis of variance

(KW) results performed among the three groups of patients regarding the three most relevant, positive and negative (Fig. 2) influencers, variables for PC1 and PC2. Comparisons of the three groups for their variances regarding each variable agreed with the differences among them detected by PCA. What emerged from these two combined analyses was that AMD, ASD, and children differed based mostly on the state of activation of B and T lymphocytes, and in targeting innate inflammatory responses to inflamed tissues.

The percent of the total variability explained by these first principal components was low; the first two PCs together

Table 1 Clinical characteristics of all patients in this study.

Characteristics	Mild (n = 34)	Severe (n = 33)	Children (n = 24)	P-value
Age (y), median (IQR)	37.8 (27.0–44.6)	60.8 (38.8–75.9)	7.4 (2.5–13.8)	2.20e-14^a
Female sex, n (%)	22 (64.7)	17 (51.5)	10 (41.7)	0.21 ^b
Active or passive smoking, n (%)	2 (5.9)	6 (18.2)	3 (12.5)	0.08 ^b
Racial or ethnic group				
Caucasian, n (%)	28 (82.4)	20 (60.6)	17 (70.8)	0.22 ^b
Non-caucasian, n (%)	4 (11.8)	1 (3.0)	5 (20.8)	
Days from symptom onset to sample collection				
Days, median (IQR)	18.0 (16.0–20.5)	10.0 (7.5–14.0)	15.0 (7.8–17.0)	1.00e-04^a
Symptoms				
Headache, n (%)	32 (94.1)	23 (69.7)	13 (54.2)	0.02^b
Myalgia, n (%)	30 (88.2)	20 (60.6)	8 (33.3)	1.83e-03^b
Malaise, n (%)	28 (82.4)	31 (93.9)	14 (58.3)	1.26e-03^b
Coryza, n (%)	26 (76.5)	18 (54.5)	15 (62.5)	0.21 ^b
Cough, n (%)	25 (73.5)	30 (90.9)	16 (66.7)	0.07 ^b
Fever, n (%)	23 (67.6)	26 (78.8)	19 (79.2)	0.51 ^b
Chills, n (%)	21 (61.8)	20 (60.6)	9 (37.5)	0.12 ^b
Dyspnea, n (%)	20 (58.8)	22 (66.7)	4 (16.7)	4.57e-04^b
Dysgeusia, n (%)	20 (58.8)	12 (36.4)	6 (25.0)	0.19 ^b
Sore throat, n (%)	19 (55.9)	12 (36.4)	10 (41.7)	0.32 ^b
Appetite loss, n (%)	19 (55.9)	21 (63.6)	12 (50.0)	0.56 ^b
Anosmia, n (%)	19 (55.9)	11 (33.3)	6 (25.0)	0.21 ^b
Stuffy nose, n (%)	17 (50.0)	11 (33.3)	13 (54.2)	0.33 ^b
Conjunctivitis, n (%)	16 (47.1)	10 (30.3)	7 (29.2)	0.28 ^b
Nausea, n (%)	14 (41.2)	12 (36.4)	6 (25.0)	0.64 ^b
Sputum production, n (%)	12 (35.3)	10 (30.3)	6 (25.0)	0.70 ^b
Diarrhea, n (%)	12 (35.3)	16 (48.5)	7 (29.2)	0.25 ^b
Vomiting, n (%)	2 (5.9)	4 (12.1)	4 (16.7)	0.42 ^b
Skin rash, n (%)	1 (2.9)	1 (3.0)	1 (4.2)	0.97 ^b
Underlying medical conditions				
Obesity, n (%)	10 (29.4)	13 (39.4)	0 (0.0)	0.01^b
Hypertension, n (%)	6 (17.6)	15 (45.5)	0 (0.0)	1.00 ^b
Asthma, n (%)	1 (2.9)	2 (6.1)	5 (20.8)	3.77e-05^b
Diabetes mellitus, type 1 and 2, n (%)	1 (2.9)	11 (33.3)	0 (0.0)	0.04^b
Cancer, n (%)	1 (2.9)	2 (6.1)	0 (0.0)	0.73 ^b
Tuberculosis, n (%)	0 (0.0)	1 (3.0)	0 (0.0)	0.73 ^b
Stroke/CVA, n (%)	0 (0.0)	4 (12.1)	0 (0.0)	0.26 ^b
COPD, n (%)	0 (0.0)	4 (12.1)	1 (4.2)	0.43 ^b
Heart failure, n (%)	0 (0.0)	2 (6.1)	0 (0.0)	0.53 ^b
Congenital heart disease, n (%)	0 (0.0)	1 (3.0)	0 (0.0)	0.73 ^b
Ct value (median, IQR)				
ORFlab	19.3 (16.7–22.6)	24.3 (19.9–29.7)	19.0 (15.4–27.5)	0.05 ^a
S	19.8 (16.7–23.0)	25.3 (21.9–27.7)	19.0 (13.2–28.3)	0.02^a
N	18.7 (16.1–23.5)	24.0 (20.6–28.6)	19.0 (14.1–29.2)	0.02^a
Oxygen use				
Oxygen use during hospitalization, n (%)	0 (0.0)	22 (66.7)	0 (0.0)	8.44e-12^b

IQR = interquartile range.

^aKruskal-Wallis test.^bPearson's Chi-squared test; Significance P-value are bold.

explained only 21% of the variance (Supplementary Table 1). This indicated that these 77 variables were not highly correlated. A correlation analysis using Spearman's coefficient confirmed this observation (Supplementary Fig. 2), revealing a general pattern of moderate to weak correlations, but also identifying clusters of variables that were more correlated than others. These clusters represented six types of immune "signatures": proliferating/activated T cells; DCs; granulocytes + monocytes; NK cells; B cells; and memory T cells. Follicular helper T cells (T_{fh}) related variables were weakly correlated and were not considered as a cluster. To further identify differences and/or similarities of the general immune responses among the three groups of COVID-19 patients we performed six separated PCAs for the identified clusters of variables. In this analysis, the first two PCs for each cluster were now explained a larger portion of the total variance (44.19, 63.17, 50.37, 67.35, 49.56, and 42.49%, respectively -

Supplementary Table 1) among the three types of patients, and their distributions in children, AMD and ASD were analyzed. The results are shown in Fig. 3A–D and Supplementary Fig. 3A–C, with the respective graphic representations for scores and loadings. We started by analyzing PCs formed by the innate cells' signatures. Principal components for the clusters of Granulocytes + Monocytes (Fig. 3A) and NK cells (Fig. 3B), although derived from expressive correlations among their respective variables, did not separate the three groups of patients, indicating that the individuals were not significantly different for the variables that composed these PCs, even though they were highly correlated (Supplementary Fig. 2B, C). That was intriguing because those variables had, as stated above, important contributions for the PC2 of all variables (Fig. 1), but it also indicated that this contribution helped separate the groups mostly based on their correlations with other variables in the group of all variables,

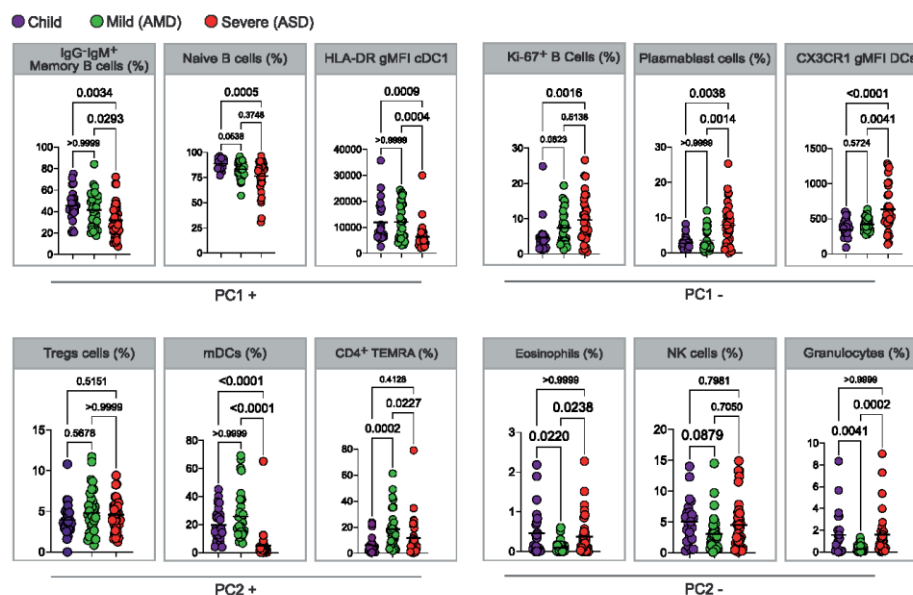


Fig. 2 Analysis of variance of the main variables contributing to principal components. **A, B** Kruskal–Wallis tests comparing values of each of the three immune variables that presented the highest influences—either positive (**A**) or negative (**B**) for PC1, PC2 and PC3. Each dot represents a patient, color coded: children—purple, adult with mild disease—green, and adult with severe disease—red. P values are indicated over brackets, the horizontal bar representing the mean. Source data are provided as a Source Data file.

and not on the differences among groups for those variables alone.

Findings in PCA for the DCs signature (Fig. 3C) indicated that children were significantly separated from ASD, but not from AMD, with lower scores for PC1 (mostly CX3CR1 expression in DCs) and higher scores for frequencies of DCs (Fig. 3C). HLA-DR expression in DCs subpopulations constituted negative contributions for PC1. This indicated that children, as well as AMD, would have more DCs than ASD, high in HLA-DR and low in CX3CR1. That was confirmed by the KW analysis of the three groups (Fig. 3C). Spearman correlation analysis (Fig. 3D) evidenced that CX3CR1 expression was negatively correlated with HLA-DR expression. These results suggested that high DCs frequencies in blood, with low CX3CR1, but high HLA-DR expression could be involved, or at least serve as markers, for mild disease. Conversely, low DCs frequencies, with high CX3CR1 expression, could be associated with more severe disease.

PCA for the clusters involving adaptive cells variables was performed next and are shown in Supplementary Fig. 3. B cells (Supplementary Fig. 3A, Supplementary Table 1) and T cell activation/proliferation (Supplementary Fig. 3B, Supplementary Table 1) PCA corroborated a general pattern of response in children, either separating from the other groups (only sometimes grouping with AMD, apart from ASD). KW analysis of mean scores for each PC showed that in some cases children presented some significant differences from AMD. For example, PC1 of B cells recapitulated findings from the first analysis, mainly positively influenced for IgM⁺ B cells and naive cells, and showed children with significantly higher scores, compared to mild and ASD ($p < 0.01$). Children were grouped with AMD ($p = 0.1599$), and apart from ASD ($p < 0.0001$), regarding PC1 of

T cell activation/proliferation (Supplementary Fig. 3B). The ASD had the highest scores for this PC, highly influenced by activated and proliferating CD4⁺ and CD8⁺ T cells, suggesting that adults with severe disease were characterized by higher frequencies of activated, Ki67⁺ T cells, and the opposite would be observed for children and AMD—though this was not always corroborated by the KW analysis. Finally, PCA for T cell memory clustered variables showed a trend to separate the three groups (Supplementary Fig. 3C). PC1 scores, strongly positively influenced by naive T cells, but negatively influenced by effector memory T cells (TEM), significantly separated children from AMD ($p = 0.0005$), and these somewhat separated from ASD ($p = 0.0410$), indicating children and AMD would have lower frequencies of TEM and higher frequencies of naive T cells compared to ASD. Terminally differentiated memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells (TEMRA) were strong positive influences for PC2, while expression of CD69 and CD137 in TEM cells negatively influenced PC2. Children and AMD, with high scores for PC2, did not differ from each other, suggesting they would both be characterized by higher frequencies of TEMRA (especially CD4⁺ TEMRA) cells than ASD, which in turn would have higher frequencies of activated, CD69⁺, CD137⁺, TEM cells. Confirmations of the interpretations of these PCs were again sought in the KW analysis for individual variables next to each PCA result (Supplementary Fig. 3C), and in Supplementary Fig. 4—which compiles all the remaining variables KW analyses results. This led us to note that for TEMRA, children differed from AMD and not from ASD. CD45RA, a marker upregulated both in naive and TEMRA cells, has been reported to show varied expression during the generation of memory pools of chronic infections¹⁹ as well as in response to vaccination²⁰. CD4⁺ TEMRA cells associated with

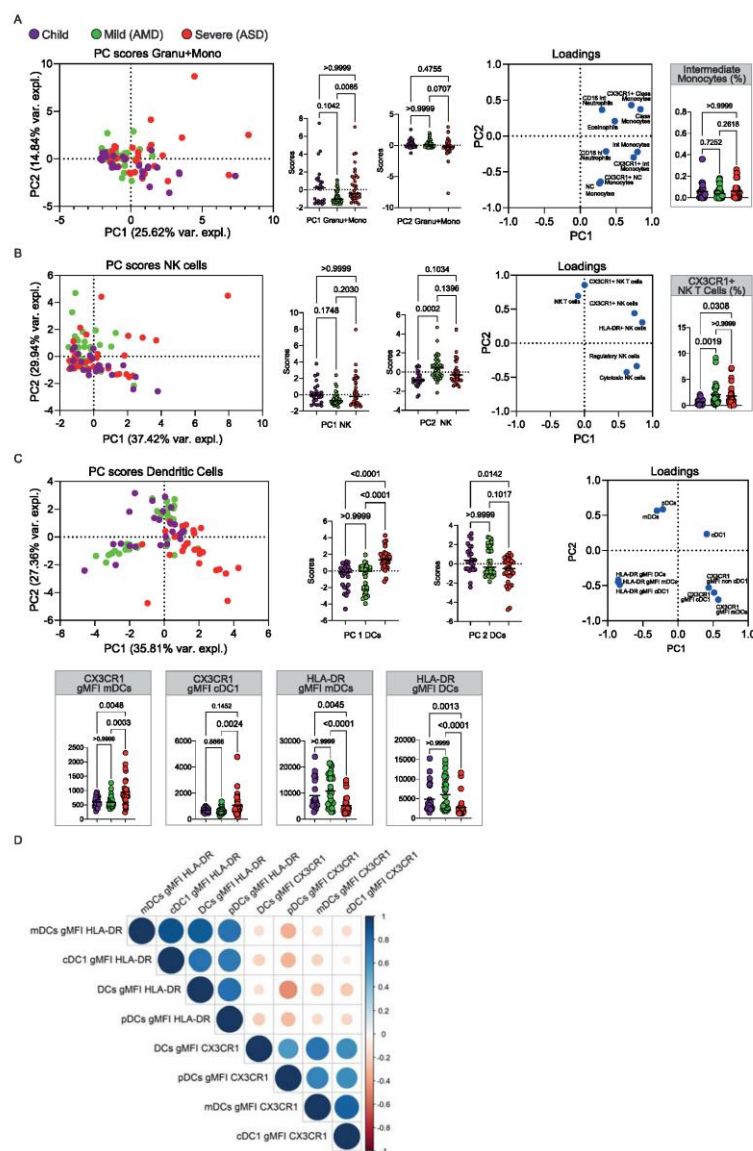


Fig. 3 Principal Component Analysis of innate cells immune signatures. A–G Principal component analysis of the clusters of patients (each dot representing a patient color coded), according to the immune signatures (**A** Granu+Mono, Granulocytes and Monocytes; **B** NK cells; **C** Dendritic Cells; **D** Spearman correlation analysis of HLA-DR and CX3CR1 expression in DCs. For each signature, are displayed the PCA plot of PC1xPC2, the differences in scores of individuals for each PC; the loadings of the main variables contributing to each PC and Kruskal–Wallis tests comparisons of the scores of the major contributing variables values for each group of patients. *P* values are indicated over brackets, the horizontal bar representing the median for scores; and the mean for percentages and gMFI. Source data are provided as a Source Data file.

