

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA**

RAÍSSA GASPARETTO

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Área de concentração: Imunologia e Biologia Molecular

**Uruguaiiana
2023**

RAÍSSA GASPARETTO

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular
Supervisionado em Medicina Veterinária
da Universidade Federal do Pampa,
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof. Dr^a. Paula Fonseca Finger

**Uruguaiana
2023**

RAÍSSA GASPARETTO

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular
Supervisionado em Medicina Veterinária
da Universidade Federal do Pampa,
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Relatório defendido e aprovado em: 26 de janeiro de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Paula Fonseca Finger
Orientadora
UNIPAMPA

Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum
UNIPAMPA

Prof. Dr^a. Carolina Kist Traesel
UNIPAMPA

Dedico este trabalho ao meus pais, por todo o amor e apoio e ao Axú por ter sido minha inspiração para seguir essa jornada.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais por todo o esforço, amor e dedicação comigo, obrigada por serem tão pacientes comigo e sempre se colocarem à disposição dos meus sonhos. Ao meu namorado Luccas por todo apoio e incentivo, apesar da distância sempre se fez presente, obrigada pelo companheirismo e por sempre me lembrar que não estou sozinha. Aos meus cães Gregório, Maya e Fiona por serem a minha inspiração diária para seguir nessa profissão linda. Ao meu primeiro cão Axú por ter me permitido viver 12 anos com ele e ter me inspirado a cursar Medicina Veterinária. À minha tia Geni, por ter me ajudado durante a graduação. Eu amo vocês.

À minha orientadora Paula Finger (carinhosamente ori), obrigada por todo o conhecimento, dedicação e companheirismo durante os anos de graduação. À professora Carolina Traesel, por ter me dado a oportunidade de iniciar cientificamente e por sempre me ajudar. Vocês duas são partes fundamentais para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. Obrigada por ter me apresentando a microbiologia veterinária e esse mundo fantástico.

A todos os professores que tive em minha jornada acadêmica, cada um de vocês contribui de alguma maneira para eu ser quem sou hoje. Em especial, ao meu professor, agora amigo, Franco Soares e sua família que foram essenciais no início dessa jornada, sem vocês eu estaria perdida quando cheguei em Uruguaiana. Agradeço também aos professores Mário Brum e Irina Lubeck por terem me permitido acompanhar as atividades de seus laboratórios e terem contribuído para a minha formação.

Aos meus amigos de longa data Arthur, Júlia, Gabriela, Aline e Tatiana obrigada por sempre compartilharem os anseios da graduação comigo, embora a distância, sempre se fizeram presentes por meio de mensagens. Vocês moram no meu coração.

À minha amiga de aventuras durante a graduação Maria Eduarda, sou eternamente grata por ter te conhecido e saber que posso contar contigo sempre. Obrigada por aguentar meus surtos e por ter me apresentando uma família especial e que vou sempre levar comigo. Aos meus amigos Patrick e Fellipe, obrigada por surtarem comigo e por aguentarem os surtos, vocês são especiais demais e moram no meu coração. Leticia B, Leticia M, Dimas e Renata, obrigada por terem sido o apoio que precisei muitas vezes. Vocês todos serão sempre lembrados com muito carinho. Eu vou sentir muita saudade de todos os momentos que vivemos na graduação.

Agradeço aos amigos que fiz durante minhas passagens pelos laboratórios. Em especial à Nicole, Ingrid e Conrado. Vocês são demais. Obrigada por toda a amizade. Ao Laboratório de Imunologia Aplicada, em especial ao meu supervisor de ECSMV Fabricio Rochedo Conceição por ter me dado a oportunidade de realizar meu estágio em um local de muita aprendizagem em que pude crescer profissionalmente. Agradeço a todo o pessoal do laboratório por terem tido paciência comigo e por terem sido tão acolhedores.

Aos amigos que fiz em Pelotas, em especial ao Marcos e ao Lucas, obrigada por terem me acolhido tão bem e terem me ajudado durante os meses de ECSMV.

Por fim, agradeço a cada animal que cruzou o meu caminho e me mostrou estar na direção certa. Em especial a todos os cães que conviveram e convivem comigo. Meu muito obrigada!

“Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos que seguiremos e as metas que queremos alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem crescer.”

Augusto Cury

RESUMO

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o período de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), na área de concentração de imunologia e biologia molecular, realizado de 08 de setembro de 2022 a 23 de dezembro de 2022, totalizando 450 horas. O ECSMV teve orientação da docente Dr^a Paula Fonseca Finger e supervisão do professor Dr Fabricio Rochedo Conceição, sendo realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada, localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas. No decorrer do período foi possível acompanhar as técnicas laboratoriais visando a utilização de proteínas recombinantes para o uso em vacinas veterinárias contra clostridioses. Além disso, foi possível acompanhar atividades de experimentação animal, principalmente com camundongos e coelhos. No relatório serão descritas as técnicas de expressão de proteínas, ensaio imunoenzimático (ELISA), *SDS-Page* *Western blot*, atividades de microbiologia e de experimentação animal. Ainda, será discutido sobre o teste de potência realizado para as vacinas recombinantes contra clostridioses animais, bem como sobre o manejo dos animais do experimento.

