

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS PARA IMUNIZAÇÃO CONTRA o *Herpes Simplex Virus-2*¹

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF NANOCAPSULES FOR IMMUNIZATION AGAINST Herpes Simplex Virus-2

Larissa Daiane Willrich de Melo², Deise Nascimento de Freitas³ e
Luiz Carlos Rodrigues Junior⁴

RESUMO

Muitas tentativas para a descoberta de uma vacina eficaz contra o *Herpes Simplex Virus* já foram testadas, porém, nenhuma delas obteve o resultado esperado. A utilização da nanotecnologia através de suspensões de nanocápsulas com o vírus pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas. Estes sistemas possuem como características fundamentais a liberação gradual do conteúdo encapsulado. Este estudo propôs a produção e caracterização físico-química de nanocápsulas com HSV-2. As nanocápsulas, com HSV-2, desenvolvidas segundo Fessi (1989), apresentaram tamanhos médios de 196,4 nm e índice de polidispersão de 0,125 com potencial zeta de - 18,9mV. As análises de estabilidade das suspensões em temperatura ambiente indicaram uma conservação dos parâmetros físico-químicos no período de 30 dias. Através da técnica de reação em cadeia da polimerase, utilizando como alvo o gene da glicoproteína B do HSV-2, foi demonstrado que partes do vírus são encapsuladas, não o virion. Os resultados sugerem que o encapsulamento para o desenvolvimento de vacinas devem priorizar partes do vírus.

Palavras-chave: HSV-2, vacina, Nanobiotecnologia.

ABSTRACT

Many attempts to find an effective vaccine against Herpes Simplex Virus have been tested, but none of them has achieved the expected result. The use of nanotechnology through nanocapsules with the virus can be an alternative for vaccine development. These systems have fundamental characteristics for the release of the encapsulated content. This study proposes the production and physic-chemical characterization of nanocapsules with HSV-2. Those nanocapsules, produced according to Fessi (1989), showed an average size of 196.4 nm, and polydispersity index of 0.125 with zeta potential of - 18.9 mV. Furthermore, stability studies in environment temperature indicated a conservation of physic-chemical characteristics along 30 days. Through the technique of polymerase chain reaction, using as a target the gene of glycoprotein B from HSV-2, it was demonstrated that parts of the virus are encapsulated, not the virion. These results suggest that the use of nanocapsules for the development of viral vaccines should focus on specific targets of the virus.

Keywords: HSV-2, vaccines, Nanobiotecnology.

¹Trabalho de Pesquisa - Centro Universitário Franciscano.

²Aluna do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

³Acadêmica do Curso de Farmácia - Centro Universitário Franciscano.

⁴Orientador - Centro Universitário Franciscano.

INTRODUÇÃO

Devido à grande incidência de infecções pelo *Herpes simplex virus* (HSV), o controle dessa patologia continua sendo um desafio para muitos pesquisadores (COHEN, 2010). Ainda não há cura definitiva, porém diversas tentativas para a descoberta de uma vacina eficaz já foram testadas (CORTESE et al., 2013). Entretanto, nenhuma delas obteve resultados completamente satisfatórios.

A utilização da nanotecnologia associada a estratégias de vacinação pode contribuir para o desenvolvimento de sistemas eficientes de distribuição e vetorização de vacinas. Dentro desse contexto, as nanocápsulas funcionam como pequenos reservatórios de substâncias, capazes de controlar a liberação do seu conteúdo, podendo ser direcionada ao local específico de interesse (YOKOYAMA; OKANO, 1996). Um exemplo das vantagens da aplicação de nanocápsulas em sistemas de vacinação foi demonstrado no estudo desenvolvido por Hu et al. (2011). Ao desenvolver nanopartículas de Fe_3O_4 revestido com ácido glutâmico encapsulando PRSC-gD-IL-21, um plasmídeo que expressa a fusão do gene da proteína gD do HSV-1 com o gene da interleucina-21. Estas nanopartículas foram administradas na mucosa ocular de camundongos. Os resultados mostraram que essa vacina induziu níveis elevados de anticorpo neutralizante específico, IgA em mucosa e também de IFN- γ e IL-4 no soro, melhorando a citotoxicidade das células NK.