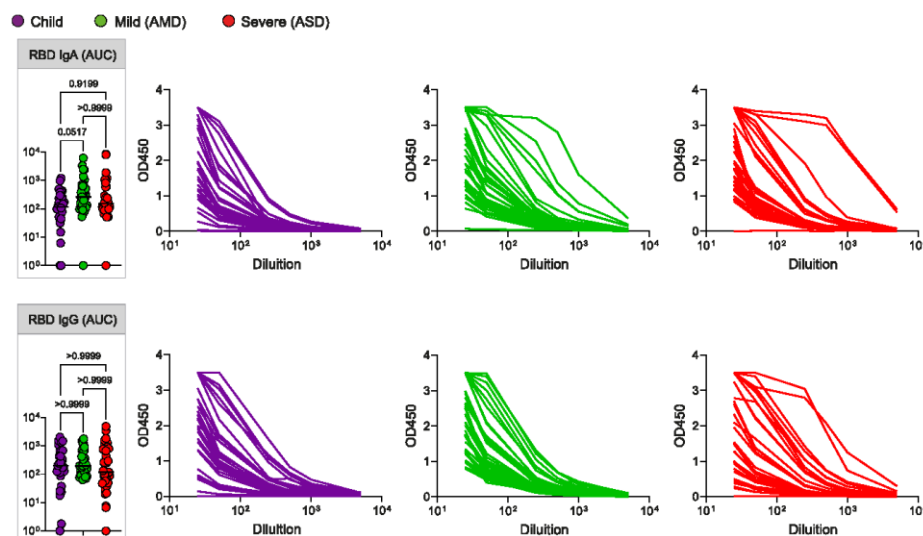


Fig. 4 Antibody responses. SARS-CoV-2 spike RBD IgA and IgG antibody titers determined by ELISA using serial dilutions of plasma. Individual titration curves for individuals (represented by a line, color coded) and analysis of variance (Kruskal-Wallis) of the values calculated as the area under the curve (AUC) for IgA (**A**) and IgG (**B**) are displayed. *P* values are displayed over brackets, the horizontal bar representing the median. Source data are provided as a Source Data file.

protection in dengue²¹. Thus, the PCA could indicate possible differences for children and AMD, compared to ASD, in pathways for the generation of memory. In the KW comparisons, CD4⁺ TEMRA cells were lower in children than in AMD, and only AMD differed from ASD significantly. For central memory T cells (TCM), there were no differences among groups (Supplementary Fig. 4A). Altogether, the patterns revealed by PCA indicated that children have higher frequencies of non-specific antigen inexperienced B and T cells and DCs, with high HLA-DR and low CX3CR1 expression. In some cases, children and AMD shared not only a mild presentation of the disease but also a similar immune profile. The immune profile of ASD was characterized by higher frequencies and markers of T and B cell activation and proliferation, TEM cells, and lower DCs with high expression of CX3CR1. Finally, we investigated the production of inflammatory plasma cytokines (Supplementary Fig. 4B). Mostly, only subjects with severe disease showed, at least on average, significant higher levels of detectable cytokines in blood, except for IL-4, which was increased in children compared to AMD.

SARS-CoV-2 specific T cells and antibodies responses in children are comparable to the ones of adult patients. The characteristics of the non-specific immune profile of children led us to ask if they had effectively formed SARS-CoV-2 specific responses upon infection. Seroconversion after infection with SARS-CoV-2 patients with all forms of the disease has been described by several studies—reviewed in²². Antibodies to the S protein, and more specifically to the RBD of this protein, are clinically considered a hallmark of infection, and frequently proposed as a correlate of protection. We thus compared children, AMD, and ASD for their RBD specific—IgA and IgG titers. On average, children presented levels of both IgG and IgA comparable to the adult patients

(Fig. 4). In our cohort, although some individuals from the ASD group presented higher levels of antibodies, differences among the groups were non-significant. Our results revealed that, even though children presented a generally naïve, non-activated, immune profile, they had efficiently generated SARS-CoV-2 specific antibody responses, in levels that did not differ from the ones in AMD ($p < 0.103$ for IgA; $p > 0.999$ for IgG) or ASD ($p < 0.916$ for IgA; $p > 0.999$ for IgG) COVID-19 patients.

We next asked if children had generated specific effector T cell responses to SARS-CoV-2. There are four structural proteins in SARS-CoV-2: the spike glycoprotein (S), the envelope (E) protein, the membrane (M) protein, and the nucleocapsid (N) protein. Specific effector T cell responses have been described in adult COVID-19 patients, both with mild and severe disease^{23,24}, however fewer studies have focused on specific immune responses in pediatric patients infected with SARS-CoV-2. We measured the frequencies of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells expressing tumor necrosis factor (TNF), gamma-interferon (IFN γ), or interleukin-17 (IL-17) in response to stimulation by peptide pools of the S, N, and M proteins of the virus (Fig. 5). Figure 5A shows representative flow cytometry plots of cytokine-producing CD4⁺ or CD8⁺ T cells upon stimulation with SARS-CoV-2 peptide pools. Negative (DMSO) and positive (PMA + ionomycin) control representative plots can be seen in Supplementary Fig. 5. Children presented detectable CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses upon stimulation with all three peptide pools (Fig. 5B). When we compared types of responses in each group for the different peptide pools, children showed a significantly higher TNF⁺CD8⁺ T response for the M ($p < 0.005$) and for the N ($p < 0.0409$) peptide pools than for the S pool (5B, upper right panel). This was not seen in adults, and although there was a trend for lower CD4⁺TNF⁺ responses in children, it was not significant. Supplementary Fig. 6 shows the responses compared

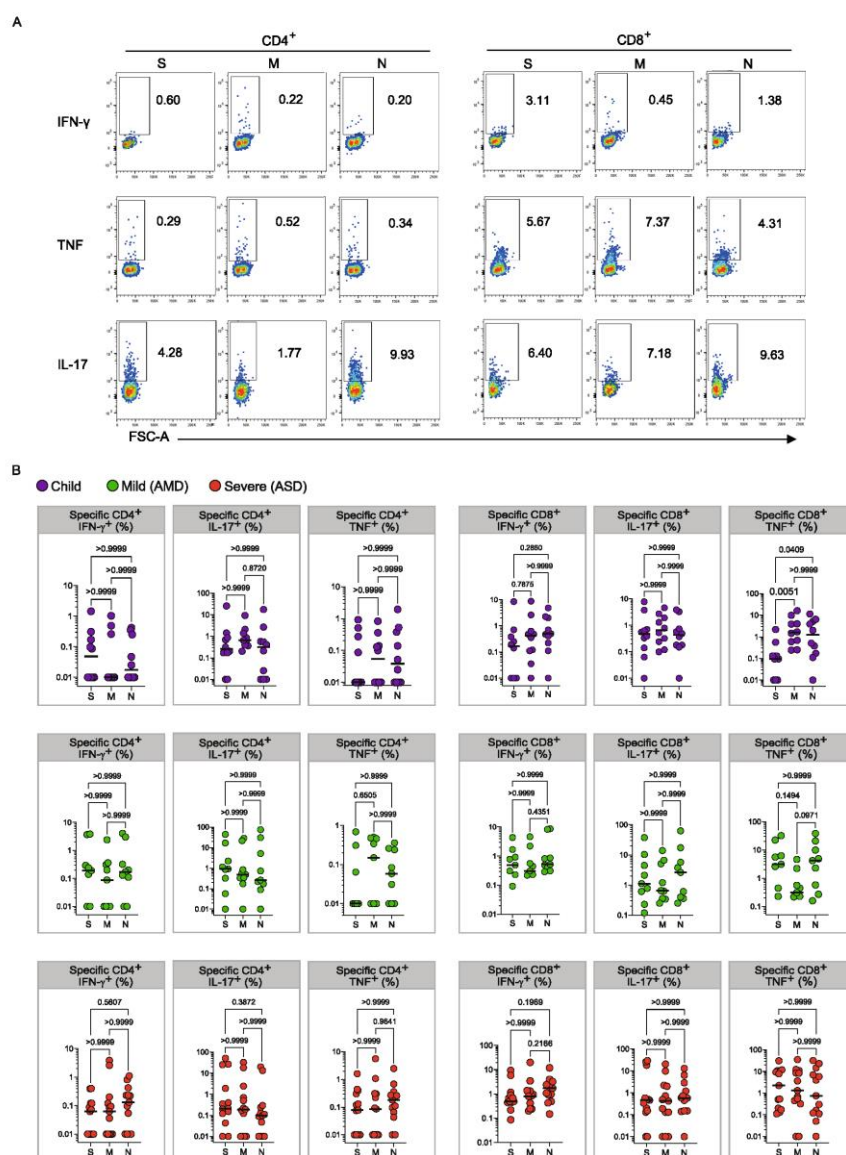


Fig. 5 Specific T cell responses. **A** Gating strategies and typical plots of CD4⁺ and CD8⁺ T cells stimulated with peptide pools from structural proteins spike (S), membrane (M) and nucleocapsid (N), and analyzed by flow cytometry for cytokine production. **B** Comparisons of effector T cells in each group—percentages of CD4⁺ or CD8⁺ cells, producing IFN γ , TNF or IL-17 in response to stimulation by each peptide pool. Each dot represents a patient, color coded: purple for children; green for adults with mild disease and red for adults with severe disease. All analyses are Kruskal-Wallis tests, and the *p* values are indicated over brackets (*n* children = 10, *n* AMD = 9, *n* ASD = 13). Significant differences are indicated by *p* values in a higher font, the horizontal bar representing the median. Source data are provided as a Source Data file.

among the groups. About 30% of individuals—of all groups—did not show responding CD4⁺ T cells to the peptide pools; a higher frequency of individuals did not respond to the S pool compared to the M and N pools. In the ones that responded, CD4⁺ IL-17⁺ T cell responses were higher for all three peptide pools (about 1 log higher than IFN γ and TNF CD4⁺ T cell responses). CD8⁺ T cell responses were, in general, more robust, although for S and M peptide pools there were still some individuals, though fewer, that did not respond to stimulation. The absence of response, in our sample, did not correlate with the early time of collection, as reported by¹⁹. TNF⁺CD8⁺ T cell responses were about 1 log higher than what was detected for CD4⁺ T cells, for all peptide pools (Supplementary Fig. 6). The IL-17⁺CD4⁺ T cell responses to stimulation by all three pools were higher than the TNF⁺CD4⁺ and IFN γ ⁺CD4⁺ for all three groups. The differential TNF⁺ cytotoxic response to M and N peptides seen in children led us to investigate levels of anti-N antibodies. Children made strong anti-N IgG levels, not different from AMD and ASD (Fig. 6A). Anti-RBD IgA, but not IgG levels, correlated positively with CD4⁺ IFN γ ⁺ responses (Fig. 6B). Interestingly, the TNF⁺ cytotoxic responses to M and N peptide pools were inversely correlated with levels of anti-RBD and anti-N antibodies (Fig. 6B). Anti-N antibody levels correlated positively with anti-N CD4⁺ IFN γ ⁺ responses (Fig. 6B). Taken together, these results indicate that children do generate specific humoral and effector cell responses upon infection with SARS-CoV-2, with a differential, higher cytotoxic response against proteins M and N, not associated with antibody responses to the spike protein.

Discussion

It is clear from our study as well as from others²⁵ that children do get infected by SARS-CoV-2, and thus possibly contribute to the community-based spread of the virus, contrary to what is suggested by studies on the low nasal ACE2 expression in children²⁶. The lower rates of infection in children can be biased by lower testing, as pointed out by²⁷, and should be more carefully studied, given its importance for planning school openings. Our findings on the more naïve, non-specific lymphocyte profile presented by in children, if taken isolated from the other results in this study, may indicate that a naïve immune system does better than an old one, as has been suggested⁹ and that children would be better equipped to mount fast and efficient immune responses to rapidly clear the virus. However, a prediction from this hypothesis is that children would be more likely to present mild forms of all viral diseases, and this is not the case. While milder manifestations are observed in Middle East respiratory syndrome (MERS), SARS, and varicella, the opposite is observed for infection with poliovirus, and respiratory viruses, especially influenza and respiratory syncytial virus (RSV) - reviewed in⁶.

Our data indicate that not only the adaptive but also their innate immune system has characteristics that enable children to mount an immune response that controls the infection. The differences observed for dendritic cells might offer an important clue. DCs play crucial roles in initiating and shaping the adaptive response, and subpopulations of DCs, especially pDC, are determinant for the generation of efficient antiviral responses, being one of the main sources of type I interferon²⁸. A previous study in COVID-19 adult patients indicated decreased activation and numbers of DCs²⁹. In our study, children consistently show higher frequencies of DCs, including pDC, compared to adults. High HLA-DR expression is characteristic of mature DCs; as they become activated by engagement of pattern recognizing receptors, HLA-DR first increases, and then decreases as DCs migrate to draining lymph nodes^{28,30}. Low HLA-DR expression in children is associated with immune suppression⁴ and acute inflammatory conditions³¹.

The inverse correlation of HLA-DR with CX3CR1 in DCs is intriguing. CX3CR1, also known as the fractalkine receptor, is considered a homing marker for inflamed tissue and plays a role in pathology in Japanese virus-induced encephalitis³² and peritoneal vasculitis in a sepsis model³³. The high levels of HLA-DR in children's DCs indicate that their cells are not poorly activated, but mature and able to generate efficient immune responses. Heinonen et al. integrated blood transcriptomics and cell profiling with clinical data in a cohort of 190 children with RSV and found low HLA-DR in monocytes to be associated with severe disease³⁴. The low expression of CX3CR1 in our samples suggests that children's DCs are not targeted to inflamed sites, as they seem to be in ASD. Our results indicate that expression of CX3CR1 in circulating DCs could associate, or serve as a marker for, pathological mechanisms in severe COVID-19, suggesting that inflammation to specific sites such as the lung may be affected by age, and that low CX3CR1 expression in DCs might favor the generation of antiviral responses. Loske et al.³⁵, in a single-cell transcriptomics profile of nasal samples, suggested a pre-activated state of the antiviral innate immune cells in children - DCs expressing higher levels of MDA5 and RIG I, two pattern recognition receptors relevant for antiviral responses. Also, children showed a KLRG1-expressing population of memory CD8⁺ T cells. Both data concur with our findings, which support a role for potentially responsive DC and effector cytotoxic T cell populations in the differential, possibly protective, immune response in children that is associated with milder disease.

Pediatric patients in our sample presented SARS-CoV-2 specific antibodies and T cell responses in levels comparable to adult patients. The higher TNF⁺CD8⁺ responses for the M and N proteins could be associated with a protective response in children. The M protein is the most abundant structural protein on the surface of the virus³⁶, potentially constituting an important target of immune responses. A study by Thieme et al. found anti-M CD4⁺ T cells as the highest T cell response in critical COVID-19 patients³⁷. In that study, CD4⁺ T, rather than CD8⁺ T cell immunity to SARS-CoV-2 proteins dominated the response in severe and critical patients, indicating that a robust CD4⁺ T cell response to these antigens did not correlate with protection. The nucleocapsid (N) protein is structural, abundantly produced upon infection, and highly conserved among beta coronaviruses³⁸. It was a major target for early B cell responses in the SARS epidemic of 2003³⁹. Recent studies^{18,40} found strong anti-N T cell responses in SARS-CoV-2 patients, and in individuals who recovered from SARS, supporting a relevant role for structural N protein as an immune target in SARS-CoV-2 infection. We found robust antibody responses in children both against the S RBD and N protein, while Weisberg et al.⁹ found antibodies to the S, but not the N protein; and Cohen et al.⁴¹ found lower responses in children in general. These differences, as well as a lower response to the S protein in general in our sample, may reflect differences in HLA between American and Brazilian populations, or even a difference in immunization history, given a tradition in vaccination programs for children in Brazil. The correlations of antibody responses with CD4⁺ T cells are somewhat expected, given the help needed for antibody production, and indicate that these responses are somewhat coordinated, but also that not all antibodies produced are linked to TNF or IFN γ help. The inverse correlation between specific CD8⁺ T cell responses and antibodies may indicate a relevant role for cytotoxic immunity against SARS-CoV-2, beyond antibody production.

A hypothesis frequently raised to explain milder disease in children with COVID-19 is that the presence of neutralizing antibodies to such viruses could cross-protect them upon infection with SARS-CoV-2. However, a recent study in adults found no evidence of cross-protection associated with levels of these antibodies⁴². Alternatively, protection could be conferred

not by cross-reactive antibodies, but rather by pre-existing N-protein-specific T cells. Most studies—and most vaccines—have so far focused on protection against SARS-CoV-2 infection by antibodies to the spike protein. Both screen studies by Ferretti et al.⁴⁰ and Ng et al.¹⁰ indicated that T cell immunity to SARS-CoV-2 infected individuals includes many targets outside the spike protein and that they are not conserved among coronaviruses that cause the common cold. These findings agree with the ones of the Le Bert study²⁴. Our results support that the role of T cell responses to the N protein must be further investigated, with a more detailed T cell epitope mapping. Such work might reveal additional correlates of protection, and/or epitopes to add in the next generation of COVID-19 vaccines. A recent report⁴³ indicated that T cell immunity was not markedly affected, so far, by the emergence of new variants, supporting the identification of T cell epitopes to be added to the next vaccines.