Palavras-Chave: Biologia molecular; clostridioses; experimentação animal; vacinas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Laboratório de Imunologia Aplicada.	19
Figura 2 – Fachada CDTEC UFPel.	20
Figura 3 – Sala de Imunologia vista em diversos ângulos.	21
Figura 4 – Sala de bacteriologia vista em diversos ângulos.	21
Figura 5 – Sala de Biologia Molecular.	22
Figura 6 – Etapa de choque térmico para transformação em <i>E. coli</i> cepa BL21 (D3) <i>Star</i> ™.	24
Figura 7 – Aparelho utilizado na etapa de sonicação.	26
Figura 8 – Equipamento para purificação de proteínas.	27
Figura 9 – Acadêmica pipetando amostra em gel de poliacrilamida.	28
Figura 10 – Amostras da bacterina de ETX Mut em gel de poliacrilamida 12% corado com solução de corante rápida (<i>Coomassie Blue G 250</i>).	28
Figura 11 – Reação de <i>Western Blot</i> para a bacterina TeT 50.	30
Figura 12 – Representação dos formatos de teste de ELISA.	30
Figura 13 – Exemplificação do ELISA indireto.	31
Figura 14 – Acadêmica realizando a lavagem de placa de ELISA.	32
Figura 15 – Resultado do teste de ELISA, produzindo a coloração amarela.	33
Figura 16 – Ilustração sobre estímulo Th2 para produção de anticorpos.	34
Figura 17 – Envase das vacinas.	34
Figura 18 – Coleta de sangue de camundongo pela veia submandibular.	35
Figura 19 – Aplicação de toxina de forma intraperitoneal em camundongo.	36
Figura 20 – Aplicação de toxina de forma intramuscular na coxa em camundongo.	37
Figura 21 – Aplicação de vacina subcutânea em coelho.	38
Figura 22 – Coleta de sangue em coelho pela veia auricular.	38
Figura 23 – Procedimento para coloração de Gram.	40
Figura 24 – Coloração de Gram de amostra coletada da orelha de coelho, demonstrando presença de cocos Gram positivos. Visualização em microscopia ótica em lente de aumento de 100 vezes.	40
Figura 25 – Coloração de Gram de amostra da lesão no local da vacina. Visualização em microscopia ótica em lente de aumento de 100 vezes.	41

Figura 26 – Aplicação da vacina em coelho.	46
Figura 27 – Coleta de sangue em coelho.	47
Figura 28 – Ilustração da resposta imune humoral e suas formas de atuação.	48
Figura 29 – Média da sorconversão de cada animal vacinado para os antígenos estudados em comparação com a vacina comercial.	50
Figura 30 – Coelhos alocados em duplas nas gaiolas.	54
Figura 31 – Rolo de papelão utilizado como objeto de enriquecimento ambiental para os coelhos.	55
Figura 32 – Secreção nasal purulenta em coelho.	56
Figura 33 – Ácaro <i>Leporacarus gibbus</i> em microscópio.	58
Figura 34 – Alopecia na região do dorso em coelho.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades acompanhadas e/ou desenvolvidas durante o ECSMV no Laboratório de Imunologia Aplicada.	23
Tabela 2 – Proteínas recombinantes e espécie de <i>Clostridium</i> correspondente utilizadas nas formulações vacinais para o teste de potência.	43
Tabela 3 – Divisão dos grupos para as vacinas de clostridioses testadas. ...	46
Tabela 4 – Cinco principais classes de imunoglobulinas e local de síntese.	49
Tabela 5 – Condições para cada proteína após a realização da padronização do teste de ELISA.	50
Tabela 6 – Valores de referência em UI/mL para cada antígeno.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-HIS – 6 histidinas

Al(OH)₃ – Hidróxido de alumínio

BHI – *Brain heart infusion*

BID – *Bis in die*

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CDTec – Centro de Desenvolvimento Tecnológico

CFR9 – *Code of Federal Regulations Title 9*

CONCEA – Conselho Nacional de Experimentação Animal

D0 – Dia 0

D21 – Dia 21

D35 – Dia 35

DAB - 3,3' diaminobenzedina

D.B.O – Demanda bioquímica de oxigênio

DL – Dose letal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

D.O – Densidade ótica

ECSMV – Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ETX Mut – Toxina *épsilon Clostridium perfringens* mutada

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂O - Água

HCl – Ácido Clorídrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IM – Intramuscular

IPTG – Isopropil β-D-1 tiogalactopiranosídeo

IV – Intravenosa

kDa – Kilodalton

Kg – Kilograma

LB – Luria Bertani

LIA – Laboratório de Imunologia Aplicada

M – Molar

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mM – Milimolar

mg – Miligrama

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

mL – Mililitro

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – Fosfato monossódico

ng – Nanograma

Ni – Níquel

OPD - O-fenilenodiamina

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PBS-t - *Phosphate-buffered saline tween 20*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

