

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**GERAÇÃO DE IMUNÓGENOS PARA HERPESVIROSES  
BOVINAS UTILIZANDO A TECNOLOGIA DOS  
NANOTUBOS DE CARBONO**

**Aline Aparecida Silva Barbosa**

**Belo Horizonte**

**2013**

Aline Aparecida Silva Barbosa

**GERAÇÃO DE IMUNÓGENOS PARA HERPESVIROSES  
BOVINAS UTILIZANDO A TECNOLOGIA DOS  
NANOTUBOS DE CARBONO**

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

INCIPIT VITA NOVA

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Belo Horizonte

2013

## AGRADECIMENTOS

“Nesse fio estreito, esticado feito corda bamba, nos equilibramos todos. Sombrinha erguida bem alto, pé ante pé, bailarinos destemidos do fim deste milênio pairando sobre o abismo. Lá embaixo, uma rede de asas ampara nossa queda.”

Meu muito obrigada a todos os meus anjos...

À professora Edel, pela orientação, pela confiança depositada em mim e neste trabalho, pela paciência, pelos conselhos e sobretudo pela amizade. Agradeço também ao professor Flávio, pela colaboração imprescindível para a realização deste projeto. Vocês são tão queridos!

Agradeço à Amanda, ao Mateus e à Marcela pelo muito que me ajudaram e ensinaram, e por serem, acima de tudo, grandes amigos. Herpesvírus é para sempre! A todos os amigos do LVBA, os antigos e os atuais: Jaque, pela imensa ajuda na realização deste trabalho, Dany (minha escritora preferida!), Paula, Fabis, Ló, Bárbara, Iracema, Fernando, Débora, Ju, Alice, Gaby, Lorena, Luis, Vinícius, Leandro, Thiago, Luiz. Um agradecimento especial à Tânia Mara, por colocar tudo nos eixos e por cuidar de todos nós.

Ao Victor, pela ajuda na execução dos experimentos, pelas risadas nos intervalos e pela amizade sempre.

À banca examinadora, pela disponibilidade e prestatividade.

Às instituições financiadoras, CNPq, CAPES e FAPEMIG, por fornecerem as bases para a realização deste trabalho.

Aos amigos da graduação, Hakuna Matata, e aos professores por todo o ensinamento nessa ciência maravilhosa que é o estudo da vida. Em especial, à Christiane, por ter dividido a bancada comigo na primeira aula de CHG e por ter permanecido ao meu lado durante todos esses anos, compartilhando tantas coisas em comum, em especial a paixão pelos livros (e filmes!) de qualidade duvidosa.

Aos amigos do Mestrado, vocês são incríveis!

Aos amigos de Nepré, por me darem motivos para sempre querer voltar...

Ao Allysson, por tantas histórias compartilhadas, por estar ao meu lado sempre, e por muito mais motivos do que eu seria capaz de agradecer.

Ao André, pelos conselhos, pela torcida, pela amizade e até mesmo pelas broncas.

Às amigas desde o colégio: Cintia, Michelli, Juliana, Alininha e Wonna. São histórias muito divertidas para valerem sempre um reencontro! Um agradecimento especial à Cintia (Cidinha para os íntimos), a melhor amiga que se pode desejar, desde sempre. Obrigada por todos os bons momentos, miguinha.

Aos meus pastores e amigos queridos, André e Michelli, pelo carinho e amizade, por todas as orações e por sempre torcerem pela minha vitória.

À minha família, mamãe, pai e vó Ilda, por terem sempre acreditado nos meus sonhos, por maiores que fossem, e por terem feito tudo e mais um pouco para torná-los realidade. Essa conquista é nossa... Amo vocês!

E, por fim, agradeço a Deus, por tudo. Teus propósitos me trouxeram até aqui, que a Tua vontade seja feita em minha vida! "Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre." (Carta de Paulo aos Romanos, capítulo 11).

