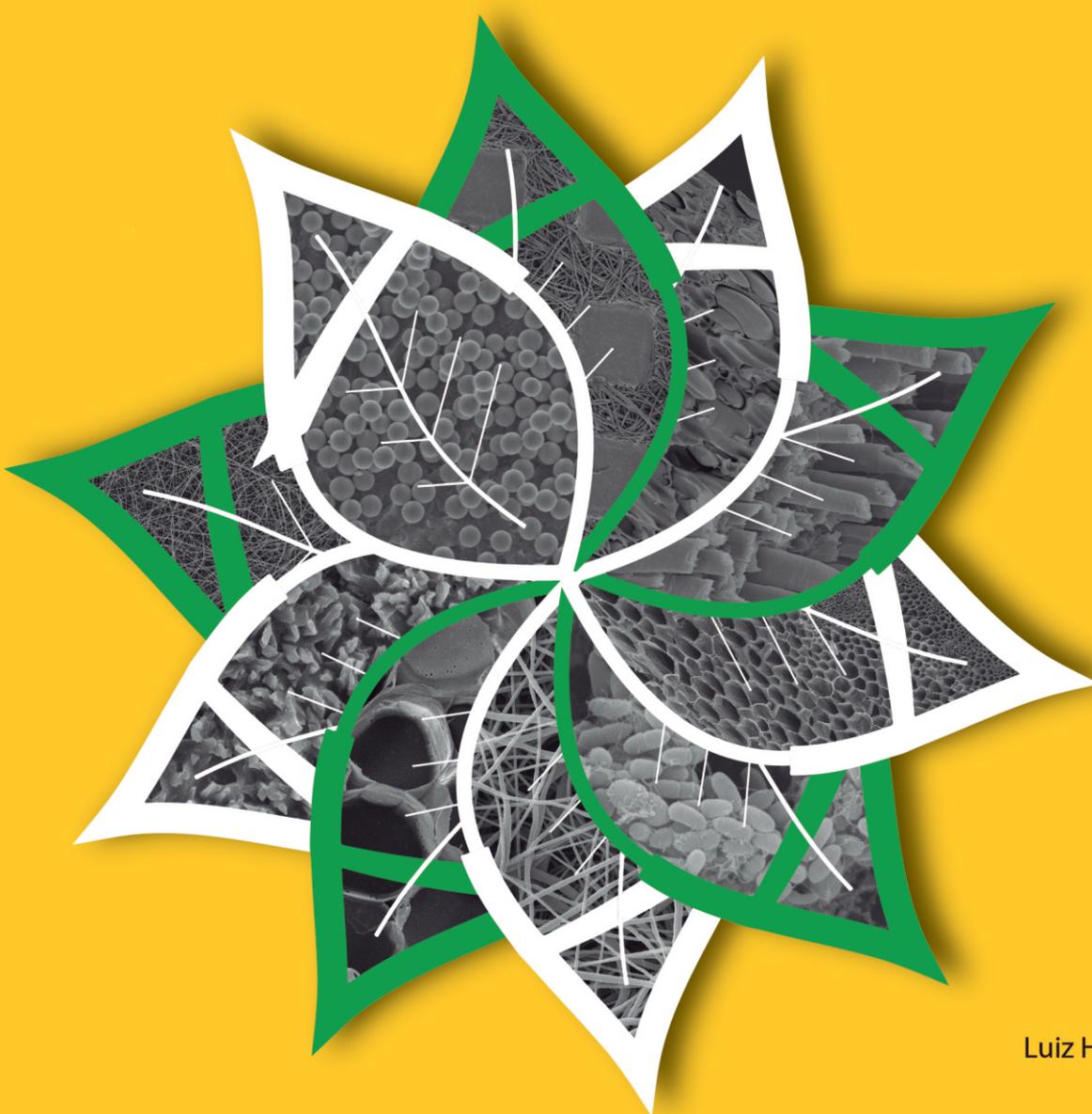


# Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio Anais do IX Workshop 2017