10

project started, COVID-19 numbers in Brazil were still not high and the frequency of MISC patients or children with severe manifestations of the disease was still too low to include. The study on this cohort is still ongoing, with two more points of sample collection. We expect that further analysis of our data, as well as other studies, on immune profile data and specific responses, will bring relevant information on the generation of immune memory in pediatric COVID-19.

Methods

Ethics statement. This study was approved by the Institutional Review Board (IRB 30749720.4.1001.5330) at Hospital Moinhos de Vento and Ethics Committee from Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (CEP-UFCSA) (CAAE 30749720.4.3001.5345). Informed consent was obtained from all participants or their legal guardians. The study was conducted according to good laboratory practices and following the Declaration of Helsinki.

Patients. A prospective cohort study was carried out at Hospital Moinhos de Vento and at Hospital Restinga e Extremo Sul, both in Porto Alegre, southern Brazil. A convenience sample of adults and children older than 2 months were enrolled from June to December 2020 at either the outpatient clinics (OPC), emergency rooms (ER), or hospitalized. Subjects were screened if presenting cough and/or axillary temperature $\geq 37.8^\circ\text{C}$ and/or sore throat. Both blood samples and respiratory samples collected through nasopharyngeal swabs were obtained at enrollment. Only patients with the clinical diagnosis of COVID-19 and SARS-CoV-2 infection confirmed by RT-PCR were included in the study. Clinical and demographic data were collected at inclusion, following a standardized protocol. Disease severity was classified according to the World Health Organization classification following a standardized protocol. Disease severity was classified accordingly after completing the follow-up questionnaire¹⁶.

SARS-CoV-2 RT-qPCR. A qualitative RT-PCR assay to SARS-CoV-2 was performed for all participants. Bilateral nasopharyngeal and oropharyngeal swabs were collected and placed in the same transport medium with saline solution and RNAlater[®], RNA Stabilization Solution (Catalog number AM7021, Invitrogen[™]), MagMax[™] Viral/Pathogenic Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems) was used to extract viral RNA in the KingFisher Duo Prime System (ThermoFisher, USA) automated platform. The RT-PCR assay was performed in 10 μL total reaction, using Path[™] 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (catalog number A15299, Applied Biosystems) and TaqMan[™] 2019-nCoV Assay Kit v1 (catalog number A47532, Applied Biosystems) which comprises the SARS-CoV-2-specific targets (gene ORF1ab, gene S and gene N). As reaction control, we used 5 μL (200 copies/ μL) of the TaqMan[™] 2019-nCoV Control Kit v1 (catalog number A47533, Applied Biosystems). QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, USA) was used to perform the PCR.

PBMC isolation and cryopreservation. Blood was collected in EDTA tubes (Firstlab, PR, Brazil) and stored at room temperature before processing for PBMC isolation and plasma collection. Plasma was separated by centrifugation and cryopreserved. PBMCs were next isolated by density-gradient centrifugation using Ficoll-Paque[™] PLUS (GE Healthcare[®]), and either studied directly or resuspended in fetal bovine serum (FBS) 5% DMSO and stored in liquid nitrogen until use.

Flow cytometry. Cells were thawed by diluting them in 5 mL pre-warmed complete RPMI1640 medium (Sigma-Aldrich - R8758) containing 5% FBS and spun at 1500 rpm for 5 min. Supernatants were carefully removed, and cells were resuspended in PBS. After, were stained with the BD Horizon[™] Fixable Viability Stain 510 together with antibodies for surface markers, as follows: anti-CD3-APC-H7 (clone SK7), anti-CD24-APC-H7 (clone ML5), anti-HLA-DR-APC-H7 (clone G46-6), anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (clone RPA-T4), anti-CD27-PerCP-Cy5.5 (clone M-7271), anti-CD11c-PerCP-Cy5.5 (clone B-Jy6), anti-CD14-PerCP-Cy5.5 (clone M52), anti-CD8-FITC (clone HIT8a), anti-IgG-FITC (clone G18-145), Lineage 2-FITC (cat. 643397), anti-CD16-FITC (clone 3G8), anti-CXCR5 (CD185)-BB515 (clone RF882), anti-CD19-APC (clone HB19), anti-CD127-Alexa 647 (clone HIL-7R-M21), anti-CX3CR1-Alexa647 (clone 2A9-1), anti-CD69-APC (clone FN50), anti-CD38-PE (clone HIT2), anti-ICOS (CD278)-PE (clone DX29), anti-CD141-PE (clone L44), anti-CD66-PE (clone G10F5), anti-CD137 (4-1BB)-PE (clone 4B4-1), anti-HLA-DR-PE-Cy7 (clone G46-6), anti-CD19-PE-Cy7 (clone SJ25C1), anti-CD25-PE-Cy7 (clone 2A3), anti-CD45RA-PE-Cy7 (clone L48), anti-IgM-BV421 (clone G20-127), anti-PD-1 (CD279)-BV421 (clone MIH4), anti-CCR7-BV421 (clone V24-785), anti-CD56-BV421 (clone NCAM 16), anti-CCR7-BV421 (clone 2-L1-A) antibodies. For intracellular staining, cells were first stained for surface markers and subsequently fixed and permeabilized using the Transcription Factor Buffer Set (BD Biosciences-Pharmingen, USA), then stained with anti-Ki-67-BV421 (clone B56), anti-Perforin-Alexa 647 (clone 8G9), and anti-Granzyme B-BV421 (clone GB11) antibodies. Following in vitro stimulation assays with specific peptides, cells were stained with the BD Horizon[™] Fixable Viability Stain 510 and

anti-CD3-PE-Cy7 (clone SK7), anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (clone RPA-T4), anti-CD8-APC-H7 (clone SK1), anti-CCR7-BV421 (clone 2-L1-A), and subsequently fixed and permeabilized using the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences-Pharmingen, USA), then stained with anti-IFN γ -FITC (clone 4.SB3), anti-TNF (clone MAb11) and anti-IL-17-PE (clone SCPL1362) antibodies. Antibody dilutions are available in supplementary Table 2. All samples were analyzed using BD Biosciences - FACSCanto II and FlowJo 10.7.1 software.

Th1/Th2/Th17 cytokine measurements. The concentration of seven cytokines, IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17A in serum were measured using a commercial BD CBA Human Th1/Th2/Th17 cytokines kit (cat 560484, BD Inc., USA). Briefly, a mixture of seven capture beads (with distinct fluorescent intensities) coated with capture antibodies specific for each cytokine and a phycoerythrin (PE) detection reagent were used as the manufacturer's instruction. Then, samples (plasma) were heat-inactivated at 56°C for 60 min) were acquired and measured on the BD FACS Canto II flow cytometer and analyzed by FCPA Array software 3.0. Individual cytokine concentrations were indicated by their fluorescent intensities. The value of each cytokine was normalized by the limit of detection.

In vitro T cells stimulation assays. PBMC were thawed, assayed for viability, counted, and plated in 96-well plates at 3×10^5 PBMCs/mL, 100 μL /well in RPMI1640 medium (Sigma-Aldrich - R8758) supplemented with 10% FBS (100 IU of penicillin/mL, 100 μg of streptomycin/mL (Lonza, Belgium) and 2 mM L-glutamine (Lonza, Belgium) (R10H medium), and subsequently stimulated with peptide PepTivator SARS-CoV-2 Prot S (130-126-700 - Miltenyi Biotec, Germany), PepTivator SARS-CoV-2 Prot N (130-126-698 - Miltenyi Biotec, Germany) and PepTivator SARS-CoV-2 Prot M (130-126-702 - Miltenyi Biotec, Germany) at 1 μg /mL. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA/50 ng/mL, Sigma, USA) plus ionomycin (1 μg /mL, Cayman chemical company, USA) and DMSO were used as positive and negative controls for stimulation, respectively. Stimulation with a cytomegalovirus (CMV) peptide pool at 2 μg /mL (Mabtech, Sweden) was also performed, as a positive control for the assay. All treatments were submitted for 18 h at 37°C and 5% CO_2 , 3 h before harvesting. Golgi Plug (BD Biosciences, USA) 1 μg /mL was added to each well. Cells were stained and analyzed for phenotype as described above.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plasma was tested for IgG and IgA antibodies to S-RBD protein (#RP-87678 - Invitrogen, USA) and N protein (kindly provided by Dr. Ricardo Gazinelli - Fiocruz Belo Horizonte, Brazil) using a protocol described in¹⁷. Briefly, ELISA plates (Kasvi, Brazil) were coated overnight with 1 μg /mL of SARS-CoV-2 Spike Protein (S-RBD; Catalog nr. RP-87678 - Invitrogen). On the following day, plates were blocked for 1 h at room temperature with blocking buffer (3% skim milk powder in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20). Plasma samples were heat-inactivated at 56°C for 60 min and then serially diluted in 1% milk in 0.05% PBS-Tween 20 starting at a 1:25. Plasma was incubated for 2 h at 37°C . Secondary antibodies were diluted in 0.05% PBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature. For both IgG, anti-human peroxidase produced in rabbit (#C-1H01 - Rhea Biotec, Brazil), and IgA, anti-human peroxidase produced in goat (#A18781 - Invitrogen, USA), was used at a 1:10,000 dilution. The assay was developed with TMB Elisa Substrate - High Sensitivity (Abcam, United Kingdom) for 30 min, and the reaction stopped with 1 M chloric acid. Readings were performed in an ELISA reader (Biochrom EZ 400), and O.D. at 450 nm was used to calculate the area under the curve (AUC), using a baseline of 0.07 for peak calculation¹⁸.

Statistics and systems analysis. Percentages were used to describe categorical variables. Pearson's Chi-square test was used to evaluate proportions among children, AMD and ASD. Data normality assumptions were verified for continuous variables and summarized in terms of the median and interquartile range (IQR). A two-tailed Kruskal-Wallis (KW) test followed by Benjamini-Hochberg correction for multiple comparisons was used to compare p-values among the groups. Principal Component Analysis (PCA) was employed to reduce the dimensions of 78 immunological variables generated by flow cytometry analysis, to explain the total variability with a smaller, new set of variables. Spearman correlations were performed between all variables (every set of two variables) and within sets of variables to identify clusters of correlated variables. In PCA of the variables grouped in clusters, variables containing redundant information were excluded. Comparison among groups regarding single variables or PC values was performed by non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by 2 by 2 multiple comparisons with p-values adjusted accordingly. Analyses were performed either in GraphPad Prism v.9 or R and sometimes confirmed in Python. Hierarchical clustering analysis was performed using R and a dendrogram was created for the COVID-19 patients using Canberra as the distance measure and Ward's (ward.D) as agglomeration method. The heights used to merge clusters were manually defined.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files or from the corresponding authors on reasonable request. Source data are provided with this paper.

Received: 16 April 2021; Accepted: 1 November 2021;
Published online: 25 November 2021

References

- Zhou, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* **395**, 1054–1062 (2020).
- World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/> (2021).
- Bialek, S. et al. Severe outcomes among patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) — United States, February 12–March 16, 2020. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **69**, 343–346 (2020).
- Zimmermann, P. & Curtis, N. COVID-19 in children, pregnancy and neonates: a review of epidemiologic and clinical features. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **39**, 469–477 (2020).
- Cheung, E. W. et al. Multisystem inflammatory syndrome related to COVID-19 in previously healthy children and adolescents in New York city. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **324**, 294–296 (2020).
- Singh, T. et al. Lessons from COVID-19 in children: key hypotheses to guide preventative and therapeutic strategies. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 2006–2013 (2020).
- Zimmermann, P. & Curtis, N. Why is COVID-19 less severe in children? A review of the proposed mechanisms underlying the age-related difference in severity of SARS-CoV-2 infections. *Arch. Dis. Child.* **1–11**, <https://doi.org/10.1136/archdischild-2020-320338> (2020).
- Schouten, L. R. et al. Age-dependent differences in pulmonary host responses in ARDS: a prospective observational cohort study. *Ann. Intensive Care* **9**, <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0529-4> (2019).
- Weisberg, S. P. et al. Distinct antibody responses to SARS-CoV-2 in children and adults across the COVID-19 clinical spectrum. *Nat. Immunol.* **22**, 25–31 (2021).
- Ng, K. W. et al. Pre-existing and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science* **334**, 1339–1343 (2020).
- Davis, B. M. et al. Human coronaviruses and other respiratory infections in young adults on a university campus: prevalence, symptoms, and shedding. *Influenza Other Respi. Viruses* **12**, 582–590 (2018).
- Grifoni, A. et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* **181**, 1489–1501.e15 (2020).
- Hartley, G. E. et al. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci. Immunol.* **5**, 1–15 (2020).
- Lucas, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* **584**, 463–469 (2020).
- Rodda, L. B. et al. Functional SARS-CoV-2-specific immune memory persists after mild COVID-19. *Cell* **184**, 169–183.e17 (2021).
- World Health Organization. WHO COVID-19: case definitions: updated in public health surveillance for COVID-19. (2020).
- Amanat, F. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* **26**, 1033–1036 (2020).
- Stadlbauer, D. et al. SARS-CoV-2 seroconversion in humans: a detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr. Protoc. Microbiol.* **57**, 1–15 (2020).
- Champagne, P. et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**, 106–111 (2001).
- Miller, J. D. et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* **28**, 710–722 (2008).
- Weiskopf, D. et al. Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E4256–E4263 (2015).
- Huang, A. T. et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat. Commun.* **11**, 1–16 (2020).
- Mathew, D. et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. *bioRxiv* **8511**, 1–29 (2020).
- Le Bert, N. et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* **584**, 457–462 (2020).
- Dong, Y. et al. Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics* **145**, e20200702 (2020).
- Bunyavanich, S., Do, A. & Vicencio, A. Nasal gene expression of angiotensin-converting enzyme 2 in children and adults. *JAMA* **323**, 2427 (2020).
- Hyde, Z. COVID-19, children and schools: overlooked and at risk. *Med. J. Aust.* **213**, 444 (2020).
- Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259–262 (2001).
- Zhou, R. et al. Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses. *Immunity* **53**, 864–877.e5 (2020).
- Steinman, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 1–22 (2012).
- Boeddha, N. P. et al. HLA-DR expression on monocyte subsets in critically ill children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **37**, 1034–1040 (2018).
- Choi, J. Y. et al. Indispensable role of CX3CR1+ dendritic cells in regulation of virus-induced neuroinflammation through rapid development of antiviral immunity in peripheral lymphoid tissues. *Front. Immunol.* **10**, 1467 (2019).
- Hamon, P. et al. CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. *Blood* **129**, 1296–1307 (2017).
- Heinonen, S. et al. Immune profiles provide insights into respiratory syncytial virus disease severity in young children. *Sci. Transl. Med.* **12**, eaaw0268 (2020).
- Loske, J. et al. Pre-activated antiviral innate immunity in the upper airways controls early SARS-CoV-2 infection in children. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01037-9> (2021).
- Hu, Y. et al. The M protein of SARS-CoV: basic structural and immunological properties. *Genomics. Proteom. Bioinformatics* **1**, 118–130 (2003).
- Thieme, C. J. et al. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 patients. *Cell Rep. Med* **1**, 100092 (2020).
- De Wit, E., Van Doremalen, N., Falzarano, D. & Munster, V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 523–534 (2016).
- Wu, H.-S. et al. Early detection of antibodies against various structural proteins of the SARS-associated coronavirus in SARS patients. *J. Biomed. Sci.* **11**, 117–126 (2004).
- Perretti, A. P. et al. Unbiased screens show CD8+ T cells of COVID-19 patients recognize shared epitopes in SARS-CoV-2 that largely reside outside the spike protein. *Immunity* **53**, 1095–1107.e3 (2020).
- Cohen, C. A. et al. SARS-CoV-2 specific T cell responses are lower in children and increase with age and time after infection. *medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci.* <https://doi.org/10.1101/2021.02.02.21250988> (2021).
- Anderson, E. M. et al. Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection. *Cell* **1858–1864**, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.010> (2021).
- Tarke, A. et al. Negligible impact of SARS-CoV-2 variants on CD4+ and CD8+ T cell reactivity in COVID-19 exposed donors and vaccinees. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* <https://doi.org/10.1101/2021.02.27.433180> (2021).