Dessa forma, neste estudo, foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo oleoso contendo o HSV-2, disperso na fase interna, através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, poli- ϵ -caprolactona (PCL). As nanocápsulas foram produzidas e caracterizadas quanto às suas propriedades físico-químicas das suspensões. A detecção do vírus foi realizada por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene da glicoproteína B (gB) de membrana do vírus. Os resultados obtidos indicam que as nanocápsulas de HSV-2 apresentaram parâmetros físico-químicos compatíveis com sistemas nanoestruturados para aplicação biológica, sendo o tamanho de partícula de 196,4 nm, o índice de polidispersão de 0,125 e o potencial zeta de -18,9. Além disso, foi identificada a presença do gene gB dentro da nanopartícula, sugerindo que pelo menos parte do virion foi encapsulado.

MATERIAL E MÉTODOS

PRODUÇÃO DE *Herpes Simplex virus-2*

Neste estudo, foi utilizado o vírus HSV-2, linhagem H33. Os vírus foram expandidos em células VERO (células de rim do macaco verde – ATCC CRL 1586), cultivadas em meio DMEM (GIBCO) 1X suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB). Para a infecção, foi utilizada a proporção de 0,01 PFU (Plate Forming Units) de vírus para cada 100 células, em um período de 3 horas. Os efeitos

citopáticos foram acompanhados em até 72 horas. Após a destruição da monocamada, as células foram centrifugadas e os vírus extraídos através de ciclos imediatos de congelamento e descongelamento. O extrato celular viral foi alíquotado e armazenado em freezer -80 °C e título determinado em placas de 24 poços, através da técnica de TCID₅₀.

PRODUÇÃO DE NANOCÁPSULAS

As suspensões de nanocápsulas (NC) foram preparadas segundo o método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI et al., 1989) utilizando os componentes descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Composição das suspensões de nanocápsulas contendo HSV-2(NC+HSV-2) e na ausência do vírus (branco).

| Componentes | NC+HSV-2 | Branco |
|----------------------|----------|---------|
| Fase orgânica | | |
| HSV-2 | 50 µL | - |
| PCL | 0,10 g | 0,10 g |
| Span 60 | 0,038 g | 0,038 g |
| Acetona | 27 mL | 27 mL |
| TCC | 0,16 g | 0,16 g |
| Fase aquosa | | |
| Tween 80 | 0,077 g | 0,077 g |
| Água MilliQ® | 53 mL | 53 mL |

Os componentes da fase orgânica e da fase aquosa foram adicionados separadamente em um béquer e mantidos sob agitação magnética em banho-maria à temperatura de 38°C, durante 30 minutos. O HSV-2, inativado por luz UV, e o TCC foram adicionados à fase orgânica no final do período de aquecimento. Com auxílio de um funil, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa e manteve-se a agitação durante 10 minutos. Esta mistura foi concentrada a um volume final de 10 mL em evaporador rotatório, para eliminação do solvente orgânico. Para fins comparativos, preparou-se uma suspensão na ausência do vírus (branco), utilizada como padrão na avaliação dos perfis físico-químicos de estabilidade.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES

Determinação do pH: A determinação do pH foi realizada diretamente nas suspensões, em potenciômetro previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 6,9.

Determinação do diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão (IPD): As determinações do diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanopartículas em suspensão foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico, no equipamento Zetasizer®, Nano-ZS da

Malvern. As suspensões foram diluídas 500 vezes (v:v) em água ultra purificada e os resultados foram determinados através da média de três repetições.

Potencial zeta: O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi obtido através da técnica de mobilidade eletroforética no aparelho Zetasizer®, Nano-ZS da Malvern. As amostras foram previamente diluídas 500 vezes (v:v) em cloreto de sódio 10 mM. Os resultados foram expressos em milivolts (mV) a partir de uma média de três determinações.

EXTRAÇÃO VIRAL DAS NANOCÁPSULAS

Para a análise da presença do vírus no interior da nanocápsula, a nanoestrutura foi rompida e o componente viral identificado através da técnica de PCR. As nanocápsulas passaram por dois processos químicos, caracterizando 2 grupos distintos:

- Grupo 1: Amostras extraídas através de SNET e proteinase;
- Grupo 2: Amostras extraídas com fenol-clorofórmio.

