

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE VIROSSOMA PARA PREVENÇÃO DA DOENÇA DE NEWCASTLE EM AVES

Lana Flávia Baron¹, Francisco Noé da Fonseca², Liana Brentano³, Iara Trevisol³, Luciano Paulino³, Mayara Simonelly⁴ e Ana Paula Bastos³

¹Graduanda em Farmácia pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, bolsista CNPQ/PIBIC, lanaflaviabaron@hotmail.com

²Analista da Embrapa Suínos e Aves

³Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

⁴Pós-doutoranda da Universidade de Brasília

Palavras-chave: NDV, nanopartícula, nanovacina

INTRODUÇÃO

A doença de Newcastle é uma infecção viral altamente contagiosa das aves, causada pelo vírus da doença de Newcastle (NDV), da família Paramyxoviridae e gênero Avulavirus. NDV é um vírus envelopado, fita simples de RNA. O envelope lipídico, deste vírus, contém duas glicoproteínas de superfície, proteína de fusão e hemaglutinina-neuraminidase (HN) (4). Dependendo da patogenicidade da cepa viral, a infecção pode manifestar-se em doença subclínica ou até uma doença respiratória e nervosa com altíssima mortalidade e morbidade (2). As vacinas comerciais utilizam cepas virais atenuadas, podendo causar sintomas respiratórios em aves imunocomprometidas. Uma desvantagem no uso de vacinas vivas é que a indução de anticorpos reagentes ao vírus interfere na vigilância sorológica das aves em programas de vigilância ativa. Essa enfermidade é de notificação obrigatória e impõe barreira sanitária internacional (3,4). Portanto, estratégias de vacinação são essenciais tanto na avicultura comercial e familiar. O objetivo deste trabalho é avaliar através dos ensaios *in vitro* o imunógeno virossomal de subunidade proteica do NDV.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada uma amostra de vírus NDV não patogênica (nº 209/04), cedida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Para alcançarmos o objetivo os virossomas foram desenvolvidos, caracterizados, titulamos a hemaglutinina e avaliamos a sua citotoxicidade. A preparação foi conforme descrita por Bron et al, (1993) com modificações. Inicialmente foi diluída uma alíquota da suspensão do NDV (purificado em gradiente de sacarose) em triton X-100 a 1% para dissolução do envelope viral, seguida de ultracentrifugação (1h / 100000 x g / 4 °C), removendo o nucleocapsídeo. Ao sobrenadante, adicionou-se uma solução de fosfolípidios (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) na proporção 1:1. O tensoativo foi removido com auxílio de uma resina hidrofóbica (Bio-Beads SM2). Esta formulação foi feita em triplicata. Os virossomas foram caracterizados quanto ao potencial Zeta e diâmetro por espalhamento de luz dinâmico em Zetasizer. Realizou-se titulação de hemaglutinina antes e depois do processamento e inoculação em ovos. Por microscopia eletrônica de transmissão registrou-se imagens das nanopartículas. Em linhagens imortalizadas de macrófagos RAW 264.7 avaliou-se o virossoma frente à citotoxicidade e crescimento. Realizou-se análises de MTT e contagem celular através do contador automático (Moxi, Orflo) nas diluições de 1:2 – 1:256, nos tempos de 24h, 48h e 72h de exposição. Analisou-se ainda, a taxa de apoptose celular nas concentrações de 1:8 – 1:32, nos tempos de 24h e 48h de exposição aos virossomas através dos kits LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (ThermoFisherScientific) e APO-DIRECT (BD Biosciences) utilizando citometria de fluxo e contagem de 100000 eventos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na caracterização dos virossomas, o potencial Zeta foi de $-2,3 \pm 0,2$ mV e diâmetro médio de 109 ± 11 nm (Figura 1). A titulação de HA se manteve semelhante ao título da suspensão viral antes do processamento e não foi observado replicação viral na inoculação em ovos. Por microscopia eletrônica de transmissão visualizou-se um concentrando de nanoestruturas na membrana dos virossomas (Figura 2). Para as análises de citotoxicidade foram utilizadas três análises distintas. Para tal, realizamos a exposição dos virossomas em oito concentrações distas nas células RAW 264.7 (macrófagos murinos imortalizados), posteriormente analisamos a citotoxicidade tanto pela técnica de MTT (Figura 3), como também no contador automático de células. Os resultados nas duas análises foram similares, o qual observamos uma viabilidade celular de 77 a 100%. Após essas duas análises, realizamos ainda análises de citotoxicidade por citometria de fluxo, utilizando o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (ThermoFisher) e o kit APO-DIRECT (BD). Nas análises do kit LIVE/DEAD® em 24h, a viabilidade variou de 78 a 85%, sendo o melhor resultado na diluição 1:16 (Figura 4), e em 48h, a variação foi de 81 a 88%, tendo resultados semelhantes as diluições 1:16 e 1:32. Os testes com o kit APO-DIRECT apresentaram viabilidade celular que variou de 98 a 99%, sendo a diluição 1:16 e 1:32 também apresentando resultados semelhantes de viabilidade celular. Nas análises endocitose dos virossomas pelos macrófagos, encontramos resultados satisfatórios para as diluições de 1:16 e 1:32.