*“O homem nasceu para aprender, aprender tanto quanto a vida lhe permita.”*

*Grande Sertão: Veredas, João Guimarães Rosa*

## RESUMO

Os herpesvírus bovinos 1 e 5 (*Bovine herpesvirus 1* – BoHV-1 e *Bovine herpesvirus 5* – BoHV-5) são responsáveis por uma variedade de síndromes respiratórias, reprodutivas e neurológicas, estando amplamente disseminados nos rebanhos bovinos ao redor do mundo, com diferentes taxas de prevalência. No Brasil, ambos os vírus apresentam alta prevalência e representam um grave problema econômico, uma vez que a pecuária é responsável por significativa parcela do produto interno bruto nacional. O controle destes agentes infecciosos é complexo e a vacinação tem sido a estratégia mais utilizada, ainda que a eficácia das vacinas disponíveis atualmente seja limitada. A técnica de produção de proteínas recombinantes tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta para geração de moléculas utilizadas na prevenção e tratamento de várias doenças. Recentemente, nosso grupo desenvolveu duas moléculas recombinantes contendo, cada uma, quatro epítopos de proteínas do BoHV-1 ou BoHV-5 (gB, gD e VP8). Os nanotubos de carbono (NTC) apresentam importantes características, como biocompatibilidade, alta relação superfície/volume e capacidade de internalização em células, tendo recebido especial atenção nos últimos anos devido a sua utilização como carreadores de antígenos vacinais. Neste trabalho, a tecnologia dos NTC foi utilizada para geração de imunógenos experimentais contra os herpesvírus bovinos. As proteínas recombinantes expressas em vetor procarioto foram purificadas e acopladas aos NTC de paredes múltiplas, por meio de funcionalização covalente. A eficiência da funcionalização foi corretamente verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida e por espectroscopia Raman. Os imunógenos apresentaram baixa citotoxicidade e foram reconhecidos por anticorpos presentes no soro de bovinos naturalmente infectados. As ferramentas geradas foram testadas em modelo murino C57Bl/6, associadas ou não ao adjuvante vacinal alúmen, para avaliação de sua imunogenicidade. A associação aos NTC potencializou a resposta imune celular *in vivo*, com maior frequência de ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+. Os animais que receberam as diferentes formulações contendo as proteínas recombinantes apresentaram um perfil Th-2/Th-17 de citocinas, com destaque para IL-6, IL-13 e TGF- $\beta$ 1. Uma vez que as proteínas recombinantes foram desenhadas segundo o padrão de reconhecimento de epítopos virais em bovinos, não foi possível realizar uma análise global da resposta imune humoral, ainda que as moléculas tenham sido imunogênicas. Dado que as ferramentas foram geradas com sucesso e as análises iniciais são promissoras, novos estudos deverão ser realizados, especialmente em outros modelos animais, possibilitando uma melhor avaliação dos imunógenos desenvolvidos.

Palavras chave: herpesvírus bovinos, modelo murino, nanotubos de carbono, vacinação.

## ABSTRACT

Bovine herpesviruses 1 and 5 (BoHV-1 and BoHV-5, respectively) are closely related alphaherpesviruses infecting cattle and co-infection is likely to occur. Both viruses are associated with neurological, respiratory and reproductive disease, causing great economic losses. Vaccination has been recommended in control programs, although to date there is no vaccine capable of establishing a protective immune response against both viruses. Recombinant proteins have been widely used for production of helpful molecules employed in prevention and treatment of several diseases. Recently, our group created two recombinant multiepitope proteins containing, each one, four immunodominant linear epitopes of BoHV-1 or BoHV-5, respectively. Carbon Nanotubes (CNT) have been broadly studied due to their exceptional properties such as biocompatibility, high aspect ratio and cell internalization ability, and CNT functionalized with antigens have immunogenic potential, as shown in previous studies. In this work, we have used the CNT technology to build experimental immunogens against BoHV-1 and BoHV-5. The recombinant proteins were purified and covalently bound to multi-walled carbon nanotubes (MWNT). The functionalization efficacy was successfully verified by SDS-PAGE and Raman Spectroscopy. The recombinant proteins were recognized by IgG and IgM antibodies from sera of bovines naturally infected with both viruses, showing that the CNT doesn't interfere with the recognition profile of the recombinant proteins. These molecules, functionalized or not to the CNT, were used in a prime-boost immunization protocol in C57Bl-6 mice, comparing to recombinants alone or added with alum and inactivated commercial vaccine. Following that, mice TCD4+ and CD8+ lymphocytes activation were analyzed by flow cytometry, quantifying the marker CD25. Mice immunized with the recombinant proteins associated to the CNT plus the adjuvant alum, showed a higher profile of activated CD4+ and CD8+ cells than the other groups. The recombinant proteins, in all tested formulations, induced a Th-2/Th-17 cytokine profile, particularly IL-6, IL-13 e TGF- $\beta$ 1. Once our recombinant proteins were designed according to the bovine pattern recognition of viral epitopes, it was not possible to perform a comprehensive analysis of the humoral response, although the molecules were immunogenic in mouse model. Since the tools were successfully generated and the initial analyses were promising, further studies should be conducted, especially in other animal models, allowing a better assessment of the developed immunogens.

Keywords: bovine herpesviruses, carbon nanotubos, murine model, vaccination.