QTHL – Quimera para toxina hemorrágica e letal de *Clostridium sordellii*

rBoNT.D – Proteína recombinante para neurotoxina de *Clostridium botulinum* tipo D

RPM – Rotações por minuto

SC – Subcutâneo

SDS – *Sodium dodecyl sulfate*

TaCs-C2 – Toxina *alpha* de *Clostridium septicum* corte 2

TCnA – Toxina *alpha* de *Clostridium novyi*

TcsL – Toxina letal de *Clostridium sordellii*

TeT 50 – Toxina tetânica 50 kilodaltons

UFPEl – Universidade Federal de Pelotas

Ui – Unidade internacional

UNIPAMPA – Universidade Federal do Pampa

USDA – *United States Department of Agriculture*

VERO – Célula de rim de macaco-verde africano

μL – Microlitros

μg - Microgramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	19
2.1 Descrição do Laboratório de Imunologia Aplicada	19
2.1.1 Sala de Imunologia.....	20
2.1.2 Sala de Bacteriologia.....	21
2.1.3 Sala de Biologia Molecular	22
2.1.4 Sala de estudos e sala de professor	22
2.2 Atividades realizadas durante o estágio curricular	22
2.2.1 Expressão de proteínas recombinantes	23
2.2.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (<i>SDS Page</i>)	27
2.2.3 <i>Western Blot</i>	29
2.2.4 Teste de ELISA	30
2.2.5 Preparo de formulação vacinal.....	33
2.2.6 Experimentação Animal.....	35
2.2.7 Microbiologia	39
3 DISCUSSÃO	42
3.1 Teste de potência para vacinas recombinantes contra clostridioses em animais	42
3.1.1 Introdução	42
3.1.2. Produção das formulações vacinais.....	44
3.1.3. Teste de potência em coelhos.....	45
3.1.4. Avaliação da resposta imune humoral.....	48
3.2. Manejo dos animais de experimentação: Bem-estar animal, infecção respiratória e infestação por ácaro	54
3.2.1 Bem-estar animal no manejo de coelhos	54
3.2.2 Infecção respiratória	55
3.2.3 Infestação por ácaro <i>Leporacarus gibbus</i>	58
3.2.4 Conclusão	60
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de vacinas veterinárias é um mercado crescente e busca estabelecer uma boa resposta imune frente a infecções bacterianas, virais e parasitárias (TIZARD, 2019). Na produção animal, diversas doenças infecciosas levam a perdas econômicas, destacando-se as doenças bacterianas, dentre essas, as causadas por bactérias do gênero *Clostridium*. Como forma de prevenção dessas infecções, a vacinação dos animais é o melhor método de controle, aliada à higienização dos locais onde os animais vivem, bem como o manejo adequado (LOBATO et al., 2013). Atualmente, o mercado nacional conta com vacinas polivalentes contra clostridioses para ruminantes, que são de primeira geração e utilizam o próprio patógeno inativado para a produção. Esse método torna a produção onerosa, pois é necessário cultivar o patógeno em grande escala e utilizar métodos de inativação. Dessa forma, visando o aprimoramento das vacinas contra clostridioses, novas tecnologias vêm sendo estudadas, como as vacinas recombinantes, uma vez que reduzem os custos e otimizam os processos de fabricação, através da expressão de proteínas de interesse (FERREIRA et al., 2016).

O gênero *Clostridium* abrange microrganismos pertencentes ao grupo das bactérias Gram-positivas, fermentativas, catalase negativas, oxidase negativas, anaeróbias estritas e formadoras de esporos. As principais espécies de interesse veterinário são *Clostridium tetani*, *C. botulinum*, *C. novyi*, *C. haemolyticum*, *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum* e *C. sordellii*. (QUINN et al., 2007). Os animais infectam-se através de ferimentos, alimentos contaminados ou por aspiração, em que a bactéria adentra o organismo na forma esporulada. Os mecanismos que levam à doença são a formação de toxinas e a invasão de tecidos, sendo as mais conhecidas as neurotoxinas botulínica, tetânica e a toxina épsilon (LOBATO et al., 2013; QUINN et al., 2007). Dentre as diversas manifestações clínicas, da infecção, destacam-se as neurológicas, gástricas e cutâneas, sendo as neurológicas as mais graves, causadas pelos *C. tetani* e *C. botulinum* (QUINN et al., 2007).

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi desenvolvido na área de Imunologia e Biologia Molecular, no Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (CDTec-UFPel). O estágio foi realizado no período de 08 de setembro a 23 de dezembro de 2022, totalizando 450 horas e teve

supervisão do professor Dr. Fabricio Rochedo Conceição e orientação da docente Dr^a. Paula Fonseca Finger.