CONCLUSÕES

Os bons resultados obtidos na caracterização do virossoma e a alta viabilidade celular encontrada servem como indicadores de um novo protótipo de nanovacina, mas que ainda necessita ser submetida a ensaios *in vivo* para confirmar sua segurança e imunogenicidade.

REFERÊNCIAS

1. BRON, R. et al. Preparation, Properties, and Applications of Reconstituted Influenza Virus Envelopes (Virosomes). **Methods In Enzymology**, v. 220, n. 1, p.313-331,1993.
2. DIMITROV, K. M. et al. Newcastle disease vaccines: A solved problem or a continuous challenge?. **Veterinary Microbiology**, Athens, v. 2016, p.126-136, 2017.
3. MAPA, Ministério de estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **IN 50**, 2013.
4. MAYERS, J.; MANSFIELD, K. L.; BROWN, I. H. The role of vaccination in risk mitigation and control of Newcastle disease in poultry. **Vaccine**, Surrey, v. 35, p.5974-5980, 2017.
5. YINGYUAD, P. et al. Preparation, characterization and in vitro evaluation of calothrix B liposomes. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, Bangkok, v. 44, n. 1, p.491-497, 2018.

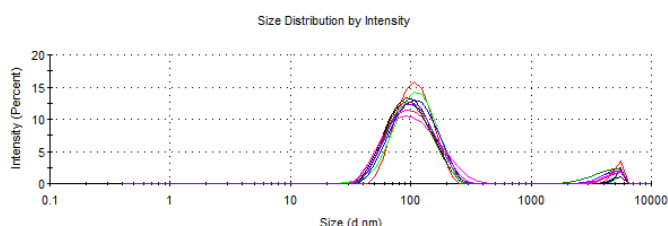


Figura 1. Diâmetro dos virossomas.

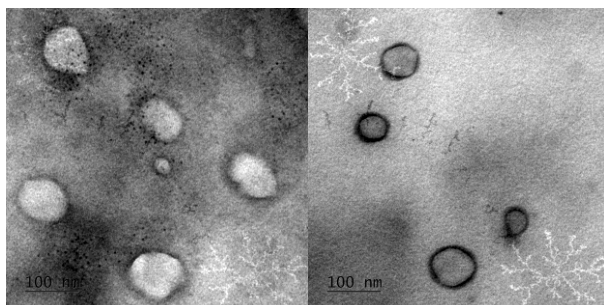


Figura 2. Fotos dos virossomas por microscopia eletrônica de transmissão.



Figura 3. Teste de MTT em macrófagos expostos ao virossoma.

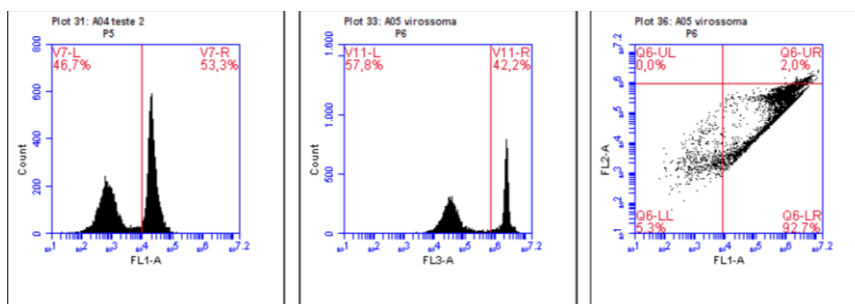


Figura 4. Contagem das células viáveis por citometria de fluxo em 24h de exposição na diluição 1:16 utilizando o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity. **a)** histograma do canal de emissão FL1; **b)** histograma do canal de emissão FL3; **c)** dotplot dos canais de fluorescência FL1 e FL2 com *gate*.