Acknowledgements

Funding for this study was provided by PROADI - HMV, and the Ministry of Health; fellowships for Karina Lima, Julia Fontoura, Renato Stein, and Cristina Bonorino are from CNPq; fellowships for Gabriel Hilario, Priscila Oliveira de Souza, and Tiago Fazole are from CAPES. TJB is a recipient of an American Heart Association fellowship grant. We wish to thank Drs. André Báfica, Daniel Mansur, Leo Riella, Graham Pawelec and Steve Hedrick for critical readings of this manuscript. Marli Terezinha Crispim for assistance in figure editing. Caroline Nespolo de David for assistance in project management, and the COVIDa consortium (A full list of consortium members appears in Supplementary Note 1). Finally, we wish to thank all the patients who accepted to enroll in the study and donate blood.

Author contributions

T.F., K.L., P.O.S. and J.C.F. all designed and performed experiments, analyzed data, wrote and edited the manuscript. G.H., R.Z., V.N.P., J.C.F.N., A.F.H., I.G., A.C.O. and R.S.M. assisted in experiments. M.B.B.G. performed computational analysis. R.B.G. assisted in flow cytometry analysis and interpret the results. L.D.C., A.B. and R.E.M. helped with data collection. S.M.C.J. coordinated all statistical analysis; L.T.S.S. helped in statistical analysis. L.R.J. helped design the study and edited the manuscript. G.O.Z., I.R.F., F.H.V. and M.P.B. helped collect patients' samples and performed RT-PCR analysis. C.S.G. helped collect patients' samples. H.L.N. performed clustering analysis. T.J.B. helped design the study, analyzed data and edited the manuscript. M.S.C.C., J.A.S. assisted with epidemiological information. M.C.S. and R.T.S. coordinated the cohort, conceived and designed the study, wrote and edited the manuscript. C.B., conceived and designed the study, performed data analysis, performed principal components analysis, wrote and edited the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27120-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Cristina Bonorino.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

ANEXO D – COAUTORIA DE ARTIGO 2 (PROJETO COVIDa*)

*Projeto desenvolvido junto ao Laboratório de Imunoterapia durante a pandemia da COVID-19.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Yi-Hao Chan,
The Rockefeller University,
United States

REVIEWED BY
Welli Xu,
Rutgers Biomedical and Health
Sciences, Rutgers, The State University
of New Jersey, United States
Siew-Wai Fong,
A*STAR Infectious Disease Labs,
Singapore

*CORRESPONDENCE
Cristina Bonorino
cristinabonorino@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 31 August 2022
ACCEPTED 03 October 2022
PUBLISHED 02 November 2022

CITATION
Lima K, Fontoura JC, de Souza PO,
Fazolo T, Hilario G, Zorzetto R,
Rodrigues Junior LC, Coimbra LD,
Borin A, Bispo-dos-Santos K, Granja F,
Marques RE, Zavaglia GO,
Fernandes IR, Varela FH,
Polese-Bonatto M, Tonini ML,
Ikeda do Carmo GM, de Almeida WAF,
Borges TJ, Nakaya HI,
Proença-Modena JL,
Callegari-Jacques SM, Scotta MC,
Stein RT and Bonorino C (2022)
SARS-CoV-2 infected children form
early immune memory responses
dominated by nucleocapsid-specific
CD8+ T cells and antibodies.
Front. Immunol. 13:1033364.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1033364

SARS-CoV-2 infected children form early immune memory responses dominated by nucleocapsid-specific CD8+ T cells and antibodies

Karina Lima^{1†}, Julia C. Fontoura^{1†}, Priscila Oliveira de Souza¹,
Tiago Fazolo¹, Gabriel Hilario¹, Renata Zorzetto¹,
Luiz C Rodrigues Junior¹, Laís D. Coimbra², Alexandre Borin²,
Karina Bispo-dos-Santos³, Fabiana Granja^{3,4},
Rafael Elias Marques², Gabriela Oliveira Zavaglia⁵,
Ingrid Rodrigues Fernandes⁵, Fernanda Hammes Varela⁵,
Marcia Polese-Bonatto⁵, Maiko Luís Tonini⁶,
Greice Madeleine Ikeda do Carmo⁷,
Walquiria Aparecida Ferreira de Almeida⁷, Thiago J. Borges⁸,
Helder I. Nakaya⁹, José Luiz Proença-Modena^{3,10},
Sidia Maria Callegari-Jacques¹¹, Marcelo Comerlato Scotta^{5,12},
Renato T. Stein^{5,12} and Cristina Bonorino^{1,13*}

¹Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA, Porto Alegre, Brazil, ²Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil, ³Laboratory of Emerging Viruses (LEVE), Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, ⁴Biodiversity Research Centre, Federal University of Roraima (UFRR), Boa Vista, Brazil, ⁵Social Responsibility – Programa de Apoio ao Desenvolvimento Institucional do Sistema Único de Saúde (PROADI-SUS), Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil, ⁶Coordenação-Geral de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória de Condições Crônicas, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e IST, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (CGDR/DCCI/SVS/MS), Brasília, Brazil, ⁷Departamento de Imunizações e doenças transmissíveis, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (DEIDT/SVS/MS), Brasília, Brazil, ⁸Center for Transplantation Sciences, Department of Surgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, United States, ⁹Computational System Biology Laboratory (CSBL), Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil, ¹⁰Hub of Global Health (HGH), University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, ¹¹Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ¹²Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, Brazil, ¹³Department of Surgery, University of California at San Diego – UCSD, La Jolla, CA, United States

This is the third year of the SARS-CoV-2 pandemic, and yet most children remain unvaccinated. COVID-19 in children manifests as mostly mild or asymptomatic, however high viral titers and strong cellular and humoral responses are observed upon acute infection. It is still unclear how long these responses persist, and if they can protect from re-infection and/or disease severity. Here, we analyzed immune memory responses in a cohort of children and adults with COVID-19.

Important differences between children and adults are evident in kinetics and profile of memory responses. Children develop early N-specific cytotoxic T cell responses, that rapidly expand and dominate their immune memory to the virus. Children's anti-N, but not anti-S, antibody titers increase over time. Neutralization titers correlate with N-specific antibodies and CD8⁺T cells. However, antibodies generated by infection do not efficiently cross-neutralize variants Gamma or Delta. Our results indicate that mechanisms that protect from disease severity are possibly different from those that protect from reinfection, bringing novel insights for pediatric vaccine design. They also underline the importance of vaccination in children, who remain at risk for COVID-19 despite having been previously infected.

KEYWORDS

Memory T cell, antibodies, neutralizing antibodies, variants of concern, N protein, COVID-19

Introduction

After almost three years of the SARS-CoV-2 pandemic, most children remain yet to be vaccinated against COVID-19. Children are often asymptomatic or develop mild disease upon infection. Some have questioned the need or urgency to vaccinate those under 18 years old, arguing that immunity to infection is sufficient for protection against the virus. Nevertheless, a recent study from the Center for Disease Control (CDC) (1) reports that the greatest increase in seroprevalence in the United States during 2022 was in children: 44.2 to 75.2% (0-11 years old) and 45.6 to 74.2% (12-18 years old). A recent US study reported an incidence of 316 cases of Multisystem inflammatory syndrome (MIS-C) per million of infected children (2). In Brazil, in 2022, until epidemiological week 24, 11,453 children (0-19 years old) were hospitalized for covid-19 and of these, 538 died. These epidemiological data are relevant and show the impact of SARS-CoV-2 infection for children not only for risk of COVID-19 disease, but also for possible and still unknown effects of SARS-CoV-2 infection (3). Some studies provide evidence that children may develop long COVID-19 (4, 5), reinforcing the need for a more thorough analysis of children's immunity to infection by SARS-CoV-2.

Most of the information available on immune memory to the virus, whether generated by infection or vaccination, comes from studies on adults. Also, most of these studies focus on the responses against the Spike protein (S) of the virus, especially against its receptor binding domain (RBD). These currently constitute the source of data used to estimate the protective potential of immune responses. While different studies highlight

the important role of innate immunity, especially of type I interferon (6), mechanisms and relative contributions of specific adaptive responses are less clear. Some propose neutralizing antibodies (NAbs) to the RBD as the best candidate correlate of protection (7) and others have shown that even when neutralization capacity wanes, T cells can still cross-recognize variants and protect against different SARS-CoV-2 variants (8), mostly because of T cell epitope conservation (9), with many of these epitopes come from sequences outside the S-protein coding region (10).

Fewer studies have focused on immune responses in COVID-19-affected children. We have previously compared immune responses in a sample of children and adults infected by SARS-CoV-2 (11), which revealed differences that might be related to protection from disease. The main difference observed was a predominant CD8⁺TNF- α ⁺ T cell response against the nucleocapsid (N) protein in children. Here, we performed a longitudinal follow-up analysis of immune memory responses 3 and 6 months after infection. Children developed an early and sustainable CD8⁺TNF- α ⁺ memory response to the N protein that is preferentially differentiated into terminal memory cells. This response is positively correlated with anti N, but not anti-S, antibody titers. Children produce durable antibody responses, however the neutralizing antibodies generated by infection do not efficiently cross neutralize other SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs), such as Gamma and Delta lineages. Our results underline the need for a functional characterization of which responses generated by infection can prevent disease. They also reinforce the need for vaccination against COVID-19 in children, who even after infection remain at risk against new emerging SARS-CoV-2 variants.

Material and methods

Ethics statement

This study was approved by the Institutional Review Board (IRB 30749720.4.1001.5330) at Hospital Moinhos de Vento and Research Ethics Committee from Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (CEP-UFCSPA) (CAAE 30749720.4.3001.5345). Legal consent was obtained from all participants or their legal guardians. The study was conducted according to good laboratory practices and following the Declaration of Helsinki.

Patients

A prospective cohort study was carried out at Hospital Moinhos de Vento and at Hospital Restinga e Extremo Sul, both in Porto Alegre, southern Brazil, and their immune status at primary infection was assessed as described (11). Study participants, adults and children older than 7 months, were asked to return for a 3- and 6-month follow-up visit to the respective hospital between October 2020 and April 2021 for blood sample collection.

PBMC isolation and *in vitro* T cells stimulation assays

Blood was collected in EDTA tubes (Firstlab, PR, Brazil) and stored at room temperature before processing for PBMC isolation and plasma collection. Plasma was separated by centrifugation and cryopreserved. PBMCs were next isolated by density-gradient centrifugation using Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare®), and either studied directly or resuspended in fetal bovine serum (FBS) 5% DMSO and stored in liquid nitrogen until use. For *in vitro* T cell stimulation, cells were thawed, assayed for viability, counted, and plated in 96-well plates at 3×10^5 PBMCs/mL, at 100 μ L/well in RPMI1640 medium (Sigma-Aldrich - R8758) supplemented with 10% FBS and 100 IU of penicillin/mL, 100 μ g of streptomycin/mL (Lonza, Belgium) and 2 mM L-glutamine (Lonza, Belgium) (R10H medium). Subsequently, cells were stimulated with peptide PepTivator SARS-CoV-2 Prot S (130-126-700 - Miltenyi Biotec, Germany), PepTivator SARS-CoV-2 Prot N (130-126-698 - Miltenyi Biotec, Germany) and PepTivator SARS-CoV-2 Prot M (130-126-702 - Miltenyi Biotec, Germany) at 1 μ g/mL. Anti-CD3/anti-CD28 (4 μ g/mL/2 μ g/mL, BD Biosciences) were used as a positive control for stimulation and used to normalize values obtained by peptide stimulation. All treatments were

incubated for 18h at 37°C and 5% CO₂. Three hours before harvesting, Golgi Plug (BD Biosciences, USA) 1 μ g/mL was added to each well. Cells were stained and phenotypes were analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry analysis

After *in vitro* stimulation, cells were stained with BD Horizon™ Fixable Viability Stain 510 together with antibodies for surface markers, as follows: anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (clone RPA-T4), anti-CD8-APC-H7 (clone SK1), anti-CCR7-BV421 (clone 2-L1-A), CD45RA-PE-Cy7 (clone L48). They were subsequently fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences-Pharmingen, USA), then stained with anti-IFN γ -FITC (clone 4S.B3), anti-TNF (clone MAb11) and anti-IL-17-PE (clone SCPL1362) antibodies. Antibody dilutions are available upon request. All samples were analyzed using BD Biosciences - FACSCanto II and FlowJo 10.7.1 software.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Plasma was tested for IgG and IgA antibodies to S-RBD protein (#RP-87678 - Invitrogen, USA), trimeric SARS-CoV-2 spike (S), S protein from variants Delta and Gamma (kindly provided by Dr. Leda Castilho - Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, Brazil) and N protein (kindly provided by Dr. Ricardo Gazinelli - Fiocruz Belo Horizonte, Brazil) using a protocol described in 17. Briefly, ELISA plates (Kasvi, Brazil) were coated overnight with 1 μ g/mL of SARS-CoV-2 proteins. On the following day, plates were blocked for 1 h at room temperature with a blocking buffer (3% skim milk powder in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20). Plasma samples were heat-inactivated at 56°C for 60 minutes and then serially diluted in 1% milk in 0.05% PBS-Tween 20 starting at 1:25. Plasma was incubated for 2 h at 37°C. Secondary antibodies were diluted in 0.05% PBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature. For both IgG, anti-human peroxidase produced in rabbit (#IC-1H01 - Rhea Biotec, Brazil), and IgA, anti-human peroxidase produced in goat (#A18781 - Invitrogen, USA), was used at a 1:10,000 dilution. TMB Elisa Substrate - High Sensitivity (Abcam, United Kingdom) was added for 30 minutes, and the reaction stopped with 1M chloric acid. Results were documented in an ELISA reader (Biochrom EZ 400), and O.D. at 450 nm was used to calculate the area under the curve (AUC), using a baseline of 0.07 for peak calculation 18. For average AUC calculations, adult individuals who were vaccinated between the 3 and 6-months timepoint were excluded.

Viruses and cells

The present study was conducted using three different SARS-CoV-2 lineages: The B original lineage (Genbank HIAE-02 SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA) isolated from the second case of COVID-19 in Brazil and kindly provided by Prof. Edison Durigon; Gamma (P.1) (GISAID: EPI_ISL_1708318) isolated from a patient seen in Campinas, Brazil; and Delta (B.1.617.2-like) (GISAID: EPI_ISL_3461104) isolated from a patient seen in Porto Alegre, Brazil. SARS-CoV-2 lineages were isolated and propagated in Vero cells (CCL-81; ATCC, Manassas, VA, USA) as described elsewhere (Clarke et al., 2022). Viral titers of the viral stocks used in the study were determined by plaque-forming unit (PFU) assay as previously described (12). All experiments with viable SARS-CoV-2 were performed under biosafety level 3 (BSL-3) in the Laboratory of Emerging Viruses (LEVE) of the University of Campinas, Brazil.

Plaque reduction neutralization test

Patient's serum neutralizing activity against B, Gamma and Delta isolates of SARS-CoV-2 were evaluated using an in-house Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) as previously described (13). Briefly, plasma samples from infected patients were serially diluted in a 1:2 dilution factor (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 and 1/320) in DMEM and incubated with a solution containing 2×10^5 PFU/mL of SARS-CoV-2 isolates for 1h at 37°C with 5% CO₂. Virus-serum mixtures were added to Vero cells monolayers and incubated for an additional hour for viral adsorption. Supernatants were then discarded, and Vero cells were covered with carboxymethylcellulose (CMC) 1% in DMEM containing 5% FBS. Cells were incubated for 72h to 96h at 37°C with 5% CO₂. CMC/DMEM medium was removed, cells were fixed with 8% paraformaldehyde and stained with 1% methylene blue (Sigma-Aldrich). After staining, the number of lysis plaques in all wells were manually counted and the plaque reduction was calculated for each patient sample after normalization with the plaque numbers observed in SARS-CoV-2 positive controls, without serum. PRNT₅₀ for each patient was calculated as the dilution that showed approximately a 50% reduction in the number of plaques when compared with the SARS-CoV-2 infected positive controls.