## Editores

Caue Ribeiro de Oliveira  
Elaine Cristina Paris  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
Marcelo Porto Bemquerer  
Maria Alice Martins  
Odílio Benedito Garrido de Assis

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Instrumentação  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**ANAIS DO IX WORKSHOP DE NANOTECNOLOGIA  
APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Caue Ribeiro  
Elaine Cristina Paris  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
Marcelo Porto Bemquerer  
Maria Alice Martins  
Odílio Benedito Garrido de Assis

**Editores**

Embrapa Instrumentação

São Carlos, SP

2017

## ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DE NANOVACINA PARA TRATAMENTO DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM AVES

Francisco Noé da Fonseca<sup>1</sup>, Lana Flávia Baron<sup>2</sup>, Iara Maria Trevisol<sup>1</sup>, Ana Paula Bastos<sup>1</sup>, Liana Brentano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Suínos e Aves; <sup>2</sup>Universidade do Contestado  
e-mail: francisco.fonseca@embrapa.br

**Classificação:** Processos de imobilização de biomoléculas e funcionalização em nanopartículas.

### Resumo

A doença de Newcastle é uma patologia viral contagiante que acomete tanto aves domésticas quanto selvagens, possuindo, desta forma, elevado risco epidêmico, podendo acarretar grandes perdas econômicas. Atualmente as vacinas disponíveis para esta doença são do tipo viva atenuada ou inativada; neste sentido, o presente trabalho visou desenvolver uma nova vacina de base nanotecnológica (virossoma), que consiste no envelope viral reconstituído após remoção do nucleocapsídeo. Uma amostra de baixa patogenicidade de vírus da doença de Newcastle foi cultivada em ovos embrionados e purificada em gradiente descontínuo de sacarose. Os vírus purificados foram dissolvidos com tensoativo (triton X-100) e, após ultracentrifugação, os envelopes foram reconstituídos pela remoção do tensoativo com uma resina adequada. Foram elaboradas duas formulações, uma contendo apenas o envelope viral e outra com adição de fosfolipídios. Determinou-se o título de hemaglutinação da amostra viral antes e após a obtenção dos virossomas e foi observado que a formulação incrementada com fosfolipídios teve aumento no título de hemaglutinação. Os dados obtidos sugerem a potencialidade deste tipo de sistema para a produção de uma nanovacina, porém estudos adicionais são necessários para estabelecer sua viabilidade e efetividade vacinal.

**Palavras-chave:** Virossoma; Nanovacina; Doença de Newcastle; Virologia aviária; Imunologia

### PRE-FORMULATION STUDY FOR A NANOVACCINE AGAINST THE NEWCASTLE'S DISEASE IN POULTRY

#### Abstract

The Newcastle's disease is a contagious viral pathology that infects both domestic and wild birds, having, thus, a high epidemic risk and it can impact negatively the economy. Nowadays, the available vaccines for this disease are the live attenuated or inactivated one; in this context, the present work aimed to develop a new nanotechnological vaccine (virosome), that consists of reconstituted viral envelope after nucleocapsid removal. A low pathogenicity sample of Newcastle's disease virus was cultivated in embryonated eggs and purified in a discontinuous sucrose gradient. The purified virus was dissolved in surfactant (triton X-100) and, after ultracentrifugation the envelopes were reconstituted by surfactant removal with a proper resin. Two formulations were elaborated; one was composed with only the virus envelope and the other with addition of phospholipids. The haemagglutination titer was determined for the virus prior the procedure and after virosome obtention. The formulation containing the additional phospholipids presented higher titer. These findings suggest the potentiality of this system for the production of a nanovaccine, but further evaluation is required to establish its viability and vaccinal effectivity.