Após cada processo, as amostras foram centrifugadas em tubo de microcentrífuga, utilizando o sistema de filtragem Millipore (100 nm). Considerando a etapa de filtragem, cada grupo foi subdividido em mais 2 tipos:

- A) Parte líquida da suspensão que passou pelo filtro;
- B) Parte da suspensão de nanocápsulas retida no filtro – neste caso o polímero das nanocápsulas foi rompido com acetonitrila (ACN).

Para a extração do grupo 2, as suspensões foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante das amostras foi removido e adicionado 450 µL de SNET (20 mM de Tris HCl, 5 mM de EDTA, 40 mM de NaCl e 1% de SDS) e 400 µL/mL de proteinase K. As suspensões permaneceram em banho-maria, *overnight*, a 55 °C. Após este processo, foi iniciado o processo de extração do grupo 3. Foram adicionados 50% de fenol, 48% de clorofórmio e 2% de álcool isoamílico às nanocápsulas, seguido de incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após as amostras foram centrifugadas por 3500 rpm durante 5 minutos, para separação das fases. O sobrenadante, parte onde se encontra o clorofórmio juntamente com o DNA viral, foi removido e adicionado isopropanol (50:50). Para lavagem e separação das fases, o material foi centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionado etanol 70%, centrifugado e ressuspendido em água de injeção. As amostras foram armazenadas no freezer em temperatura de -20°C.

DETECÇÃO DO HSV-2 POR PCR

Para a detecção da presença de material viral nos extratos preparados das nanocápsulas, foi realizada a PCR utilizando como sequência alvo o gene da glicoproteína B do envelope do HSV-2. Para isto, foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam o gene da glicoproteína: direto (5' ACCGCGATGCCCTCCGTGTA3'); reverso (5' ACGGGGGACCCGAAACCGAA3'). A reação foi montada de acordo com os componentes descritos na tabela 2. As condições de amplificação foram 95°C por 10 minutos para abertura de fitas, seguido do ciclo de 95°C por 2 min, 56°C por 5 minutos, 72°C por 8 minutos, repetindo esse ciclo por 35 vezes. O resultado da amplificação foi analisado em gel de agarose 1,5% e revelado com brometo de etídio (INVITROGEN).

Tabela 2 - Componentes da reação de PCR para o HSV-2.

| Reação de PCR | |
|--------------------------|------------|
| Tampão | 10x |
| MgCl | 50 mM |
| dNPTs | 10 mM |
| Oligonucleotídeo direto | 20 pmol/μL |
| Oligonucleotídeo reverso | 20 pmol/μL |
| Taq DNA | 5 U/μL |
| DNA | 10 μL |

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS

Para aplicação em modelos biológicos, as nanocápsulas produzidas necessitam apresentar determinados parâmetros físico-químicos, cujos valores dependem do protocolo de produção. Neste experimento, as nanocápsulas brancas apresentaram um tamanho médio de 187,6 nm, IPD de 0,083 e potencial zeta de -19,4 mV (Figura 1A). A suspensão contendo o vírus HSV-2 apresentou tamanho médio de 196,4nm e índice de polidispersão de 0,125 com potencial zeta de -18,9 mV (Figura 1B).

Segundo Weiss-Angelie et al. (2008), o tamanho médio de partícula com valores inferiores a 300 nm e valores de índice de polidispersão inferiores a 0.3 garantem uma adequada homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas. Esse dado fortalece a qualidade dos resultados obtidos neste estudo, quanto aos parâmetros físico-químicos. Essas nanocápsulas foram produzidas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, dessa forma, podem funcionar como um sistema reservatório com núcleo oleoso envolvido por uma parede polimérica, conforme Barrat (2000).

Entretanto, uma questão que deve ser observada na construção da nanocápsula com HSV-2 é a relação entre o tamanho da cápsula e a partícula viral encapsulada. As partículas do HSV (1 e 2) apresentam uma faixa de tamanho entre (75 e 180nm) (SZILÁGYI; BERRIMAN, 1994). Se conside-

rarmos o vírus associado a nanopartícula, o tamanho mínimo deveria ser aproximadamente 300 nm, e não 196 nm, como observado. Esses resultados indicam que possivelmente o virion não está completo ou íntegro dentro da nanopartícula.