Statistics

Patients' demographic or clinical characteristics measured as categorical variables were described using percentages and compared among groups using Pearson chi-square test. Continuous clinical characteristics were summarized in terms of median and interquartile range (IQR) and compared among

groups using Kruskal-Wallis test. Differences among groups of patients for time variation in levels (area under the curve, AUC) of IgG and IgA antibodies were analyzed using Generalized Estimating Equations (GEE). The models considered gamma distribution for the data, log link and unstructured working correlation matrix. Sequential Sidák's adjustment was used to adjust p-values for pairwise multiple comparisons. These calculations were done using SPSS v.18. For memory T cell data, the results observed in the three time points were compared using nonparametric Friedman test in each patient's group. If the result was statistically significant, Wilcoxon test for paired samples was then employed to compare 3- and 6-month. Memory T cell difference among groups in selected time points of collection were analyzed using Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance, followed by Dunn's test for pairwise comparisons between groups. Spearman's rank correlation matrices were obtained using R package *corrplot* (14).

High-dimensional data and heatmap analysis of flow cytometry data

t-SNE and FlowSOM analyzes were performed on FlowJo v.10.8.1. Cells populations were downsampled from live cells, using the Downsample v.3.0.018 plugin for FlowJo to 2000 cells and subsequently concatenated. FlowSOM clustering with the FlowSOM v3.0.18 plugin was performed on the concatenated file with n= 6 clusters for the memory T cells populations. The FlowSOM output was surface markers expression and the percentage of cells in each cluster between groups. The t-SNE map was built with a vantage point tree algorithm with 550 iterations. Cluster identification in the map was performed with the help of the Cluster Explorer v1.6.3 plugin through the heatmap expression of surface markers CD4, CD8, CD45RA, and CCR7. Heatmap analyses were performed using the *ggplot2* package v3.3.6 (15), where data was normalized through z-score, considering CD8, CD4, CD45RA, CCR7, TNF- α , IFN- γ and IL-17 markers.

Results

The study design is summarized in Figure 1A. The cohort included children, adults with mild and severe disease, with blood collected between July 2020 and April 2021. All children only had mild symptoms, as previously described in (11). Patients, or their legal guardians, consented to donate blood samples approximately 3 and 6 months after the first sample was collected at diagnosis (11). Samples were cryopreserved and later analyzed for memory markers including specific antibodies and T cell populations. Demographic and clinical data of patients that remained in the study for six months are presented in

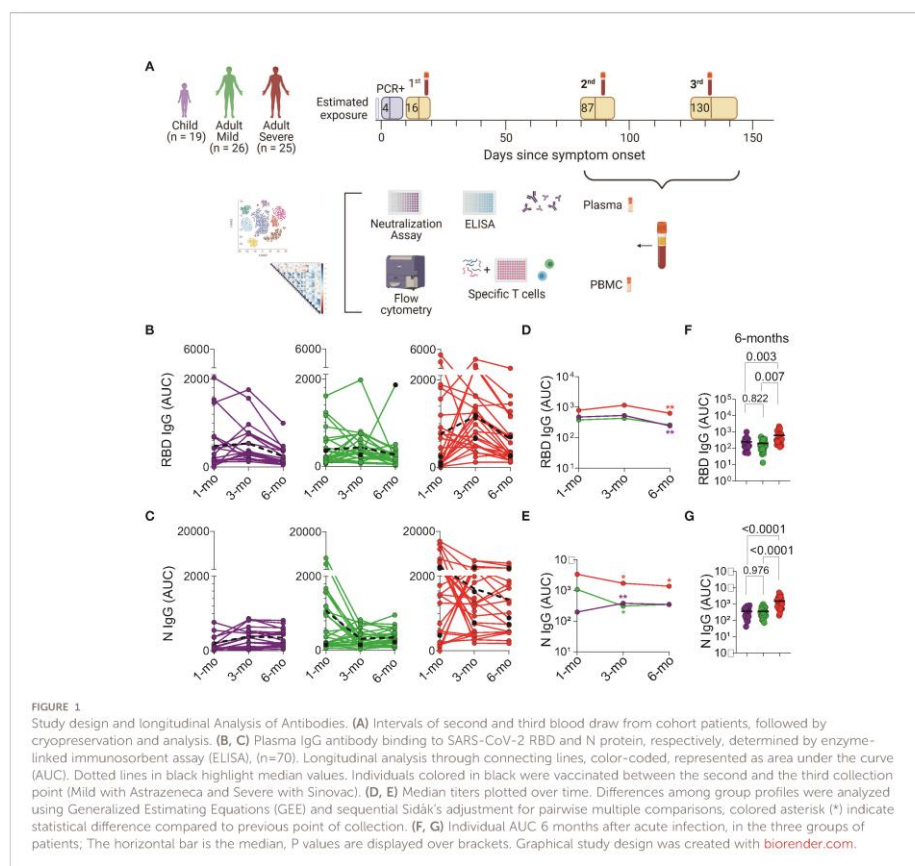


Table 1. The percentage of absence between the sample studied for acute infection (11) versus memory response study, was 21% in children, 8% in adults with mild diseases and 24% in adults with severe disease.

IgG titers to the N, but not the S protein, increase over time in children

Antibodies from blood samples are currently the main surrogate markers of memory of infection and/or vaccination. Plasma titers of IgG antibody binding to SARS-CoV-2 RBD (Figures 1B, D, F) and N (Figures 1C, E, G) proteins, as well as of

IgA (Figure S1) were determined by ELISA immediately after acute infection and at the 3 and 6 months after infection. These two later time points values were compared to the those detected at diagnosis. Considerable individual variation in responses to both antigens, a hallmark of infection, can be observed in each group (Figures 1B, C). Remarkably, children's anti-N IgG titers show a significant increase ($p=0.001$) at the 3 months timepoint, and which is maintained until 6 months (Figure 1E), while their anti-S-IgG titers decrease significantly ($p<0.001$) (Figure 1D). Although adults with severe disease show significantly higher titers of both anti-N and anti-S antibodies throughout time, a significant decrease in both antibodies is observed at the 6 months post-acute infection (anti-S IgG $p<0.001$; anti-N IgG $p=0.026$) (Figures 1D–G).

TABLE 1 Clinical characteristics of patients.

Characteristics	Child(N = 19)	Mild(N = 26)	Severe(N = 25)	P-value
Age (y), median (IQR)	12.0 (3.7–15.2)	42.5 (29.7–47.5)	51.0 (38.0–70.5)	<0.001
Female sex, n (%)	10 (52.6)	16 (61.5)	12 (48.0)	0.616
Days from symptom onset to sample collection				
1 st point, days, median (IQR)	16 (12.0–42.0)	18 (16.0–22.5)	11 (9.5–15.5)	0.063
2 nd point, days, median (IQR)	87 (83.0–106.0)	92 (84.0–100.0)	82 (74.5–88.0)	0.019
3 rd point, days, median (IQR)	131 (119.0–155.0)	133 (127.0–143.5)	125 (121.5–130.5)	0.080
Days from symptoms to SARS-CoV-2 positive PCR test, median (IQR)	3 (2–8)	3 (2–5)	7 (3.5–10.0)	0.012
Number of symptoms, median (IQR)	7 (4–11)	14 (10–19)	12 (8–17)	0.003
Number of underlying medical conditions, median (IQR)	0 (0–1)	0 (0–1)	2 (1–6)	0.005

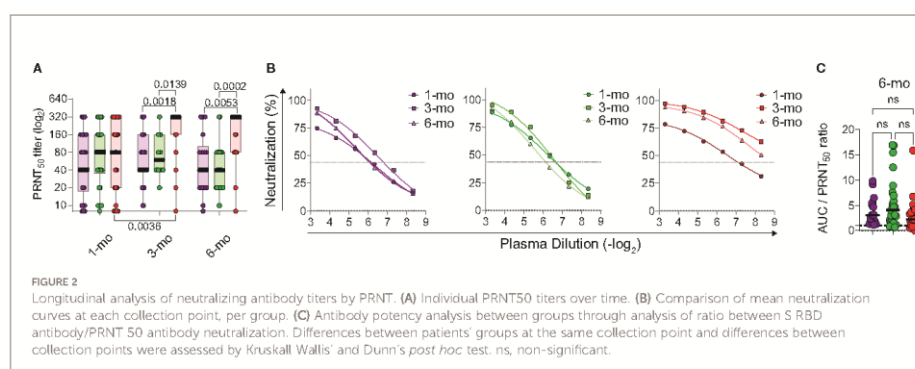
Quantitative variables were compared using Kruskal-Wallis test and for categorical variables Pearson's Chi-squared test was used; IQR, interquartile range. Bold values indicate P-value < 0.05

IgA titers to the RBD dropped significantly in all groups at this time point, while anti-N IgA antibodies increase slightly in children, and significantly in adults which had mild disease ($p < 0.001$) (Figure S1C and S1D). These results indicate that a test based solely on anti-IgG RBD might not constitute the best assay to detect antibody memory in most of the population, especially in children.

Vaccinated individuals are depicted in black (Figures 1B, C; and Figures S1A, S1B). Their titers are shown for comparison but were excluded from the average AUC calculations. One adult with mild disease was vaccinated and received the Astra Zeneca vaccine; the adults with severe disease that were vaccinated received the Sinovac vaccine. The latter showed no obvious increases in antibodies. Among individual children, which were all unvaccinated at that time, no obvious increases in antibody titers were detected at the analyzed timepoints. This is consistent with the time in which the study was carried out, that is, on lockdown and could indicate that these children were not reinfected during that six-month period.

Memory neutralizing antibodies in children

More than total specific antibody titers, the detection of neutralizing antibodies (NAbs) is frequently proposed as the gold standard for protective immunity to different viruses, including SARS-CoV-2. We thus performed a longitudinal analysis of NAb production in the cohort members (Figure 2). Once again, considerable individual variation can be observed. All three groups show higher averages in PRNT50 titers at the 3 months timepoint (Figures 2A, B) in comparison with the diagnosis timepoint, although this increase is significantly higher in adults who had severe disease ($p < 0.01$). At the 6 months timepoint, NAbs titers are maintained, and still higher in the adults who experienced severe disease (Figures 2A, B). Finally, the ratio between total and neutralizing antibodies, at the 6 months timepoint (Figure 2C) was not different among the groups. Altogether, these results suggest that SARS-CoV-2 infected children make and sustain neutralizing antibodies at levels that are comparable those observed in adults.



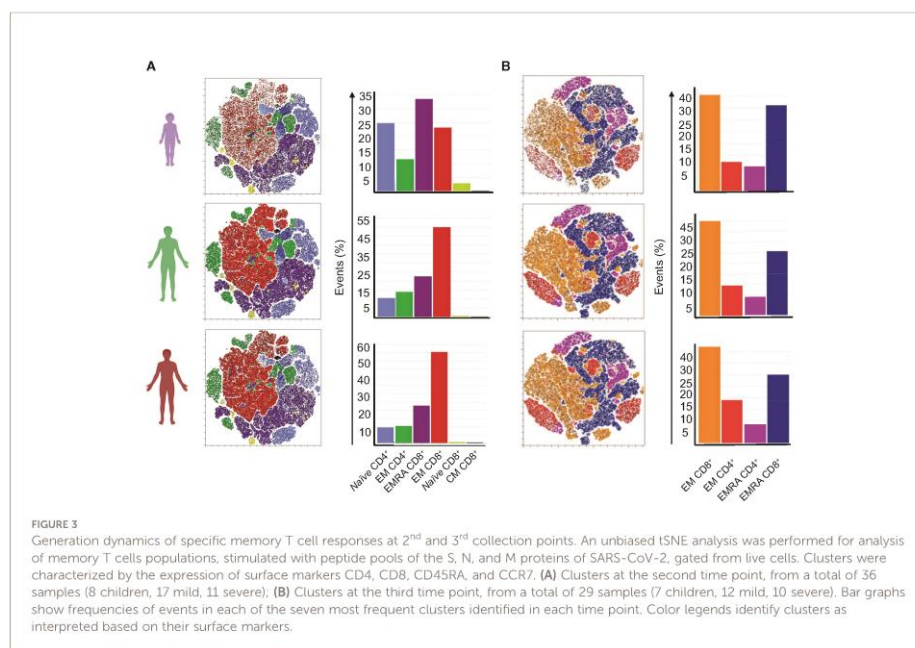
Dynamics and quality of specific T cell memory generation to SARS-CoV-2 are different in children compared to adults

The low antibody titers shown by children over time indicate that the mild form of disease they experience might be explained by other mechanisms, particularly those mediated by T cells. To investigate the generation of memory T cell responses in the cohorts, we stimulated PBMCs from 3 and 6 months after the acute infection with peptide pools of SARS-CoV-2 proteins S, M or N. SARS-CoV-2 specific T cells were then analyzed by flow cytometry for T cell memory (using CD45RA and CCR7 expression) and functional markers through the production of cytokines (IFN- γ , IL-17 and TNF- α).

An unbiased tSNE analysis of SARS-CoV-2 specific stimulated T cells (CD4 and CD8) was performed. Seven main clusters in the 3- and 6-months points were identified. At 3 months (Figure 3A), children show generally lower frequencies of specific T cells than adults. Both adult groups show a higher frequency of a cluster of CD45RA⁺CCR7⁻ CD8⁺ T cells – which we named effector CD8⁺ T cells (EM CD8⁺). Children presented fewer events for this cluster and more events for the clusters of CD45RA⁺CCR7⁺ CD4⁺ as well as CD45RA⁺CCR7⁺ CD8⁺, named by us *naïve* CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively.

Notably, one cluster of CD45RA⁺CCR7⁻ CD8⁺ cells, identified by us as terminally differentiated memory (EMRA) T cells that emerge at this point is most frequent in children compared to either of the adult groups. At 6 months, clusters were qualitatively different (Figure 3B). Frequencies of events in each of the identified clusters were more similar between children and adults. Children no longer present prominent clusters of *naïve* cells. Instead, CD8⁺ EMRA cells were dominant in children, while the cluster characterized by effector cells is more evident in adults. In sum, these results indicated that memory CD8⁺ T cell responses in children were faster, and more intense, than in adults.

We next proceeded to a more quantitative and functional analysis of these memory T cell responses. We had previously shown that anti-N CD8⁺TNF- α ⁺ T cells were generated upon acute infection in children, while adults focused that response on S peptides (11). To investigate if this was the main response that was differentiated into memory in children, we performed a longitudinal analysis of the percentages of specific cells producing TNF- α , IL-17 or IFN- γ in response to the different peptide pools (Figure S2). The results are shown in Figure 4 and Supplementary Figures 3 and 4. Figure 4A shows that after 3 months most children show central memory CD8⁺TNF- α ⁺ T cells responding to N peptides. Some children already show



effector memory and even EMRA cells with these characteristics. At the 6-month time point, most children had developed CD8⁺TNF- α ⁺ effector memory and EMRA cells specific for N peptides, but not for the S and M peptide pools. This does not happen for IFN- γ and IL-17 CD8 memory responses (Figures S3A, S3B). While most children and adults generate memory cells producing these two cytokines in response to all three proteins at the 3 months post-acute infection, most of these responses are lost at 6 months. Supplementary Figure 4 shows quantification of functional specific CD4⁺ T cell responses at the two timepoints. It is remarkable that most children lose at 6 months all the detectable circulating responses seen at 3 months post-acute infection. These results suggest that children, but not adults, develop early and long-lasting T cell memory responses, and that CD8⁺TNF- α ⁺ cells specific for the N protein constitute a major, if not the main, component of those responses.

To further investigate which children are forming memory responses to the viral peptides, we compared their individual responses through heatmaps (Figure 4B). Most children focused their memory responses on CD8⁺TNF- α ⁺, especially to the N protein, with fewer individuals targeting the M and S peptide pools, at 6 months after acute infection.

A Spearman correlation analysis (Figure 5) evidenced that in children, but not adults, anti-N IgG and IgA titers correlated positively with N-specific CD8⁺TNF- α ⁺ T cells – especially EMRA cells. PRNT50 titers in children, but not in adults, also correlated positively with CD8⁺TNF- α ⁺ EMRA cells. This positive correlation was not observed for protein S (Figure S5). Altogether, these results indicate that children generate distinctive memory T and B cell responses to SARS-CoV-2 infection, in kinetics, target and function.