O interesse pela área de imunologia e biologia molecular foi desenvolvido durante a graduação, em que foi possível participar de grupos de estudos sobre o tema, além de realizar estágios na área que motivaram a realização do ECSMV no local escolhido. As atividades realizadas durante o período de estágio foram relacionadas ao uso de tecnologias recombinantes para a produção de vacinas veterinárias contra clostridioses. Além disso, também foi possível participar das atividades de outros projetos relacionados a tecnologias recombinantes, bem como atividades básicas de lavagem, esterilização de materiais e preparo de soluções.

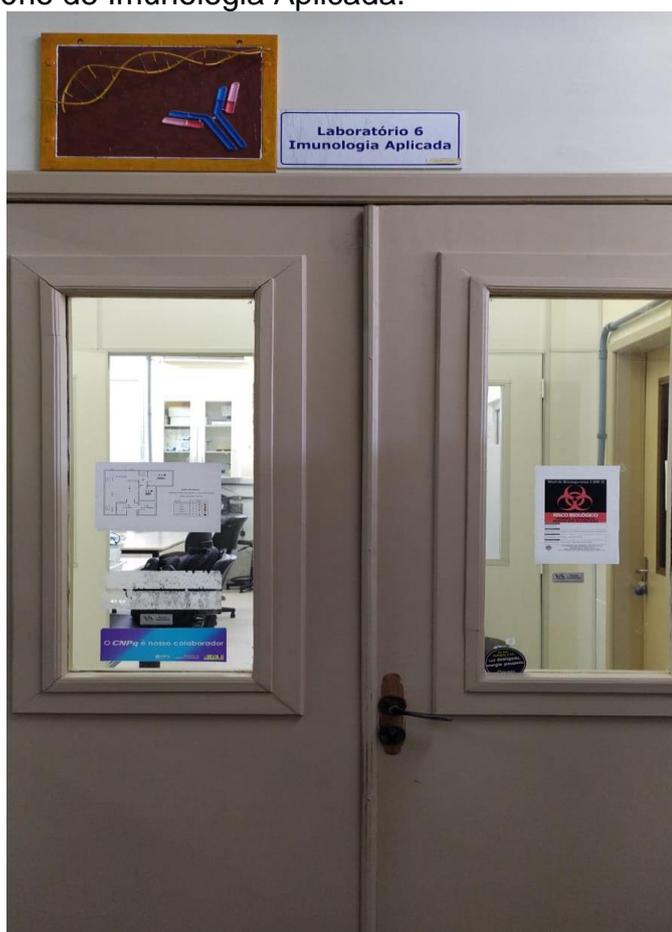
O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades realizadas durante o ECSMV e discutir sobre o teste de potência em coelhos para avaliação das vacinais contra clostridioses e uma abordagem sobre o manejo dos animais no experimento.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.1 Descrição do Laboratório de Imunologia Aplicada

O local escolhido para a realização do ECSMV foi o Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA) (Figura 1), localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (CDTEC - UFPel) (Figura 2), sob supervisão do Professor Dr. Fabrício Rochedo Conceição. O LIA realiza pesquisas em imunologia através da produção de imunobiológicos de interesse veterinário. A principal linha de pesquisa do laboratório é relacionada ao desenvolvimento de vacinas recombinantes contra clostridioses de importância veterinária. As principais espécies estudadas no laboratório são: *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum*.

Figura 1 – Laboratório de Imunologia Aplicada.



Fonte: a autora (2022).

Figura 2 – Fachada CDTEc UFPel.



Fonte: a autora (2022).

O laboratório possui cinco salas, sendo uma sala ampla de imunologia, uma sala de bacteriologia, uma sala de biologia molecular, uma sala de professores e uma de estudos. A equipe do LIA é formada, atualmente, por um total de 14 pessoas, sendo um professor responsável, três pós-doutorandos, quatro alunos de doutorado, duas alunas de mestrado e cinco alunos de graduação para iniciação científica. O horário de funcionamento do laboratório é de segunda à sexta-feira, das 08:00 às 18:00 horas, podendo funcionar aos finais de semana e feriados de acordo com a demanda.

2.1.1 Sala de Imunologia

A sala de imunologia (Figura 3) contém os equipamentos destinados às técnicas visando o estudo da imunologia, como leitor e lavadora de placas de ELISA, equipamentos de biologia molecular, microbiologia e proteômica. A sala é ampla e, além dos equipamentos, contém estrutura para armazenamento de amostras, como freezer e geladeira, armários, duas pias de higienização, um micro-ondas e duas bancadas para realização das atividades.

Figura 3 – Sala de Imunologia vista em diversos ângulos.



Fonte: a autora (2022).

2.1.2 Sala de Bacteriologia

A sala de bacteriologia (Figura 4) possui um fluxo laminar, duas incubadoras do tipo *shaker*, uma centrífuga refrigerada, uma centrífuga *mini spin*, uma geladeira com freezer e uma estufa do tipo D.B.O. Nessa sala são realizadas as análises microbiológicas do laboratório, em que se manipula os microrganismos estudados, principalmente as bactérias do gênero *Clostridium* e bactérias *Escherichia coli*, utilizadas para a expressão de toxóides recombinantes de *Clostridium* spp.

