

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Laboratório de Virologia Básica e Aplicada

**Caracterização da resposta imune induzida pelo vírus
Vaccinia Ankara modificado (MVA) em modelo murino**

Lorena Falabella Daher de Freitas

Belo Horizonte
2011

Lorena Falabella Daher de Freitas

**Caracterização da resposta imune induzida pelo vírus
Vaccinia Ankara modificado (MVA) em modelo murino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Co-orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Maria Siqueira Ferreira

Belo Horizonte

2011

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao Flávio, pela orientação, pela agradável convivência e por acreditar no meu potencial me presenteando com esse projeto.

À minha co-orientadora, Jaque, pela amizade e pelo companheirismo durante os experimentos. Obrigada por estar sempre disponível.

À professora Juliana, por toda colaboração dada a este trabalho. Obrigada por compartilhar comigo o seu conhecimento e a sua experiência.

À professora Edel, por nos proporcionar mais sabedoria com a sua convivência enriquecedora e por nos trazer novos colegas de laboratório.

Aos pesquisadores Andréa Teixeira e Jônatas Abrahão, membros da banca, pelas sugestões que enriquecerão este trabalho.

Aos meus antigos orientadores que me serviram de exemplo e me iniciaram no caminho da Ciência.

À minha vovó Dirce pelo amor e exemplo de vida.

Aos meus pais por me permitirem chegar até aqui. Obrigada pelo carinho, dedicação total, paciência e incentivo.

Aos meus irmãos por tornarem a minha vida mais bela e menos solitária. Té, obrigada pelo companheirismo todos esses anos.

Ao Rafael, meu amor, por estar sempre ao meu lado me incentivando em todos os momentos. Obrigada por colaborar neste projeto. Sem você tudo seria muito mais difícil.

À minha segunda família por me acolherem como filha.

Aos meus antigos colegas de laboratório que, cada um a sua maneira, me ensinaram com toda a paciência as técnicas que sei hoje. Em especial, agradeço ao Daniel, Cynthia, Glau, Aline e principalmente a Dani.

Aos amigos do centro de pesquisa René Rachou por terem me acolhido durante o meu primeiro ano de mestrado e por terem me ensinado quase todas as técnicas que utilizei no desenvolvimento deste trabalho. Em especial agradeço à Rafa pela amizade e simpatia e ao Marcos por toda ajuda prestada.

Aos meus novos companheiros de laboratório pela agradável convivência diária, pelas contribuições e pela amizade. Obrigada Dany, pelos momentos de descontração. Obrigada Fabis pelo carinho e doçura. Obrigada Bárbara por estar sempre disposta a me ajudar.

À Tânia Mara, pelos cuidados de mãe e por me defender sempre!

Aos amigos do lab. Vírus por toda ajuda, alegria e aprendizado.

Aos meus companheiros de mestrado por tornarem essa caminhada mais agradável. Obrigada pelas fofocas no corredor, pelos longos e divertidos almoços na cantina e pela companhia durante todas as matérias cursadas.

Aos meus amigos da biologia. Obrigada a todos que compartilharam comigo os quatro anos mais fantásticos da minha vida. Obrigada, Renê, por estar sempre presente. Obrigada, Lígia, pela sua alegria. E muito obrigada, Má, Lice, Rê, pela amizade sincera, pelos consolos nas horas difíceis, pelas viagens deliciosas, pelas noites de buraco e fofoca, enfim, por fazerem parte da minha vida.

Aos tios e tias da biologia por me proporcionarem os melhores e mais divertidos momentos durante toda a faculdade.

Às minhas amigas de escola. Obrigada Lena, Livia, Má e Jú por todos esses anos de convívio. Sem vocês, com certeza a minha vida teria menos graça. Amo muito vocês.

A todos do Departamento de Microbiologia pelos serviços prestados e pela convivência amigável.

Às agências financiadoras de pesquisa que investiram no meu trabalho e formação acadêmica.

E finalmente, à UFMG, que me fez sentir em casa durante esses vários anos de estudo.