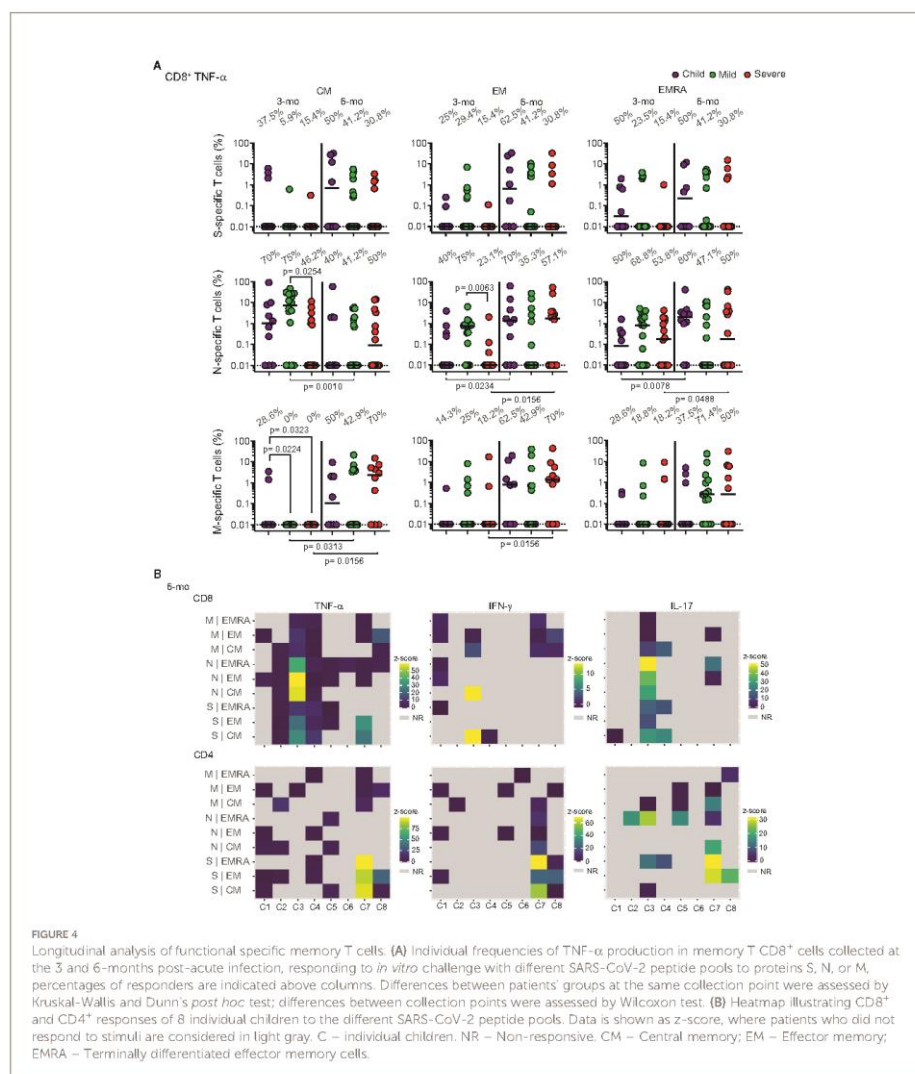
Memory NAbs in children do not efficiently cross-neutralize infection by emerging SARS-CoV-2 variants

At the time we ended sample collections for this study, the original variant, B, was being substituted for more prevalent variants of concern (VOCs), namely Gamma (16), and later, Delta (17). The neutralizing antibodies generated by vaccination encoding the RBD of the S protein were shown to retain protection potential against VOCs (16). Most of the children, however, have not been vaccinated. We asked if the children's memory antibody responses to SARS-CoV-2 infection would be protective against infection by the emerging variants. To investigate that, we analyzed the recognition and neutralizing potential of the memory antibodies present at 6 months post-diagnosis. We assayed these antibodies against the trimeric Spike of the variants by ELISA and performed PRNT tests using the Gamma and Delta lineages (Figure 6). Responses to the trimeric S of the original variant (B) were always higher in titers than responses to the RBD (Figure 6A). For almost every individual,

total IgG antibodies to the B trimeric S are still able to recognize the trimeric S of variants Gamma and Delta. However, this does not hold for neutralizing antibodies (Figures 6B–D). Only adults with severe disease maintained significant higher potential for neutralization of the Gamma VOC compared to children and adults with mild disease. For Delta, a later-emerging VOC, marked reductions in neutralization are observed for all groups. These results indicate that neutralizing antibodies generated by infection with the original B variant in children have low or no protective potential upon encounter with emerging VOCs.

Discussion

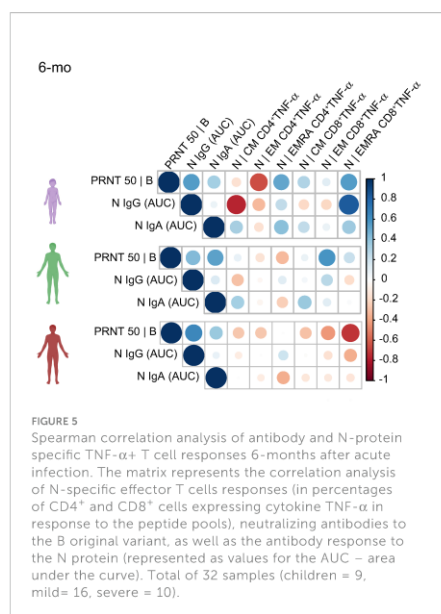
Throughout the SARS-CoV-2 pandemic, children have been regarded as having a minor risk of disease, mostly because of the mild presentation of COVID-19 observed in so many of them. They have thus become the least studied age group, and the last to be vaccinated. However, the immune responses they develop to infection might hold important information on what is necessary to generate fast and efficient protection against disease. In this study, we identified key differences in the memory immune response generated by infected children when compared to adults. The increase of anti-N antibodies three months after diagnosis and the early appearance of memory N-specific CD8⁺TNF- α ⁺ cells could reflect a higher precursor frequency of N-peptide-recognizing cells in children. This could be due to pre-existing cross-reactive T cells and might explain the mild disease generally presented by SARS-CoV-2 infected children. The N gene has a higher degree of conservation among different lineages of SARS-CoV-2 than the S gene, accumulating fewer mutations (18). It is highly expressed during infection (19) and is associated with the protection of the viral RNA genome, resulting in specific T cells that are long-lasting (20). In adults, cross-reactive memory T cells were shown to be associated with protection from COVID-19 (21). In that study, the peptides recognized by cells in protected individuals were mainly from the nucleocapsid (N) protein. Most, but not all, individuals who recover from COVID-19 generate T cell responses to multiple viral epitopes (22) and a strong activation of these cross-reactive clones has been linked to protection (23). It has been suggested that, in children, a high frequency of antibodies and T cells recognizing antigens from seasonal coronaviruses could be due to repeated reinfections (24), though the protective immunity generated by infection with these endemic coronaviruses is not usually long-lasting (25). Studies on precursor frequencies of T cells recognizing coronaviruses epitopes, however, are lacking. This makes it difficult to support such a hypothesis with evidence. Interestingly, the efficacy of RBD-encoding mRNA vaccines drops from over 90% in adults to 51% (Moderna) and 75% (Pfizer) in young children (26). It is possible that a better



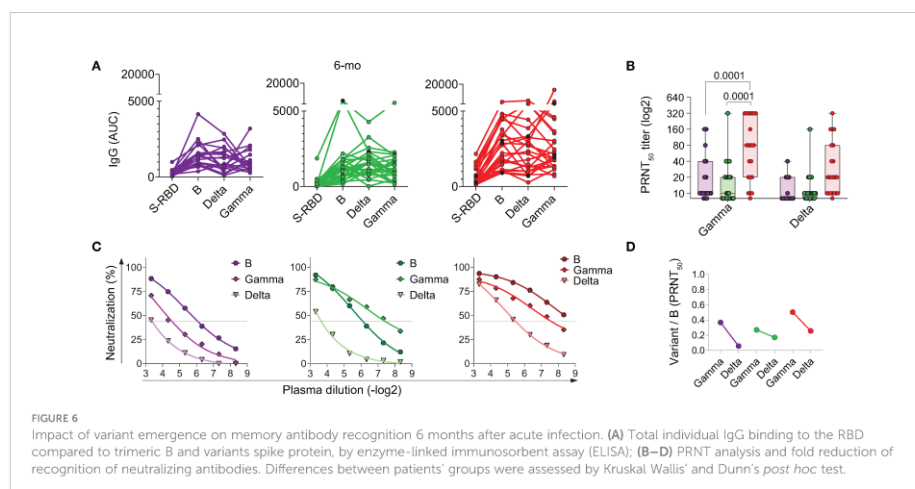
tailoring of vaccines for children, including N peptides, could stimulate this N-specific response, thus increasing efficacy in this age bracket.

The fact that the N-specific antibodies in children, but not adults, correlated with anti-N CD8⁺TNF- α ⁺ memory T cells may evidence functional mechanisms of protection that have not been

characterized for COVID-19. While a correlation between antibodies and CD4⁺ T cells, mainly follicular T cells (Tfh), would be expected, a recent study by Nelson et al. (27) analyzed memory T cell responses using peptide:HLA tetramers and did not find high associations between peak antibodies to SARS-CoV-2 and Tfh cells. Klarquist et al. found that B cells are necessary to



produce IL-27 that enhances CD8 $^{+}$ T cell responses (28). Thus, in the case of the children's anti-N response, antibodies might be markers for a CD8 $^{+}$ T - B cell crosstalk that only recently started being characterized. Importantly, neutralization titers generated by infection were not sufficient to cross-neutralize emerging VOCs in a plaque reduction assay. These results concur with epidemiological reports of peak reinfections in children occurring during the Gamma and Delta variant waves (29, 30). They also underline differences in the protective potential of antibodies generated by vaccination, that can cross-neutralize variants, versus those generated by infection. Immune responses that control disease in children may thus be different from those that control infection. Studies that further investigate these differences are sorely needed. There have been, however, a few studies showing that children develop a strong S protein response. Chiara, et al. observed that younger children develop higher levels of binding antibodies, while Dowell et al. observed that children developed higher antibody responses to the spike protein when compared to adults. In addition, they observed that children developed N- and M-specific T cell responses lower than those of adults (31% children x 68% adults). These differences between data could be due to MHC variations between cohorts, differences in vaccine schedule and adherence, as well as to the seasonal coronaviruses in circulation during each study. One limitation of this study is the small number of participants. This study was conducted during 2020-2021, and some children were not



brought back for all blood draws at the follow-up time points. Nevertheless, the consistency of responses found in all our analyses indicates important aspects of pediatric COVID-19 immunity, that may inform vaccination strategies for this age group (31, 32).

Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the Mendeley repository, found here: <https://data.mendeley.com/datasets/pfkhyry6wt/1>. Further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Ethics statement

This study was reviewed and approved by Institutional Review Board (IRB 30749720.4.1001.5330) at Hospital Moinhos de Vento and Research Ethics Committee from Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (CEP-UFCSPA) (CAAE 30749720.4.3001.5345). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

Author contributions

KL, JF, PS, TF, all designed and performed experiments, analyzed data, wrote, and edited the manuscript. KL, performed and analyzed t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) analysis. JF, performed and analyzed the correlation and heatmap matrices. GH, RZ, assisted in experiments. LR, helped design the study. LC, AB, KB-d-S, FG, RM, performed Plaque Reduction Assay (PRNT). GZ, IF, FV, MP-B helped collect patients. MT, GC, WA, assisted with epidemiological information. TB helped design the study and edited the manuscript. HN helped with tSNE and heatmap analysis and edited the manuscript. JLP, coordinated and performed PRNT analysis and edited the manuscript. SC-J coordinated all statistical analysis and edited the manuscript. MS, RS coordinated the cohort, conceived, and designed the study and edited the manuscript. CB, conceived and designed the study, performed data analysis, wrote, and edited the manuscript. All

authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

Funding for this study was provided by PROADI - HMV, and the Ministry of Health; fellowships for KL, JF, RS and CB are from CNPq; fellowships for GH, PS and TF are from CAPES. TB is a recipient of an American Heart Association fellowship grant.

Acknowledgments

We wish to thank Caroline Nespolo de David for assistance in project management and the COVIDa consortium (a full list of consortium members appears in Supplementary Note 1). Finally, we wish to thank all the patients who accepted to enroll in the study and donate blood.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1033364/full#supplementary-material>

References

1. Clarke KEN, Jones JM, Deng Y, Nycz E, Lee A, Iachan R, et al. Morbidity and mortality weekly report. seroprevalence of infection-induced SARS-CoV-2 antibodies—United States, September 2021–February 2022. *CDC.org* (2022) 71 (17):606–8. doi: 10.15585/mmwr.mm7117e3externalicon
2. Payne AB, Gilani Z, Godfred-Cato S, Belay ED, Feldstein LR, Patel MM, et al. Incidence of multisystem inflammatory syndrome in children among US persons infected with SARS-CoV-2. *JAMA Netw Open* (2021) 4:e2116420. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.16420