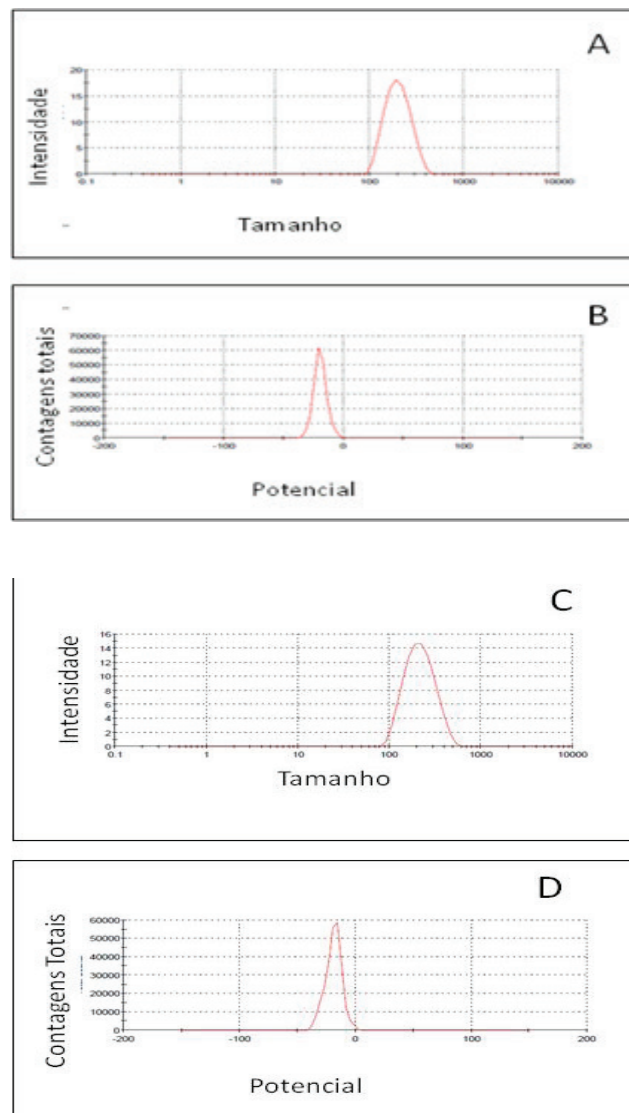


Figura 1 - Tamanho de Partícula e Potencial Zeta das Nanocápsulas: As nanocápsulas brancas apresentaram como média de tamanho de partícula 187,6 nm (A), IPD: 0,083 (B). O procedimento de análise, a partir de parâmetros do equipamento de medição, foi classificado como (bom). As nanocápsulas com HSV-2 apresentaram como média de tamanho de partícula 196,4nm (C), IPD: 0,125 (D). O procedimento de análise, a partir de parâmetros do equipamento de medição, foi classificado como (bom).

ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS

A verificação da estabilidade das nanocápsulas produzidas foi realizada através da análise das propriedades físico-químicas após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente. As suspensões apresentaram parâmetros bastante similares aos observados no momento da produção, conforme dados da tabela 3. Este resultado indica uma conservação do IPD ao longo do tempo, sugerindo a não agregação das partículas na suspensão, situação que geralmente acontece em outros

modelos (CALVO et al., 1996). Além disso, as suspensões mantiveram o potencial negativo, o que indica uma dispersão mais estável (FELIPPI, 2008).

Tabela 3 - Análise da estabilidade das suspensões.

| Tempo | pH | Tamanho (nm) | IPD | Potencial zeta (mV) |
|---------------|------|--------------|-------|---------------------|
| Zero (dias) | 5,67 | 188,1 | 0,132 | -20 |
| Trinta (dias) | 5,09 | 187,3 | 0,102 | -15,7 |

DETECÇÃO DO HSV-2

Para identificação do vírus, foi utilizada a técnica de PCR para o gene da glicoproteína B. A partir dessa amplificação, foi possível comprovar a presença do gene em todos os grupos e tipos de extrações citados na metodologia. Foi utilizado como controle positivo da reação de PCR o vírus HSV-2 (Figura 2). Nas amostras extraídas com SNET e proteinase, observou-se a maior quantidade de material genético amplificado (poços 3, 4 e 5). Nas amostras extraídas com fenol-clorofórmio, uma quantidade menor de material genético foi obtida (poço 5). Não foi observada presença de material genético viral na porção não filtrada (dados não mostrados). Como se trata de material viral total, não foi obtida uma banda de padrão regular, principalmente no controle positivo, isso porque os vírus são constituídos basicamente de material genético, e outras sequencias do vírus sinalizam na coloração do gel. O método de SNET e proteinase K foi mais eficiente que fenol-clorofórmio para extração.