Figura 4 – Sala de bacteriologia vista em diversos ângulos.



Fonte: a autora (2022).

2.1.3 Sala de Biologia Molecular

Na sala de biologia molecular (Figura 5) encontram-se diversos equipamentos como *Workstation* para a realização das reações de PCR (Reação em cadeia da Polimerase), um termociclador, uma fonte e cuba de eletroforese, uma centrífuga *mini spin* e uma geladeira com congelador. Ainda, possui uma área destinada à utilização do brometo de etídeo para a coloração do gel de agarose.

Figura 5 – Sala de Biologia Molecular.



Fonte: a autora (2022).

2.1.4 Sala de estudos e sala de professor

O laboratório conta com uma sala de estudos em que não tem contato com o restante do laboratório, na qual os alunos podem estudar nos intervalos das atividades. Ainda, há a sala de professor, a qual também não há contato com o laboratório.

2.2 Atividades realizadas durante o estágio curricular

Durante o ECSMV foi possível acompanhar e vivenciar a rotina do LIA realizando diversas atividades relacionadas à produção de imunobiológicos de interesse veterinário. As atividades acompanhadas e/ou desenvolvidas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Atividades acompanhadas e/ou desenvolvidas durante o ECSMV no Laboratório de Imunologia Aplicada.

Atividade	Total	Porcentagem
Cultivo de <i>Clostridium</i> spp.	1	0,83%
Coleta de sangue de camundongos	4	3,33%
Coleta de sangue de coelhos	18	15,00%
Coleta de sangue de ovinos	3	2,50%
Dialise	1	0,83%
Eletroforese em gel de agarose	2	1,66%
ELISA	15	12,50%
Expressão de proteínas	4	3,33%
Extração de DNA Plasmidial	2	1,66%
Lavagem e esterilização de materiais de rotina	*	*
Manejo sanitário de coelhos	1	0,83%
Preparo de formulações vacinais	7	5,83%
Preparo de gel de poliacrilamida	**	**
Preparo de soluções e reagentes	**	**
Processamento de amostras de soro	19	15,83%
Quantificação de proteínas	2	1,66%
<i>SDS Page</i>	10	8,83%
Técnica de coloração de Gram	2	1,66%
Vacinação de camundongos	4	3,33%
Vacinação de coelhos	18	15,00%
<i>Western blot</i>	6	5,00%
TOTAL	119	100%

*Atividades realizadas diariamente; **Atividades realizadas semanalmente, conforme necessidade
Fonte: a autora (2022).

A seguir, serão descritas as principais técnicas e atividades realizadas durante o ECSMV.

2.2.1 Expressão de proteínas recombinantes

A técnica de expressão de proteínas recombinantes consiste em codificar proteínas em vetores, geralmente plasmidiais, que foram modificados e após inseridos

em sistemas de expressão (BAESHEN et al., 2015). Esses sistemas podem ser bactérias, leveduras ou vírus (FRANCIS; PAGE, 2010). Contudo, o sistema de expressão mais difundido é pela bactéria *Escherichia coli*, por ser um microrganismo de fácil replicação, que demanda um baixo custo e de fácil manipulação (ROSANO, et al., 2019). A expressão de proteínas recombinantes resulta em produção de vacinas, testes de diagnóstico, fármacos, enzimas, entre outros insumos (PASSAGLIA; ZAHA, 2014).

As atividades realizadas consistiram em acompanhar a expressão de proteínas contendo o epítipo dominante referente às toxinas de bactérias do gênero *Clostridium*, como a toxina TeT 50, ETX Mut, TCnA, TcsL. No LIA, a expressão de proteínas é realizada a partir do vetor plasmidial pET28a, que é inserido em uma cepa de *E. coli* DH5 α , para que haja a replicação, resultando em múltiplas cópias desse plasmídeo. Após, é realizada a extração por kit de extração de DNA (PureLink Thermo Fisher Scientific®) e a eletroforese em gel de agarose para confirmar a presença de DNA plasmidial.

Após realizar essa amplificação do vetor, foi iniciada a transformação, que consiste em inserir o plasmídeo na cepa BL21 (D3) *Star*TM de *E. coli*. Para tal, foi realizada a técnica de choque térmico, através da utilização de cloreto de cálcio (CaCl₂), gelo e água morna (42 °C) (Figura 6).

Figura 6 – Etapa de choque térmico para transformação em *E. coli* cepa BL21 (D3) *Star*TM.



Fonte: a autora (2022).