3. Secretaria de Vigilância em Saúde. 118 boletim epidemiológico especial - doença pelo Novo coronavírus - COVID-19. *Brasília* (2022) 118:1–108. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-118-boletim-coe-coronavirus.pdf/view>
4. Molteni E, Sudre CH, Canas LS, Bhopal SS, Hughes RC, Antonelli M, et al. Illness duration and symptom profile in symptomatic UK school-aged children tested for SARS-CoV-2. *Lancet Child Adolesc Health* (2021) 5:708–18. doi: 10.1016/S2352-4642(21)00198-X
5. Lopez-Leon S, Wegman-Ostrosky T, Ayuzo del Valle NC, Perelman C, Sepulveda R, Rebolledo PA, et al. Long-COVID in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* (2022) 12:1–12. doi: 10.1038/s41598-022-13495-5
6. Manry J, Bastard P, Gervais A, le Voyer T, Rosain J, Philippot Q, et al. The risk of COVID-19 death is much greater and age dependent with type I IFN autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci* (2022) 119:e2200413119. doi: 10.1073/pnas.2200413119
7. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, Schlub TE, Wheatley AK, Juno JA, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* (2021) 27:1205–11. doi: 10.1038/s41591-021-01377-8
8. Tarke A, Coelho CH, Zhang Z, Dan JM, Yu ED, Methot N, et al. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from alpha to omicron. *Cell* (2022) 185:847–859.e11. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.015
9. Choi SJ, Kim DU, Noh JY, Kim S, Park SH, Jeong HW, et al. T Cell epitopes in SARS-CoV-2 proteins are substantially conserved in the omicron variant. *Cell Mol Immunol* (2022) 19:447–8. doi: 10.1038/s41423-022-00838-5
10. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* (2020) 181:1489–1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015
11. Fazolo T, Lima K, Fontoura JC, de Souza PO, Hilario G, Zorzetto R, et al. Pediatric COVID-19 patients in south Brazil show abundant viral mRNA and strong specific anti-viral responses. *Nat Commun* (2021) 12:1–13. doi: 10.1038/s41467-021-27120-y
12. Araujo DB, Machado RRG, Amgarten DE, Malta F de M, de Araujo GG, Monteiro CO, et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2020) 115:1–8. doi: 10.1590/0074-02760200342
13. Souza WM, Amorim MR, Sesti-Costa R, Coimbra LD, Brunetti NS, Toledo-Teixeira DA, et al. Neutralisation of SARS-CoV-2 lineage P.1 by antibodies elicited through natural SARS-CoV-2 infection or vaccination with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine: an immunological study. *Lancet Microbe* (2021) 2:e527–35. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00129-4
14. Taiyun Wei M, Taiyun Wei cre A, Simko aut V, Levy ctb M, Xie ctb Y, Jin ctb Y, et al. Title visualization of a correlation matrix NeedsCompilation no. (2021). <https://github.com/taiyun/corplot>
15. Wickham H. *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. New York: Springer-Verlag (2016).
16. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Sci* (1979) (2021) 372:815–21. doi: 10.1126/science.abb2644
17. Giovanetti M, Fonseca V, Wilkinson E, Tegally H, San EJ, Althaus CL, et al. Replacement of the gamma by the delta variant in Brazil: Impact of lineage displacement on the ongoing pandemic. *Virus Evol* (2022) 8:veac024. doi: 10.1093/ve/veac024
18. Zhu Y, Liu M, Zhao W, Zhang J, Zhang X, Wang K, et al. Isolation of virus from a SARS patient and genome-wide analysis of genetic mutations related to pathogenesis and epidemiology from 47 SARS-CoV isolates. *Virus Gene* (2005) 30 (1):93–102. doi: 10.1007/s11262-004-4586-9
19. Cong Y, Ulasli M, Schepers H, Mauthe M, V'kovski P, Kriegenburg F, et al. Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronavirus life cycle. *J Virol* (2020) 94:e01925–19. doi: 10.1128/JVI.01925-19
20. Peng H, tao YL, Wang Ly, Li J, Huang J, Lu Zq, et al. Long-lived memory T lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients. *Virology* (2006) 351:466–75. doi: 10.1016/j.virol.2006.03.036
21. Kundu R, Narean JS, Wang L, Fenn J, Pillay T, Fernandez ND, et al. Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nat Commun* (2022) 13:1–8. doi: 10.1038/s41467-021-27674-x
22. Zhao J, Wang L, Schank M, Dang X, Lu Z, Cao D, et al. SARS-CoV-2 specific memory T cell epitopes identified in COVID-19-recovered subjects. *Virus Res* (2021) 304:198508. doi: 10.1016/j.virusres.2021.198508
23. Saini SK, Hersby DS, Tamhane T, Povlsen HR, Hernandez SPA, Nielsen M, et al. SARS-CoV-2 genome-wide T cell epitope mapping reveals immunodominance and substantial CD8 T cell activation in COVID-19 patients. *Sci Immunol* (2021) 6:7550. doi: 10.1126/sciimmunol.abf7550
24. Waterlow NR, van Leeuwen E, Davies NGCovid-19 C, Group W., Flasche S, Eggo RM. How immunity from and interaction with seasonal coronaviruses can shape SARS-CoV-2 epidemiology. *PNAS* (2021) 118(49):e2108395118. doi: 10.1073/pnas.2108395118
25. Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, et al. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med* (2020) 26:1691–3. doi: 10.1038/s41591-020-1083-1
26. Willyard C. FDA Authorizes COVID vaccines for the littiest kids: what the data say. *Nature News* (2022). doi: 10.1038/41586-022-01689-w
27. Nelson RW, Chen Y, Venezia OL, Majerus RM, Shin DS, Carrington MN, et al. SARS-CoV-2 epitope-specific CD4⁺ memory T cell responses across COVID-19 disease severity and antibody durability. *Sci Immunol* (2022) 7:eab9464. doi: 10.1126/sciimmunol.ab9464
28. Klarquist J, Cross EW, Thompson SB, Willett B, Aldridge DL, Caffrey-Carr AK, et al. B cells promote CD8 T cell primary and memory responses to subunit vaccines. *Cell Rep* (2021) 36:109591. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109591
29. Kubale J, Balmaseda A, Frutos AM, Sanchez N, Plazaola M, Ojeda S, et al. Association of SARS-CoV-2 seropositivity and symptomatic reinfection in children in Nicaragua. *JAMA Netw Open* (2022) 5:e2218794. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.18794
30. Mensah AA, Campbell H, Stowe J, Seghezze G, Simmons R, Lacy J, et al. Risk of SARS-CoV-2 reinfections in children: a prospective national surveillance study between January, 2020, and July, 2021, in England. *Lancet Child Adolesc Health* (2022) 6:384–92. doi: 10.1016/S2352-4642(22)00059-1
31. Dowell AC, Butler MS, Jinks E, Tut G, Lancaster T, Sylia P, et al. Children develop robust and sustained cross-reactive spike-specific immune responses to SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol* (2022) 23:40–9. doi: 10.1038/s41590-021-01089-8
32. di Chiara C, Cantarutti A, Costenaro P, Donà D, Bonfante F, Cosma C, et al. Long-term immune response to SARS-CoV-2 infection among children and adults after mild infection. *JAMA Netw Open* (2022) 5:E2221616. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.21616

COPYRIGHT

© 2022 Lima, Fontoura, de Souza, Fazolo, Hilario, Zorzetto, Rodrigues Junior, Coimbra, Borin, Bispo-dos-Santos, Granja, Marques, Zavaglia, Fernandes, Varela, Polese-Bonato, Tonini, Ikeda do Camo, de Almeida, Borges, Nakaya, Proenca-Modena, Callegari-Jacques, Scotta, Stein and Bonorino. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO E – COAUTORIA DE CAPÍTULO DE LIVRO – “Interfaces entre Saúde e Educação”

CONTOS EM SAÚDE: UMA ABORDAGEM SIMPLIFICA PARA O ENSINO DO SUS NA ESCOLA

Luiz Carlos Rodrigues Junior¹

Ângelo Ramos Junior²

Debora Fernandes Coelho³

Gabriel Tardin Mota Hilario⁴

Renata Zorzetto⁵

Karina Rodrigues Lima⁶

Matheus Soares Rocha⁷

O SUS: UM SISTEMA PARA TODOS

Antes da criação do Sistema Único de Saúde (SUS), o acesso a saúde pública no Brasil era ofertado apenas para as pessoas que apresentavam carteira de trabalho assinada, ou seja, quem conseguia acessar os serviços de saúde pública no território nacional eram os trabalhadores formais.

A criação do SUS partiu de vários movimentos sociais na década de 1980, que reivindicaram a democratização do acesso à saúde de forma gratuita para todas as pessoas. Essas ideias foram consolidadas e aprovadas na 8ª Conferência Nacional de Saúde, que constituiu um marco na saúde pública do Brasil. Nesse sentido, no ano de 1990 foi sancionada a lei orgânica da saúde que regula as ações e serviços de saúde em todo território nacional.

A partir da Lei nº 8.080/1990 ficou instituído o SUS, que estabelece diretrizes e estratégias para a saúde pública no país, tendo como pilares a descentralização, integralidade, universalização, equidade e a participação

¹ Doutor em Imunologia (PUCRS). Professor (UFCSPA). CV: <http://lattes.cnpq.br/6354567436180190>

² Doutorando em Enfermagem (UFC). CV: <http://lattes.cnpq.br/5024728614761210>

³ Doutora em Enfermagem (UFRGS). Professora (UFCSPA). CV: <http://lattes.cnpq.br/0385621346345334>

⁴ Doutorando em Biociências (UFCSPA). CV: <http://lattes.cnpq.br/5554862022148464>

⁵ Doutoranda em Biociências (UFCSPA). CV: <http://lattes.cnpq.br/1897246252169385>

⁶ Doutoranda em Biociências (UFCSPA). CV: <http://lattes.cnpq.br/2669438103216805>

⁷ Acadêmico de Biomedicina (UFCSPA). CV: <http://lattes.cnpq.br/4190619750003447>

da comunidade. A partir da criação do SUS, a saúde tornou-se um direito fundamental e constitucional para a população. A universalidade do SUS contempla questões de saúde pública, tais como infecções sexualmente transmissíveis, gestação não planejada na adolescência, demandas de saúde mental, formas de assédio, saúde da população negra, saneamento básico e imunizações. O SUS influencia na vida de todos os brasileiros, seja por meio da saúde física, mental, ou mesmo questões relacionadas a qualidade da água que bebemos e controle de lixo urbano.

Assim, nesse capítulo, apresentamos diversos contos com histórias que enfocam questões as quais a solução pode ser encontrada no SUS. Os personagens dos contos são baseados em modelos de pessoas e problemas comuns no cotidiano de qualquer pessoa, e com histórias que se cruzam em torno de situações de vida que são atendidas, amparadas ou resolvidas no SUS. O objetivo dessas histórias é servirem como material de apoio para o ensino o SUS em escolas de ensino fundamental e médio.

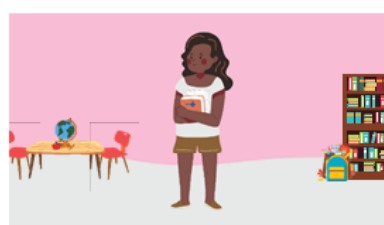
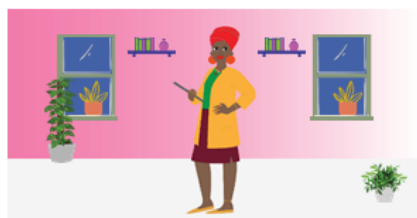
CONHEÇA UM POUCO DO NOSSOS PERSONAGENS

MARIA DANDARA

Maria Dandara é uma mulher negra de 36 anos de idade, médica ginecologista. Em 2005 passou no vestibular para Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso, ocupando uma vaga em universidade pública e por cota racial. Ao final da graduação foi fazer residência em Ginecologia e Obstetrícia no Rio Grande do Sul. Atualmente, trabalha em um hospital que atende 100% SUS, e também em uma Unidade Básica de Saúde da Família, localizada próximo à escola de Ensino Médio Domênico Pillar. Maria Dandara tem uma filha chamada Luana, que estuda nessa escola.

LUANA

Luana é uma adolescente de 14 anos de idade e está iniciando o ensino médio em escola Domênico Pillar. Embora seja inteligente e comunicativa, Luana se sente um pouco deslocada perto da maioria dos colegas. O motivo desse deslocamento é o fato de Luana ser negra, a maioria dos colegas brancos, sendo ela a única menina negra. Por mais que Luana não vivencie agressões por parte dos colegas, ela nota um certo distanciamento. Como adolescentes, eles passam horas nas redes sociais postando fotos e vídeos. Cada vez que Luana vê suas colegas postando fotos de eventos os quais ela não foi convidada, isso funciona como um gatilho para aumento da ansiedade.



GUILHERME

Guilherme é um menino de 13 anos de idade, colega de Luana na Escola Domênico Pillar, ele é muito inteligente. Guilherme tem uma pequena deficiência na perna esquerda, que apresenta uma redução de dois centímetros em relação a perna direita. Ele mora com sua mãe e pai, que são muito amorosos e cuidadosos com ele, é filho único. O problema na perna sempre foi uma limitação para que Guilherme pudesse participar de atividades físicas e socializar com os meninos do seu bairro e da escola. Por essa razão Guilherme é carente de amigos de meninos de sua faixa etária.

ROGÉRIO

Rogério é bombeiro, solteiro, tem 36 anos de idade, e é irmão de Maria Dandara. Sua profissão exige muita responsabilidade e gera uma certa pressão e ansiedade. Rogério pratica atividades físicas, sendo bem ativo durante o dia, e as vezes sai com amigos ou com a irmã Maria Dandara e a sobrinha Luana para passear. Porém, apesar de ser esse homem ativo, certos dias, ou mesmo em períodos do mesmo dia, tudo muda. Ele sente como se uma névoa entrasse em sua cabeça, seus pensamentos ficam bagunçados, alguns pensamentos ruins ficam em sua cabeça, seu trabalho já não o deixa tão animado, ele se desconecta e evita o contato com seus amigos e familiares.



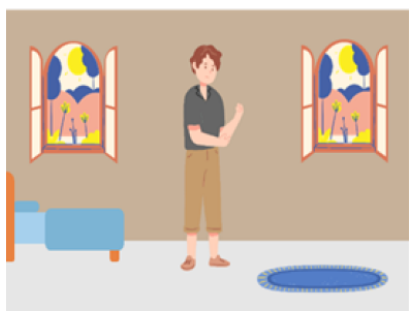
ROSAMARIA

Rosamaria tem 18 anos de idade, e está finalizando o ensino médio na Escola Domênico Pillar. Desde pequena ela se preocupa com o meio ambiente e com outras causas sociais, hoje ela participa de três ONGs (Organizações Não-Governamentais). Atualmente, além das ONGs, ela também coordena um projeto sobre controle de qualidade da água em sua escola intitulado: “QualiÁgua”. Rosamaria também gosta muito de praticar esportes. Em sua escola, há uma equipe de ginástica artística, a qual ela participa há 3 anos. Foi nessa equipe que ela conheceu Fernanda, e as duas estão em um relacionamento afetivo há 6 meses.



LUCAS

Lucas é um menino de 13 anos de idade proveniente de família bem estruturada economicamente, ele estuda na Escola Domênico Pillar, e é amigo de Luana. Ele gosta de jogar futebol e fazer trilhas nos matos dos arredores de sua casa. Ele é amigo de Luana. Lucas está iniciando a despertar o seu interesse por meninas. Ele tem encontros com algumas colegas da escola, embora sua mãe não permita que ele tenha uma namorada, pois isso vai prejudicar os seus estudos. Como ele não gosta muito de estudar, a mãe o controla com muito rigor, para que ele não seja reprovado e finalize o ensino médio.



ADÃO

Adão é um homem de 54 anos de idade e oriundo de família de agricultores. Adão é extremamente religioso, foi seminarista por dois anos, mas não continuou, saiu do seminário para casar com uma ex

vizinha. Atualmente, ele trabalha como balconista de uma farmácia, na qual já está há mais de 15 anos. Como ele se considera um conhecedor de doenças e tratamentos, ele indica e orienta a automedicação. Vários clientes vão fazer as suas “consultinhas” com Adão, que receita chás, fitoterápicos, analgésicos e rezas. Adão sempre diz que não acredita nas orientações dos profissionais de saúde, principalmente aqueles que atendem no SUS. A farmácia que Adão trabalha fica na mesma quadra da Escola Domênico Pillar.

PRIMEIRO CONTO: AJUDA DE UMA AMIGA

Iniciamos a nossa trajetória para entender um pouco sobre o SUS com a história de Lucas, que está iniciando a sua vida sexual. Ele está apresentando sintomas de uma infecção sexualmente transmissível, entretanto ele não entende o que está acontecendo e tem vergonha de perguntar. Vamos ver como o problema de Lucas vai ser resolvido.

Inicia o recreio na escola Domênico Pillar, Luana e Lucas se encontram.

- Oi Lucas! – Luana chama por ele – Tudo bem?

Então... – Responde Lucas meio envergonhado. Sabe, apareceu um caroço no meu pênis, meio avermelhado e duro, mas não dói, nem coça.

Nossa, Lucas! – Luana responde assustada – Você não foi ao médico ver? O que seus pais falaram?

Não, não, não! – Respondeu ele rapidamente – Não contei para meus pais.

Bem – Luana diz pensativa – Eu não sei o que é isso, mas posso perguntar para minha mãe e ver o que ela diz.

A noite, em casa, Luana conta a história de Lucas a sua mãe, que orienta a filha a pedir que Lucas compareça ao posto de saúde, mas como ele é menor de idade, o responsável por ele deverá acompanhá-lo. No dia seguinte, Lucas vai com sua mãe ao posto.

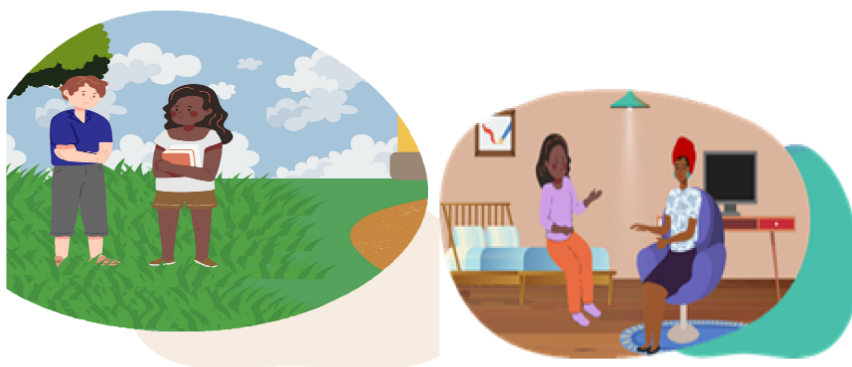
- Maria Dandara: Oi, Lucas, como está se sentindo?

Lucas: - Estou preocupado, apareceu um caroço avermelhado, o que pode ser?

Maria Dandara examina a região e pergunta – Lucas, você tem uma parceira ou um parceiro sexual?

A mãe de Lucas o olha com olhar de repreensão.