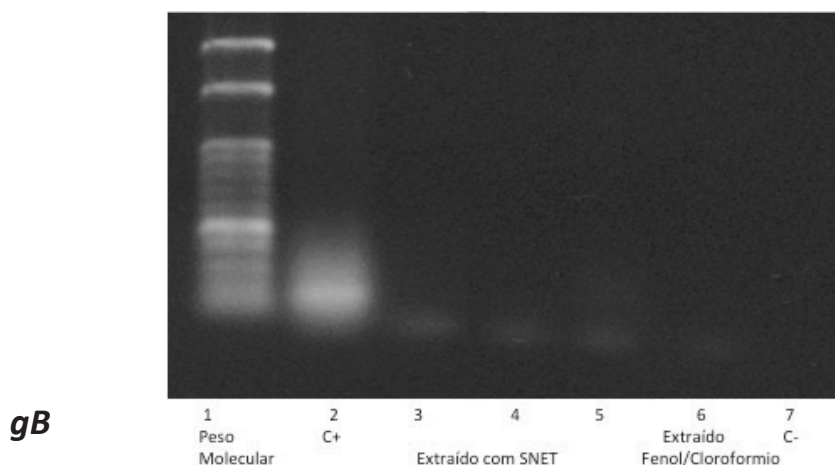


Figura 2 - Amplificação do gene da glicoproteína B do produto extraído das nanocápsulas: 1) Padrão de peso molecular; 2) controle positivo (Vírus HSV-2 não encapsulado); 3-5) Extrato de SNET/Proteinase K; 6) Extrato de Fenol-Clorofórmio; 7) Controle Negativo. Seta indica a banda de glicoproteína B (123pB).

CONCLUSÃO

A utilização de nanocápsulas para o desenvolvimento de vacinas contra HSV-2 é uma alternativa promissora para imunização. Os resultados obtidos indicam que no processo utilizado para construção da cápsula de núcleo oleoso não foi possível um encapsulamento do virion completo, até porque o tamanho da nanocápsula final poderia ficar maior do que o ideal. Entretanto, os resultados indicam que o sistema pode funcionar para o encapsulamento de partes do HSV-1, como o material genético viral. Esse sistema pode ser aplicado para o encapsulamento de moléculas alvos do vírus, com potencial imunestimulatório. Dessa forma, a glicoproteína gB torna-se uma potencial candidata para o encapsulamento e construção de uma vacina para HSV-2 baseada em nanotecnologia. Aliás, dentro dessa proteína existem inúmeras sequências conservadas de aminoácidos, já identificadas como imunogênicas, que poderiam ser utilizadas nesses sistemas. A utilização de sequências menores facilita o processo de encapsulamento, pelo tamanho e carga elétrica e solubilidade.

REFERÊNCIAS

- BARRAT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **PSTT**, v. 3, n. 5, p. 163-171, 2000.
- CALVO, P. et al. Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 1147-1152, 1996.
- COHEN, J. Painful failure of promising genital herpes vaccine. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 304, 2010.
- CORTESI, R. et al. Intranasal immunization in mice with non-ionic surfactants vesicles containing HSV immunogens: A preliminary study as possible vaccine against genital herpes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 229-237, 2013.
- FELIPPI, C. C. **Nanopartículas contendo isotretinoína**: Preparação, caracterização físico-química, estudo de estabilidade e avaliação da penetração cutânea. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2008.
- FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.
- HU, K. et al. An ocular mucosal administration of nanoparticles containing DNA vaccine pRSC-gD-IL-21 confers protection against mucosal challenge with herpes simplex virus type 1 in mice. **Vaccine**, n. 29, p. 1455-1462, 2011.

SZILADGYI, J. F.; BERRIMAN, J. Herpes simplex virus L particles contain spherical membrane-enclosed inclusion vesicles. **Journal of General Virology**, n. 75, p. 1749-1753, 1994.

WEISS-ANGELI, V. et al. Nanocapsules of octylmethoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 4, p.80-89, 2008.

YOKOYAMA, M.; OKANO, T. Target drug carriers: present status and a future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21, p.77-80, 1996.