



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Desenvolvimento e avaliação imunológica de Nanotubos de
Carbono funcionalizados com a proteína de envelope de
*Dengue virus 3***

RUIZ GERHARDT ASTIGARRAGA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário à formação como Mestre em Microbiologia.

Orientação: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Belo Horizonte
Fevereiro de 2011

**Desenvolvimento e avaliação imunológica de Nanotubos de
Carbono funcionalizados com a proteína de envelope de
*Dengue virus 3***

RUIZ GERHARDT ASTIGARRAGA

Belo Horizonte
Fevereiro de 2011

Agradecimentos

Nesse momento é difícil encontrar palavras para agradecer a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que todos esses anos de caminhada culminassem na conclusão desse trabalho. Foi mais uma etapa vencida e muitas pessoas tiveram participação essencial em todo esse processo. Gostaria muito de agradecer:

Aos meus pais, Renê e Silvia, por serem meus exemplos, por me ensinarem muito, por não deixarem que nada faltasse e pela criação que tive que, com certeza, definiu vários aspectos da minha personalidade e meu caráter. Também à minha irmã Júlia, por que sei que podemos contar um com o outro para tudo que vier a acontecer! À minha avó Adelina por também me ensinar muito e ser um exemplo para minha vida. Ao vovô Ney (*in memoriam*), muitas lembranças e muita saudade! E à Tia Leila por estar mais presente na nossa vida agora!

Ao meu orientador Prof. Flávio da Fonseca, por me dar a grande oportunidade de poder conduzir esse projeto, iniciando essa nova e desafiadora linha de pesquisa, que, com certeza, renderá ótimos frutos! Obrigado pela confiança depositada em mim e, acima de tudo, pela amizade!

À Alice, minha aluna de Iniciação Científica, que teve um papel importantíssimo nessa fase final do trabalho, não só pela inestimável ajuda nos experimentos, mas também pela amizade, conversas científicas ou não, e, principalmente, por me ajudar a ser mais organizado no dia-a-dia do laboratório. Muito obrigado por tudo!!

A todos os colegas do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, antigos LVC e LaBMiC. É com muita alegria que agora somos todos uma única equipe e tenho certeza que ainda chegaremos muito longe! Agradecimentos especiais à Prof^a Edel. Aproveito também para agradecer aos amigos Fabis, Leandro, Bárbara, Dani e Lorena pela ajuda em diversos experimentos!

Aos nossos colaboradores do Laboratório de Vírus: Prof^a Erna Kroon, Eliseu Rocha e João Rodrigues nas etapas de produção das proteínas, ELISA e PRNT. Em especial ao Eliseu, por sua grande ajuda, boa vontade e paciência na realização dos nossos experimentos. Sem sua parceria nesse trabalho, com certeza muito não teria sido alcançado! À Leandra Figueiredo pela relatoria da

Dissertação. Também a todos os amigos do Laboratório de Vírus de hoje e sempre, desde a época da Iniciação Científica até os longos períodos que passei lá durante o mestrado.

Ao Prof. Ary Correa Jr. e ao Leonardo Rodrigues que, graças a todos os ensinamentos, dicas, técnicas e interessantes opiniões, fizeram despertar meu interesse por essa inovadora área chamada Nanotecnologia!

Ao Prof. Ado Jório e à Jaqueline Soares, do Departamento de Física do ICEX/UFMG, pelas medições na Espectroscopia Raman, e também por permitir o conhecimento de um campo totalmente novo no qual eu nunca imaginaria trabalhar.

Aos nossos colaboradores do Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro: Prof^a Danielle Souza, Vivian Vasconcelos, Caio Fagundes, Ana Carolina Fialho e Lucas Ribeiro pela parceria nas etapas de e pelas produtivas discussões científicas. Em especial à Vivian pela enorme disponibilidade, boa vontade e seriedade em nosso trabalho!

E, como não poderia deixar de ser, aos meus grandes amigos que fiz na Biologia e fora dela durante os anos de Graduação e Mestrado. Pessoas que estarão presentes na minha vida hoje e sempre! Foram tantos momentos juntos, festas, viagens, risadas, fatos e acontecimentos que nos levam a pensar que realmente estamos vivendo os melhores anos de nossas vidas. Seria injusto citar nomes, pois sempre esquecemos alguém e o espaço é curto, mas vocês sabem quem são. Contem sempre comigo!

Ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia e seus funcionários, pela oportunidade e boa vontade que permitiu a boa execução desse trabalho.

À banca examinadora, pela disponibilidade em aceitar o convite para avaliação dessa Dissertação.

E, claro, às agências financiadoras, CAPES, CNPq e FAPEMIG, e ao INCTV, sem os quais a realização desse trabalho não seria possível.

Muito obrigado a todos!