**Keywords:** Virosome; Nanovaccine; Newcastle's Disease; Avian virology; Immunology

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Newcastle (DN) é uma patologia infecciosa causada por um vírus da família Paramyxoviridae, que possui fita simples de RNA negativa. Existem 3 tipos de cepas, a velogênica

(extremamente virulenta), a mesogênica (virulência intermediária) e lentigênica (pouco virulenta). A forma velogênica causa severas alterações nervosas e respiratórias nas aves acometidas, com rápida disseminação e alta taxa de mortalidade. O vírus da doença de Newcastle (VDN) é infeccioso tanto para aves domésticas (galinha, peru e pato) quanto para aves selvagens, o que eleva o potencial e risco epidêmico deste agente, e também pode resultar em grandes perdas econômicas para o setor da avicultura. Devido ao elevado risco sanitário desta doença, juntamente com a influenza aviária, corresponde a principal doença de monitoramento do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), devendo todos os casos ser notificados e medidas sanitárias ambientais realizadas. Uma das ações de controle da doença é a vacinação obrigatória das aves, além de boas práticas no manejo animal (BACK; ISHIZUKA, 2010).

A proteção limitada das vacinas direcionou as pesquisas para a investigação de adjuvantes efetivos e sistemas de liberação controlada. Para a entrega de fármacos, os carreadores mais utilizados são os lipossomas (vesículas formadas a partir de bicamadas de fosfolipídios), as micropartículas poliméricas, nanopartículas, as vesículas e as micelas. No tocante aos lipossomas, sua aplicação como veículos de liberação de antígenos em razão do seu uso como adjuvante imunológico, apresentando como vantagens a fácil preparação, baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (BEN-YEHUDA et al., 2003; MAZUMDAR et al., 2004). Ainda, a conjugação de proteínas virais na membrana de lipossomas (virossoma) oferece a oportunidade para explorar o direcionamento e propriedades fusogênicas de membranas de proteínas virais. Esta propriedade dribla o inconveniente da degradação dos lipossomas antes de alcançarem o citoplasma, pois a nível celular, os virossomas podem atuar como o próprio vírus, introduzindo os antígenos dentro do citoplasma (KANEDA, 2000).

Para a ND, alguns estudos desenvolveram e avaliaram o potencial de vacinas virossomais (HOMHUAN et al., 2004; KAPCZYNSKI; TUMPEY, 2003). Em todos os casos, foi observada uma maior soroconversão em relação ao anticorpo anti-HA em comparação a vacina comercial (LaSota®, Zoetis). Além disso, devido à elevada capacidade fusogênica, vacinas que utilizam virossomas produzidos a partir do VDN como veículo tem sido investigada para carrear antígenos de outros patógenos (KAPCZYNSKI, 2004; MORRISON et al., 2010). Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo obter formulações virossomais a partir do VDN para desenvolvimento de uma nova vacina contra DN.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Propagação e isolamento viral

Foi utilizada uma amostra de vírus de Newcastle não patogênica (nº 209/04) gentilmente cedida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O vírus foi propagado em ovos embrionados SPF de 9 dias, os quais foram incubados por 5 dias a 37°C em estufa. No último dia, os ovos foram refrigerados por 2 horas e o fluido corioalantoide foi recolhido para isolamento viral. Os fluidos foram unidos e purificados em gradiente descontínuo de sacarose (30/60%). A banda opaca formada na interface do gradiente foi recolhida e peletizada por ultracentrifugação. O pellet foi ressuspendido em tampão TNE.

### 2.2 Preparação dos virossomas

Os virossomas foram preparados conforme descrito por Bron et al, (1993) com modificações. Inicialmente, uma alíquota da suspensão (3 µL) viral foi diluída 1:1000 (v/v) em uma solução de triton X-100 1% (m/v) em tampão TNE. Essa solução foi misturada por pipetagem por alguns segundos e submetida à ultracentrifugação (1h / 100000 x g / 4 °C) para remoção dos núcleocapsídeos. A formação dos virossomas deu-se espontaneamente a partir da remoção do tensoativo (triton); adicionaram-se 450 mg de resina (Biobeads SM2, Biorad) no sobrenadante e mantido em agitação por 1 h; a seguir, adicionou-se mais 250 mg de resina e o sistema foi agitado por mais 1 h. O líquido contendo os virossomas foi, por fim, filtrado em filtro 0,22 µm. Esta formulação foi denominada F1. Outra formulação (F2) foi preparada utilizando a mesma quantidade de vírus em um protocolo parcialmente modificado; inicialmente, foi preparada uma solução de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (120 e 22 mg/mL, respectivamente) em triton X-100. Esta solução foi diluída 1:8