Após a realização da transformação, as células foram incubadas em tubos contendo 500 µL de meio Luria Bertani (LB), por uma hora em estufa tipo *shaker*, a 37 °C e, após esse período, foi adicionado antibiótico Canamicina 100 µg/mL, pois o plasmídeo possui um gene de resistência a antibiótico na sua composição, sendo possível a seleção das bactérias que possuem o plasmídeo já transformado. Após uma hora, o conteúdo foi transferido para um tubo *falcon* de 10 mL e deixado *overnight* em estufa tipo *shaker* por 37 °C. No outro dia, o volume foi transferido para 100 mL de meio LB acrescido de Canamicina 100 µg/mL e colocado em estufa *shaker* a 37 °C por 150 RPM até atingir a densidade ótica (D.O) de 0,6 a 0,8, para então ser iniciada a indução da expressão utilizando 0,5 mM isopropil-β-D-1-thiogalactopiranosídeo (IPTG).

A indução da expressão de proteínas consiste em adicionar o IPTG ao meio de cultivo para que ocorra a remoção do repressor *operon lac*, permitindo a transcrição das proteínas, através do promotor T7. O *operon* é um conjunto de genes das bactérias que possuem as sequências reguladoras de DNA, regulando a expressão das proteínas. Isso constitui o controle gênico, realizado para otimizar o uso da energia disponível para a bactéria, pois para a expressão de genes, é necessário haver condições adequadas de nutrição, tempo e temperatura (TORTORA et al., 2012). Ainda, é possível ativar ou bloquear a expressão gênica através de estímulos externos. O plasmídeo comercial pET28a utilizado no LIA, possui em sua estrutura o *operon lac*, que tem o operador para a lactose. A lactose é um dissacarídeo encontrado na natureza que, ao ser clivado, gera dois monossacarídeos, glicose e galactose. Esses açúcares são utilizados pela célula como fonte de energia. O IPTG é uma substância sintética análogo da galactose e, quando adicionado ao meio de cultivo, realiza a remoção do repressor, permitindo a transcrição para posterior síntese de proteínas (PASSAGLIA; ZAHA, 2014; TORTORA et al., 2012).

Após a indução da expressão, os cultivos ficaram por três horas em estufa tipo *shaker*, sob agitação e a D.O ajustada para 1. Ao término do período de expressão, foram realizadas alíquotas de 1 mL das amostras e centrifugadas a 13.000 RPM por 2 minutos, para coleta do *pellet* e posterior realização das técnicas de *SDS Page* e *Western Blot*. O cultivo restante foi centrifugado a 7.000 RPM por 10 minutos e o *pellet* suspenso em *wash buffer* (NaH₂PO₄, NaCl, Imidazole pH. 8,0), sendo adicionada a liozima para realização da lise celular, com auxílio da sonicação (seis a sete ciclos de sonicação, 15 segundos sonicando e 30 em repouso) (Figura 7). Essa etapa de

lise deve ser realizada pois as proteínas expressas em *E. coli* são intracelulares, necessitando, dessa forma, retirar a proteína que foi expressa de dentro da célula. A remoção química ocorre pela utilização da enzima lisozima, que estimula a hidrólise das ligações químicas do peptidoglicano da parede celular bacteriana (MARANA et al., 2006). Além disso, a sonicação utilizada age por meio físico através de ondas sonoras que, ao vibrarem, rompem a membrana celular e liberam o conteúdo para o meio (FERDOUS et al., 2021). Após as etapas de lise, o sobrenadante foi armazenado a -20 °C e o *pellet* suspenso em Tampão Fosfato-Salino (PBS) estéril para lavagem. Por fim, o *pellet* foi centrifugado, suspenso em *wash buffer* para as proteínas solúveis. Para as proteínas insolúveis foi utilizado *wash buffer* com 8 M de ureia para a desnaturação da proteína para obtenção dela em solução e incubado por 16 horas a 4 °C.

Figura 7 – Aparelho utilizado na etapa de sonicação.



Fonte: a autora (2022).

Realizadas todas as etapas para obtenção da proteína recombinante, a mesma precisa ser identificada e purificada, uma vez que demais proteínas próprias da bactéria estarão presentes. Essa purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade por níquel em coluna de Ni-*Sepharose*, utilizando o sistema ÄKTAprime® (GE Healthcare®) (Figura 8). No LIA, as proteínas são expressas com a estrutura N-terminal contendo uma cauda de seis histidinas (6-HIS). A presença da cauda de polihistidina é importante para a purificação, uma vez que os íons metálicos de níquel

interagem com a histidina, realizando a passagem pelas colunas somente com as proteínas que contem a cauda de poli-histidina.

Figura 8 – Equipamento para purificação de proteínas.



Fonte: a autora (2022).

2.2.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (*SDS Page*)

A técnica de *SDS Page* foi desenvolvida nos anos 1970 e consiste em realizar a separação das proteínas por diferença das massas moleculares. Para sua realização, é necessário que a proteína seja desnaturada, por isso é fervida por 7 minutos a 100 °C. (PASSAGLIA; ZAHA, 2014). O dodecil sulfato de sódio (SDS), utilizado na técnica, é um detergente que desnatura as estruturas terciárias não ligadas por dissulfeto e conferindo carga negativa às moléculas (BRUNELLE; GREEN, 2014).