Bem Lucas, você pode estar com uma infecção sexualmente transmissível, a sífilis! - Explica Maria Dandara - Aqui, podemos fazer o exame para descobrir se é isso mesmo, mas não fique nervoso, existe tratamento e cura. O exame é rápido, tanto o teste diagnóstico quanto o tratamento estão disponíveis gratuitamente no SUS.



Agora vamos entender melhor o problema de Lucas:

O que é uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST)?

As IST são causadas por germes, como vírus e bactérias, elas são transmitidas principalmente por sexo desprotegido, quando uma pessoa infectada tem relação com outra sem o uso de preservativo, a camisinha masculina ou feminina.

O que é Sífilis???

A Sífilis é uma IST causada por uma bactéria chamada *Treponema Pallidum*. É uma das IST mais comuns, possui vários sintomas e fases, mas existe tratamento e cura. Um ponto muito importante é que mesmo curado de uma infecção por sífilis, é possível se contaminar novamente.

Como é o exame e diagnóstico e o tratamento?

O exame para sífilis é um teste rápido que utiliza apenas uma gota de sangue do dedo, em 30 minutos o resultado é obtido. O tratamento é feito com o uso de antibióticos, o mais usual é que seja aplicado na forma de injeção.

SEGUNDO CONTO: UMA IST PODE VIR DE ONDE MENOS SE ESPERA

Rosamaria gosta de exercitar-se, e está correndo no parque. De repente, ela começa a sentir uma mistura de formigamento e coceira na região genital, extremamente desconfortável. Ao final da corrida, ela vai para casa e toma banho. Ela observa uma região avermelhada no genital, o que a deixa preocupada, pois ela tem somente uma parceira – Fernanda. Ela vai dormir. No outro dia, a coceira intensa passou, entretanto ela sente uma ardência muito forte ao urinar. E fez um autoexame, e observou que a região genital estava com bolhas e extremamente dolorida. Rosamaria colocou os sintomas no google e leu que poderia ser uma ISTs, e a mais parecida com os sintomas seria a herpes genital. Ela, desesperada, liga para a namorada.

-Olá Fernanda, tudo bem? Eu estou com uma mancha vermelha, bolhosa e que coça muito na região genital.

- Rosamaria, eu estou com o mesmo sintoma na boca. Vamos ao posto de saúde agora mesmo.

No posto, Maria Dandara, faz o exame clínico e dá o diagnóstico de herpes, em ambas, e explica que provavelmente foi transmitido da via oral para genital.

Agora vamos estudar um pouco do que é esse tal herpes.

O que é Herpes?

Herpes é um vírus que causa infecções na pele ou mucosa (oral ou genital). As lesões são caracterizadas por bolhas e aspecto avermelhado, sempre tem uma coceira no início de sua erupção na pele. O líquido

dentro dessas bolhas está cheio de vírus, e é bastante contagioso. A infecção com herpes é para toda a vida.

Quais são as formas de transmissão?

O herpes é facilmente transmitido, basta o contato da mucosa com o líquido que é liberado das bolhas contaminadas. Uma pessoa com o herpes ativo (com as bolhas) pode usar um objeto (toalha, lenço, superfície de uma mesa...) e a próxima pessoa que entrar em contato com esse objeto, sem lavá-lo, será contaminada.

Como se faz o diagnóstico e tratamento?

O Diagnóstico é feito pela presença da lesão na pele, que pode durar até 15 dias. O tratamento é feito somente quando o herpes está ativo, nesse caso usa-se antivirais como o aciclovir. O SUS fornece gratuitamente o tratamento para o herpes.



TERCEIRO CONTO: UM PAPO ENTRE MÃE E FILHA

Luana, como sempre curiosa, conversando com a mãe pergunta mais sobre o amigo e as ISTs. Sabendo da importância de orientar Luana sobre esse assunto, Maria Dandara resolve conversar com a filha sobre o Vírus do Papiloma Humano (HPV).

Maria Odete diz a filha – Luana, vou te falar sobre o HPV.

Luana – Eu lembro que a senhora me levou para tomar a vacina contra o HPV.

Maria Dandara – Primeiro vou te dizer o que é o HPV

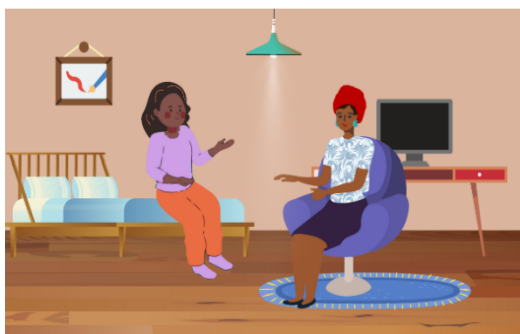
Ele é conhecido como vírus do papiloma humano, ele tem esse nome em razão das lesões que ele causa na pele, que têm formato de verruga. As verrugas do HPV podem aparecer na pele ou nas mucosas, por exemplo boca e sistema genital. É importante que você saiba que o principal problema relacionado com o HPV é o câncer que ele pode causar. Nem sempre acontece.

Mãe, e como ele pode ser transmitido?

Maria Dandara: - Bem, o vírus pode ser transmitido através de qualquer forma de sexo, desde que tenha contato de pele com pele, pele com mucosa ou mucosa com mucosa, claro que uma das pessoas deve ter a verruga.

Luana: Qual a prevenção?

Maria Dandara: - O ideal é evitar qualquer contato sexual quando há suspeita de infecção, e é claro, ter sido vacinado contra o HPV.



QUARTO CONTO: UM MENINO QUE GOSTA DE ESTUDAR

Guilherme está no primeiro ano do ensino médio, e montou um trabalho sobre o vírus da imunodeficiência humana (HIV) para a dis-

ciplina de Ciências. Como Guilherme é muito dedicado e inteligente, seu trabalho foi excelente, e ele foi convidado a apresentar para outras turmas da escola. Então chega o dia, e Guilherme, bem nervoso, entra na sala de aula do segundo ano do ensino médio, projeta os seus slides e começa a falar;

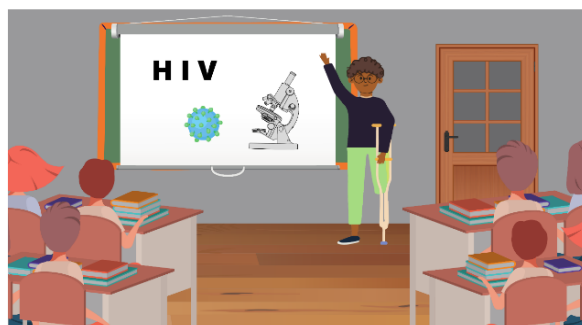
Guilherme explica:

- HIV é um vírus que infecta as células do sistema imunológico, principalmente os linfócitos, que com o tempo, se não tratado, a pessoa infectada entra em imunossupressão profunda, o que caracteriza a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

- O diagnóstico do HIV é feito por meio de testes imunológicos. O mais fácil e rápido de fazer é o teste rápido, que detecta anticorpos desenvolvidos contra o vírus, e também partes do próprio vírus que estejam no sangue.

- O tratamento do HIV é feito com medicamento conhecidos como antirretrovirais, que reduzem a quantidade de vírus no corpo, mas não curam a pessoa infectada. Ainda não existe vacina contra o HIV.

Guilherme: - Pessoal, selecionei esse texto sobre o HIV, e que também esclarece o papel do SUS da epidemia desse vírus. Eu vou ler em voz alta.



No Brasil, o acesso aos antirretrovirais é universal e ofertado pelo SUS, norteados pela Lei nº 9.313 de 1996. A partir do ano de 1999 foram implementados no Brasil a testagem rápida para detecção do HIV, esse teste é disponibilizado em unidades de saúde e sem custo algum para

a pessoa. A transmissão do HIV é por via sexual sem o uso do preservativo, compartilhamento de seringas, de mãe para o bebê durante a gestação, parto ou amamentação. Hoje, no SUS, o tratamento é eficaz, e em 2 meses o paciente apresenta carga viral indetectável, isso significa que o vírus não estão se multiplicando no organismo deste indivíduo.

QUINTO CONTO: UMA MENINA QUE QUER SABER DAS COISAS

A curiosidade de Luana nunca acaba. Maria Dandara é mãe solteira, e Luana nunca conheceu o seu pai, uma situação que preocupa muito a menina. Um dia, no café da manhã, Luana questiona a mãe sobre a gravidez dela e como ela enfrentou tudo sozinha.

Luana: - Mãe, pode me contar sobre o meu nascimento?

Maria Dandara: - Bem Luana, vou te contar essa história com detalhes, afinal você já é uma menina de 14 anos, e acredito que esteja pronta para entender.

Maria Dandara diz: - Minha filha, eu fiquei grávida de você de uma forma não planejada. Estava no último ano do ensino médio, tinha um namoradinho na escola, com o qual mantinha relações sexuais sem o uso de preservativos.

Luana questiona: - mas mãe, por que a senhora não usou anticoncepcionais? ". A mãe responde - Eu usava pílulas anticoncepcionais, entretanto algumas vezes eu esquecia de tomar, em outras eu ficava com preguiça de ir ao posto e saúde buscar. Quando descobri a gravidez, fui procurar apoio no próprio posto, pois uma amiga me disse que no SUS eu teria assistência no programa de saúde da família (PSF). Esse programa auxilia mães em situação de gravidez não desejada na adolescência.



SEXTO CONTO: SAÚDE MENTAL TAMBÉM É ASSUNTO DO SUS

Rogério está passando por um período bem difícil na sua vida, ele está infeliz e não tem o menor ânimo para resolver os problemas. O turno do plantão do bombeiro Rogério inicia às 07h da manhã. Entretanto, o dia é segunda-feira, Rogério está muito desanimado e, mais uma vez, atrase-se para o início de seu plantão no batalhão de incêndio, chegando às 07h:42min.

Supervisor de Rogério: - Soldado, neste pelotão não são tolerados atrasos, você receberá uma suspensão como forma de detenção.

Supervisor de Rogério: - Rogério, você é um bom bombeiro, mas está com sérios problemas psicológicos, vou te encaminhar para o serviço psiquiátrico dos bombeiros.

Na consulta com o psiquiatra Rogério relata problemas na família, e também financeiros, que são somados a uma insatisfação com a sua vida. Ele também relata insônia, tristeza, ansiedade e falta de vontade. O psiquiatra faz o diagnóstico de ansiedade generalizada e princípio de quadro depressivo. Ele receita um medicamento para dormir e mais um antidepressivo para Rogério.

Rogério tira dúvidas com sua irmã médica.

- Rogério: - Maria, qual a diferença entre ansiedade e depressão?

- Maria Dandara: - A ansiedade surge de uma preocupação ou incerteza sobre algo, que gera um estado neurológico de alta atividade cerebral, a pessoa pode sentir inquietude, palpitações, dores de cabeça, falta ou excesso de apetite e insônia. A ansiedade sempre tem uma causa ou gatilho, ela pode ser aguda, se passageira, ou generalizada, se a pessoa fica quase que permanentemente ansioso. Já a depressão é um quadro mental mais avançado, caracterizado por uma tristeza muito profunda e que não melhora com o passar dos dias. A pessoa com depressão acredita não ter mais capacidade de sentir prazer ou alegria.

- Rogério: - Como é o tratamento destas doenças, e quanto tempo demora para ficar curado?

- Maria Dandara: - O tratamento de ambas é feito com ajuda de um psiquiatra e/ou psicólogo. Inicialmente, deve ser identificado se a pessoa tem ansiedade ou ansiedade e depressão juntas. A partir daí é montado um tratamento que pode ser apenas ou uso de medicamento, terapia, ou ambos. Tempo? Olha, algumas pessoas melhoram em alguns meses e tratamento, outras em um ano, e muitas demoram anos para apresentar uma melhora significativa.

Rogério: - O que o SUS oferece para estas doenças?

- Maria Dandara: - O SUS fornece as consultas psiquiátrica e psicológicas, assim como os medicamentos necessários, pelo tempo que for preciso. Existe uma rede de atenção psicossocial representada pelos Centros de Atenção Psicossocial (CAPS).



SÉTIMO CONTO: QUALIDADE DA ÁGUA TAMBÉM É SAÚDE

A Escola Domênico Pillar tem um pátio bem arborizado e agradável para os alunos ficarem durante os intervalos. No fundo da escola existe uma enorme paineira, na qual vive uma família de mais de trinta pombos. Entretanto, as raízes dessa paineira estão comprometendo os canos de água da escola, existe uma ruptura e vazamento que forma um pequeno lago no qual os pombos bebem água e tomam banho, os alunos adoram assistir.

Rosamaria - Mas o que é aquilo? A água do banho dos pombos está se misturando com a da escola? Parem tudo! Temos que isolar esse cano e chamar o serviço de água e esgoto para consertar. Essa água, além da contaminação pela terra, está sendo contaminada pelos dejetos dos pombos. A potabilidade da água está comprometida!!!

Aluno da segunda série: - O que é potabilidade comprometida?

Rosemaria - Potabilidade da água indica a qualidade para consumo humano. Se a potabilidade está comprometida, a água está contaminada. Vocês sabiam que o controle da qualidade da água e gestão de resíduos estão ligados ao SUS?

Alunos que estão ao redor dos pombos: - Como assim? O SUS não é somente para tratamento de doenças?

Rosamaria: - O SUS é responsável pelo cuidado com a saúde, o que envolve o saneamento básico. No Brasil, quem regulamenta e controla isso é a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), um órgão do Ministério da Saúde. Dentro do SUS, cabe à FUNASA a responsabilidade de alocar recursos para ações de saneamento, financiando a universalização de sistemas de abastecimento de água potável, esgotamento sanitário e gestão de resíduos sólidos urbanos.



OITAVO CONTO: VACINAR É PRECISO!

O dia em que a vacina contra COVID-19 foi disponibilizada para aplicação em farmácia, Guilherme vai com sua mãe, pois ela tem 45 anos, e sua faixa etária é contemplada. Eles se dirigem a Farmácia Geral, onde Adão trabalha. Nesse dia, Guilherme discute e explica para Adão a importância das vacinas.

Guilherme: - Olá, estou aqui com a minha mãe para que ela tome a vacina contra o SARS-CoV-2. - Adão comenta com a mãe de Guilherme: - Essas vacinas são muito novas, não são seguras, você nem sabe o que está colocando no seu braço!

Guilherme: - As vacinas contra o SARS-Cov-2 até podem ser novas, mas elas foram feitas a partir de um grande conhecimento acumulado de muitos anos de estudos e pesquisas experimentais – Nenhuma vacina é aplicada sem se conhecer a sua segurança, existem órgãos no

mundo tudo que fiscalizam isso, aqui no Brasil a fiscalização é feita pela Agência Nacional e Vigilância Sanitária (ANVISA).

Adão: - Eu não acredito nisso! Essa vacina é a segunda fase de um plano Chinês para dominar o mundo. Eu mesmo já tratei pessoas que passaram mal após uso dessa vacina.

Guilherme: - Bem, eu aprendi na escola que esses sintomas são normais e esperados. As vacinas atuam ensinando nosso corpo a se defender de determinadas doenças causadas por micro-organismos invasores, assim quando entrarmos em contato com esses germes, o corpo já aprendeu a se defender. No Brasil, o SUS fornece todas as vacinas básicas de forma gratuita. Vacinas contra a gripe, sarampo, catapora, febre amarela, HPV, COVID-19, tuberculose, tétano e muitas outras estão disponíveis nos postos de saúde.



É importante manter a carteira de vacinação em dia.

REFERÊNCIAS

Viacava, F., Oliveira, R.A.D. de, Carvalho, C. de C., Laguardia, J., Bellido, J.G.: 'SUS: oferta, acesso e utilização de serviços de saúde nos últimos 30 anos' Cien. Saude Colet., 2018.

Paim, J.S.: 'Sistema Único de Saúde (SUS) aos 30 anos' Cien. Saude Colet., 2018.

Lamy, M., Hahn, M.M., Menezes Roldan, R.: 'O DIREITO À SAÚDE COMO DIREITO HUMANO E FUNDAMENTAL' Rev. Em Tempo, 2018.

Fundação Nacional de Saúde: 'Fundação Nacional de Saúde Fundação Nac. Saúde, 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo de assistência farmacêutica em DST/HIV/Aids: recomendações do Grupo de Trabalho de Assistência Farmacêutica, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília. Ministério da Saúde, 224p. 2010.