RESUMO

Desde 1796, quando o médico inglês Edward Jenner introduziu a vacinação, esse método se tornou a mais importante intervenção desenvolvida para prevenção de doenças infecciosas. Entretanto, nenhuma das estratégias vacinais utilizadas até hoje conseguiu conter todas as vantagens necessárias para uma vacina ideal. Nesse cenário os vetores virais recombinantes aparecem como uma proposta promissora no desenvolvimento de novas vacinas e no melhoramento das já existentes. O vírus *Vaccinia Ankara* modificado (MVA), membro da família *Poxviridae*, foi gerado por mais de 570 passagens em culturas de fibroblasto de embrião de galinha. Após essas passagens, um vírus altamente atenuado e incapaz de se multiplicar na maioria das células de mamíferos foi obtido devido a perda de cerca de 15% do seu genoma parental. Essa perda incluiu genes relacionados com a imunorregulação do hospedeiro, evasão do sistema imune e com o espectro de hospedeiros. Devido a essas características, o MVA é considerado um vetor vacinal seguro e vem sendo utilizado na tentativa de produzir novas vacinas. Estudos recentes do nosso grupo mostraram que as infecções naturais causadas por amostras de *Vaccinia virus* (VACV) circulantes no Brasil induzem uma modulação negativa do sistema imune do hospedeiro. Em função da similaridade genética entre o MVA e os isolados de VACV, tornou-se interessante investigar se o primeiro induziria o mesmo padrão de resposta, o que não seria benéfico para um bom vetor vacinal. Portanto o objetivo deste trabalho foi estudar a resposta imune desencadeada pela infecção de camundongos por MVA e compará-la com outras duas amostras de VACV: a amostra replicativa vacinal, Lister (LST), e a amostra virulenta Western Reserve (WR). Para alcançar esse objetivo quatro grupos contendo sete camundongos BALB/c, com idade entre seis e sete semanas, foram infectados pela via intranasal com as amostras MVA, LST ou WR. O grupo controle foi inoculado apenas com solução salina. Após 7 ou 14 dias de infecção os baços foram coletados para ensaios de proliferação, análise do perfil de ativação celular e quantificação da produção de citocinas intracitoplasmáticas. Os resultados mostraram uma modulação negativa tanto do perfil de ativação celular quanto da produção de citocinas das células do baço induzida pelo vírus WR. Em contrapartida a amostra MVA apresentou um perfil similar ao do grupo controle. Portanto, esses resultados podem ser atribuídos à perda dos genes de imunoregulação durante o processo de atenuação da amostra MVA e são características desejáveis para um bom vetor vacinal.

ABSTRACT

Since 1796, when the British physician Edward Jenner introduced the concept of vaccination, it became the most important intervention strategy developed to prevent the onset of infectious diseases. Nevertheless, none of the existing vaccines has managed to present all advantages that make an ideal vaccine. In this context, recombinant viral vectors appear as a promising tool for the development of new vaccines as well as for the improvement of the existing ones. The *Modified Vaccinia virus Ankara (MVA)*, a member of the *Poxviridae* family, was generated after more 570 passages in chicken embryo fibroblasts. After that, a virus highly attenuated and unable to replicate in mammalian cells was obtained, due to the loss of approximately 15% of its parental genome. The loss included genes related to host immune regulation, immune evasion and host range. Thus, the MVA is considered a safe vaccine vector, and has been used in our lab in attempts to generate new vaccines. Recent studies from our group have shown that natural infections caused *Vaccinia virus (VACV)* strains circulating in Brazil induced a down-modulation of the host immune system. Due to the genetic similarity between MVA and the virulent VACV isolates, we decided to investigate whether MVA could induce a similar response pattern, which is not desirable in a good vaccine vector. Therefore, the aim of this work was to study the immune response generated after the MVA infection in mice, comparing it with infections caused by two other VACV strains: the Lister (LST) replicative vaccine strain and the virulent Western Reserve (WR) strain. In order to reach those aims, 4 groups composed of 7 BALB/c mice, 6 to 7 weeks old, were intranasally infected with MVA, LST or WR strains. A control group was inoculated with PBS. After 7 or 14 days, their spleens were collected in order to evaluate cell proliferation, cell activation profile intracytoplasmatic cytokine production. Results showed a down modulation in the cell activation profile and in the cytokine production in spleen cells from animals infected with WR. On the other hand, cells from the MVA-infected animals presented a profile similar to that of the control group. These results may be attributed to the loss of immune regulation genes during the MVA attenuation process, and are desirable characteristics in a good vaccine viral vector.