(v/v) em triton e utilizada para a dissolução do vírus. As demais etapas foram realizadas conforme descritas anteriormente. As formulações foram realizadas em triplicata.

### 2.3. Teste de hemaglutinação

O sangue de aves SPF foi coletado tubo contendo EDTA e centrifugado (1500 rpm / 5 min). O sobrenadante foi descartado e o pellet de hemácias foi ressuscitado com PBS e centrifugado até o sobrenadante ficar límpido. Após a última centrifugação, o pellet resultante foi utilizado para preparar uma suspensão de hemácias 0,6% (m/v) em PBS. Em uma placa de 96 poços de fundo cônico, foi feita a diluição seriada (1:2) das amostras, utilizando PBS como diluente. Ao final, acrescentou-se 50 µL da suspensão de hemácias e aguardaram-se alguns minutos para observação do resultado. O título de hemaglutinação consiste na última diluição que não houve formação de botão de hemácias. Foram testadas tanto as formulações preparadas quanto à suspensão viral utilizada (diluição 1:1000).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversas abordagens podem ser utilizadas para a obtenção de vacinas, como a utilização de vacina viral viva atenuada, vetores virais, subunidades antigênicas, etc. No caso de vírus envelopado, como o vírus da doença de Newcastle, as proteínas do envelope, em especial a hemaglutinina, desempenham papel fundamental para a patogenia e resposta imune do organismo. Assim, desenvolver uma formulação que possua as proteínas virais de envelope é um ponto chave. Logo, no presente trabalho, utilizou-se o virossoma como estratégia para obtenção de uma vacina nanotecnológica, visto que consiste no envelope viral reconstituído, incorporado ou não de fosfolipídeos exógenos.

De forma sucinta, a preparação de um virossoma é constituída por 3 etapas: dissolução do envelope viral (tratamento com tensoativos hidrofílicos), remoção do nucleocapsídeo (ultracentrifugação) e reconstituição do envelope (remoção do tensoativo). Na primeira etapa de obtenção dos virossomas, foi utilizado o Triton X-100, um tensoativo hidrofílico com CMC de 0,22-0,24 mM e baixo custo. Contudo, sua remoção por diálise é praticamente inviável devido à formação de micelas em baixas concentrações. Neste caso, foi utilizada uma resina (Biobeads SM2) capaz de adsorver tensoativos com baixas CMC e ampla faixa de EHL. Esta resina é capaz de remover todo o triton X-100 de uma solução a 1% (p/v) num intervalo de 2 h e alta taxa de recuperação de proteína quando utilizado na proporção de 0,7 g de triton / g de resina úmida (HOLLOWAY, 1973). A efetividade da remoção pode ser observada pelo desaparecimento da espuma e leve opacidade da formulação, especificamente naquelas que foram acrescidas de fosfolipídios exógenos.

A hemaglutinina é uma das proteínas de envelope e é responsável pela interação da partícula viral com a superfície da célula (por meio de ligação com ácido siálico). Outra característica é a sua capacidade de induzir hemaglutinação, fato este que é utilizado como princípio do método de quantificação viral (titulação). Inicialmente, foi feita diferentes diluições da suspensão viral cultivada em ovos (1:1000, 1:10000 e 1:20000, v/v) e sua titulação. Foi observada que a diluição 1:1000 apresentou um título de hemaglutinação elevado (1:65536), em relação das demais diluições (1:128 e 0, respectivamente).