Resumo

A dengue é considerada a doença infecciosa de maior impacto epidemiológico no Brasil e, cada vez mais, aumenta-se a necessidade de investimento em pesquisas envolvendo esse vírus. Um dos passos do desenvolvimento de uma vacina contra o *Dengue virus* (DENV) é a necessidade da imunização ser eficaz para os 4 sorotipos, mas apesar dos esforços de muitos grupos de pesquisa, nenhuma delas está disponível atualmente. No nosso estudo, utilizamos a tecnologia dos Nanotubos de Carbono (NTC) para construção de uma ferramenta testada como imunógeno experimental contra o DENV. NTCs possuem diversas aplicações devido às suas propriedades únicas, como biocompatibilidade, alta relação superfície/volume e capacidade de internalização em células. Na área biológica, pode-se citar o transporte e disponibilização de drogas, proteínas e genes em células, e também a apresentação de biomoléculas em sistemas biológicos. Estudos anteriores mostraram que a ligação de NTCs com antígenos tem potencial imunogênico. Sabe-se que a proteína do envelope (E) do DENV é imunodominante, sendo gerada uma resposta imune protetora e vitalícia para o mesmo sorotipo do vírus. O gene da proteína E de *Dengue virus* 3 (DENV3E) foi inserido no vetor plasmidial pQE9 para expressão em *Escherichia coli*, linhagem M-15. Em seguida, a proteína produzida foi purificada e utilizada para ligação covalente em NTCs de paredes múltiplas (MWNT). Esse processo é chamado de funcionalização e consiste na reação de amidação ativada por diimida entre os radicais amínicos da proteína e as porções carboxiladas dos MWNT, gerando a ferramenta MWNT-DENV3E. A eficiência da funcionalização foi verificada por SDS-PAGE e Espectroscopia Raman. Avaliações preliminares após a imunização de camundongos BALB/C mostraram a produção de altos títulos de anticorpos e aumento na proliferação dos linfócitos antígeno-específicos *in vitro*. Camundongos imunizados com MWNT-DENV3E foram infectados com uma amostra adaptada de DENV-3, apresentando sinais clínicos da doença, como aumento na carga viral, na atividade de MPO e nas transaminases hepáticas, altos níveis de TNF- α no baço e trombocitopenia. Esses resultados sugerem um quadro de exacerbação da resposta desencadeada pela imunização, uma vez que animais imunizados separadamente com DENV3E e MWNT mostraram indícios de proteção ao , sendo capazes de controlar a multiplicação viral. Mais estudos deverão ser realizados para elucidar os mecanismos envolvidos, para melhor se compreender as interações entre a imunopatogênese das infecções por DENV e o impacto do uso dos NTCs nos sistemas biológicos, e assim melhor se avaliar o potencial do imunógeno desenvolvido.

Abstract

In terms of epidemiologic impact, Dengue (DENV) infections represent the most important infectious disease in Brazil. Consequently, the development of an efficient vaccine is considered a high priority. Due to this fact, many studies are being developed towards this goal, but no vaccine is currently available to the population. Carbon Nanotubes (CNT) have been broadly studied due to their exceptional properties such as biocompatibility, high aspect ratio and cell internalization ability. Their use has been proposed for many applications such as a delivery system of drugs, proteins and genes to cells, and also presentation of biomolecules to biologic systems, including to the immune system. In this work, we have used the CNT technology to build an experimental immunogen against DENV. CNT functionalized with antigens have immunogenic potential, as shown in previous studies. The DENV envelope (E) glycoprotein is an immunodominant protein that generates serotype-specific protective response upon its presentation to the immune system. The E protein gene from *Dengue virus 3* (DENV3E) was cloned in pQE9 vector and expressed in *E. coli* strain M-15. The produced protein was purified and covalently bound to Multi-Walled CNTs (MWNT) by treatment with diimide-activated amidation, in which amine radicals from the recombinant protein bind to carboxylic portions on the CNT surface. The functionalization efficacy was successfully verified by Raman Spectroscopy and the developed tool was called MWNT-DENV3E. Preliminary immunologic evaluation after 3-dose BALB/C mice immunization showed high antibody titers and antigen-specific lymphocyte proliferation. Clinical signs of infection were verified upon challenge with a mouse-adapted DENV-3 strain after mice immunization with MWNT-DENV3E, such as high viral load in spleen and blood, high MPO activity, high liver transaminase level, high TNF- α production and thrombocytopenia. These results suggest an enhancement of infection, once mice separately immunized with DENV3E or MWNT showed significant levels of protection upon challenge, being able to control viral replication. Thus, more studies are needed to clarify these mechanisms and better understand the interactions between DENV immunopathogenesis and the impact of CNT application in biological systems, in order to better evaluate the full potential of this new immunogen.