Durante o ECSMV, foi acompanhada a realização de *SDS Page* para a análise da expressão de proteínas recombinantes, como ETX Mut, TcsL, TeT 50 e QTHL. A técnica é realizada utilizando-se um gel de poliacrilamida que possui uma porcentagem de acrilamida, que varia de 5% à 15%, de acordo com o tamanho da proteína, medida em kDa. Os géis preparados foram todos com a porcentagem de 12%. O preparo do gel era realizado em duas etapas, a primeira consiste na produção do gel de resolução, feito em suporte específico e deixado para polimerização em estufa a 37 °C, entre 25 e 30 minutos. Após esse período é feito o gel de empilhamento, que possui poros maiores e comprime as proteínas para que atinjam o gel de resolução todas ao mesmo tempo. Nesse último gel é colocado um pente

para formar as divisões dos poços, e o gel é deixado novamente em estufa a 37 °C por mais 20 minutos. Após finalizado, o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese vertical e as amostras foram pipetadas e ligadas à fonte de energia (Figura 9). A carga elétrica inicial foi de 80 volts por 20 minutos, para a passagem das amostras pelo gel de empilhamento e após foi aumentada para 120 volts até a completa passagem das amostras.

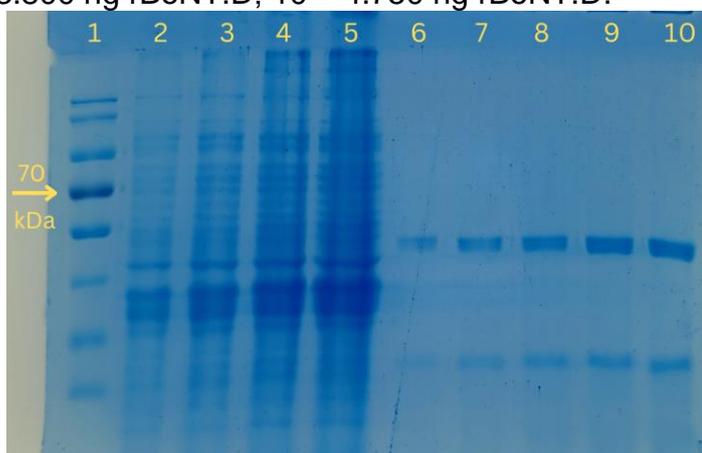
Figura 9 – Acadêmica pipetando amostra em gel de poliacrilamida.



Fonte: a autora (2022).

Após a eletroforese, o gel foi lavado com água destilada, fervido e deixado sob agitação por 5 minutos, em um processo repetido três vezes. O gel foi corado para a visualização das bandas (Figura 10) com solução de corante rápida *Coomassie Blue* G250 (*Coomassie Brilliant Blue* G 250; água ultra pura; HCl fumegante).

Figura 10 – Amostras da bacterina de ETX Mut em gel de poliacrilamida 12% corado com solução de corante rápida (*Coomassie Blue* G 250). 1 - Marcador molecular, com indicação de banda de 70 kDa; 2 – 1,2 µL ETX Mut; 3 – 2,4 µL ETX Mut; 4 – 4,8 µL ETX Mut; 5 – 10 µL ETX Mut; 6 - 950 ng rBoNT.D; 7 – 1.900 ng rBoNT.D; 8 – 2.850 ng rBoNT.D; 9 – 3.800 ng rBoNT.D; 10 – 4.750 ng rBoNT.D.



Fonte: a autora (2022).