Após o fracionamento viral, utilizando a diluição 1:1000, e a reconstituição dos virossomas, sem ou com adição de fosfolipídios, foi determinado o título das formulações, os quais podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Título de hemaglutinação dos virossomas produzidos a partir de vírus da Doença de Newcastle de baixa patogenicidade (nº 209/04)

Formulação	Título de Hemaglutinação
F1	1:96
F2	1:1572864

*Os valores representam a média do título de 3 formulações. F1 consiste no envelope viral reconstituído; F2 consiste no virossoma composto pelo envelope e fosfolipídios adicionais.*

Foi verificado que as formulações produzidas apenas com os envelopes virais perderam consideravelmente título em comparação com o vírus antes do processamento. Por outro lado, a adição de fosfolipídios à formulação aumentou notoriamente o título final. Este fato pode ser decorrente de uma melhor acomodação e distribuição das moléculas de hemaglutinina nas vesículas lipossomais formadas.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir dos dados preliminares obtidos, é possível utilizar triton X-100 no processamento de envelope viral para obtenção de um protótipo vacinal para a doença de Newcastle. Ainda, a adição de fosfolipídios incrementou a capacidade hemaglutinante do sistema, o que indiretamente, pode sugerir uma melhor interação com as células do organismo. Vale destacar que análises adicionais são necessárias para consolidar a caracterização físico-química da formulação (diâmetro, composição quali-quantitativa proteica e morfologia), bem como sua atividade biológica, tanto *in vitro* (citotoxicidade e ativação de macrófagos) quanto *in vivo* (resposta imune e proteção vacinal).

#### AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à técnica da virologia de aves, Tânia A. P. Klein, pela ajuda no cultivo viral e avaliação da atividade hemaglutinante, e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica (PIBIC).

#### REFERÊNCIAS

- BACK, A.; ISHIZUKA, M.M. Cartilha do produtor: principais doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal. 1ª ed, São Paulo: Fundação Cargill, 2010. 112 p.
- BEN-YEHUDA, A.; JOSEPH, A.; BARENHOLZ, Y. et al. Immunogenicity and safety of novel IL-2-supplemented liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) in nursing-home residents. *Vaccine*, v.21, p.3169-78, 2003.
- BRON, R; ORTIZ, A.; DIJKSTRA, J. et al. Preparation, properties, and applications of reconstituted influenza virus envelopes (Virosomes). *Methods Enzymol*, v. 220, p. 313-31, 1993.
- HOLLOWAY, P.W. A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem*, v. 53, n. 1, p. 304-308, 1973.
- HOMHUAN, A.; PRAKONGPAN, S.; POOMVISES, P. et al. Virosome and ISCOM vaccines against Newcastle disease: preparation, characterization and immunogenicity. *Eur J Pharm Sci*, v.22, p.459-68, 2004.
- KANEDA, Y. Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Adv Drug Deliv Rev*, v.43, p.197-205, 2000.
- KAPCZYNSKI, D.R. Development of a virosome vaccine against avian metapneumovirus subtype C for protection in turkeys. *Avian Diseases*, v.48, p.332-43, 2004.
- KAPCZYNSKI, D.R.; TUMPEY, T.M. Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus. *Avian Diseases*, v.47, p.578-87, 2003.
- MAZUMDAR, T.; ANAM, K.; ALI, N.A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of Leishmania vaccine instructs Th1 responses and resistance to Leishmania donovani in susceptible BALB/c mice. *Vaccine*, v.22, p.1162-71, 2004.
- McGINNES, L.W.; PANTUA, H.; LALIBERTE, J.P. et al. Assembly and Biological and Immunological Properties of Newcastle Disease Virus-Like Particles. *J Virol*, v.84, p.4513-23, 2010.
- MORRISON, T.G. Newcastle disease virus-like particles as a platform for the development of vaccines for human and agricultural pathogens. *Future Virology*, v.5, p.545-54, 2010.