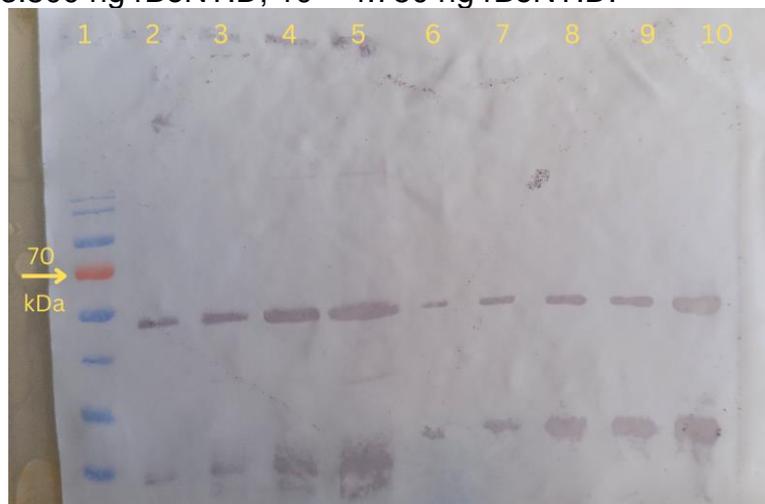
2.2.3 Western Blot

A técnica de *Western Blot* consiste em realizar a transferência das proteínas que estão no gel de poliacrilamida para uma membrana, podendo ser de nitrocelulose ou PVDF (fluoreto de polivinilideno). A técnica foi desenvolvida por Towbin et al. (1979) e consiste em realizar uma reação entre antígeno-anticorpo. Essa técnica é muito eficiente para que se tenha a confirmação da proteína visualizada na técnica de *SDS Page*. Além disso, a técnica é uma alternativa para quando se tem pouca proteína e a visualização é difícil na técnica de *SDS Page* (KURIEN; SCOFIELD, 2006; TOWBIN et al., 1979). Como LIA, as proteínas são expressas com a região N-terminal contendo uma cauda de seis histidinas (6-HIS), é possível realizar uma reação antígeno-anticorpo. Utiliza-se uma solução com anticorpo conjugado anti-histidina, que se liga à cauda de histidina presente na proteína, formando um complexo antígeno-anticorpo. Ao revelar a reação, é adicionado peróxido de hidrogênio, servindo como substrato para a enzima e revelando coloração nas amostras reagentes.

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a técnica para a confirmação das proteínas recombinantes produzidas no laboratório. Utilizou-se a membrana de nitrocelulose e o equipamento *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad®), que emite energia elétrica para que ocorra a transferência do conteúdo do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose, em que fica por 30 minutos a 25 volts. Ao finalizar a transferência, a membrana foi colocada em uma solução de bloqueio com leite em pó a 5%, por uma hora em agitação, pois como a membrana possui alta afinidade por ligações com proteínas, evita-se que ocorra a ligação dos anticorpos de maneira inespecífica. Passado esse período, adicionou-se o anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase, deixando a membrana sob agitação por uma hora. Dessa forma, o anticorpo conjugado irá se ligar nas proteínas que possuem a cauda de histidina.

Por fim, foi realizada a revelação da membrana, que utiliza uma solução contendo Tris HCl 50 mM (pH. 7,6), solução de níquel 0,3%, peróxido de hidrogênio e 3,3' diaminobenzedina (DAB) (Figura 11). Por ser uma técnica que realiza um ensaio imunológico, demonstrando a reação antígeno-anticorpo, ela confirma as proteínas observadas em gel de poliacrilamida (MIGUEL et al., 2012). Podendo ser eficientemente utilizada para as proteínas expressas no laboratório.

Figura 11 – Reação de *Western Blot* para a bacterina TeT 50. 1 – Marcador molecular com indicação de banda de 70 kDa; 2 – 1,2 μ L TeT 50; 3 – 2,4 μ L TeT 50; 4 – 4,8 μ L TeT 50; 5 – 10 μ L TeT 50; 6 - 950 ng rBoNT.D; 7 – 1.900 ng rBoNT.D; 8 – 2.850 ng rBoNT.D; 9 – 3.800 ng rBoNT.D; 10 – 4.750 ng rBoNT.D.

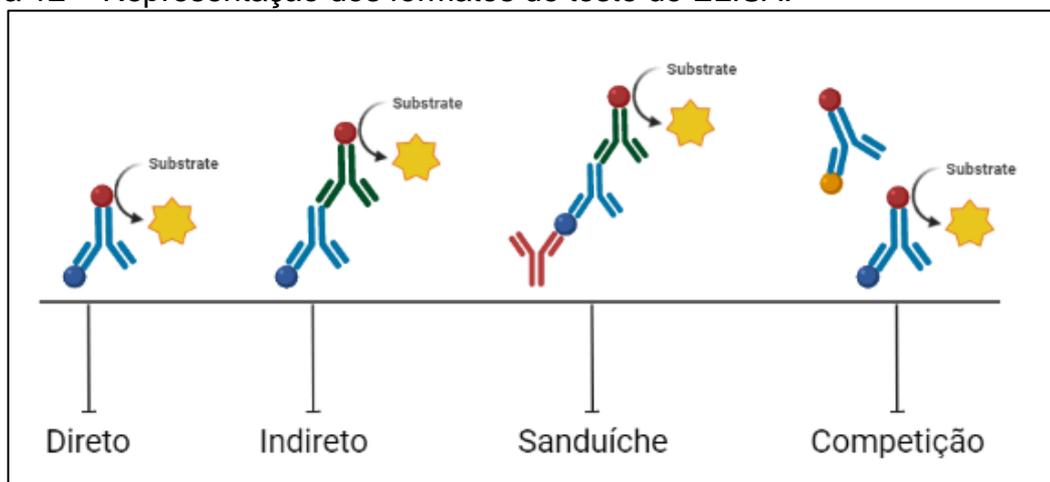


Fonte: a autora (2022).

2.2.4 Teste de ELISA

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) consiste em uma reação antígeno-anticorpo mediada por uma ação enzimática. O teste pode ser usado para detecção de anticorpos oriundos de infecção ou da vacinação ou para detectar antígenos presentes em amostras (TIZARD, 2019). Há quatro formatos diferentes do teste de ELISA, o direto, indireto, sanduíche e de competição, conforme demonstrado na figura 12.

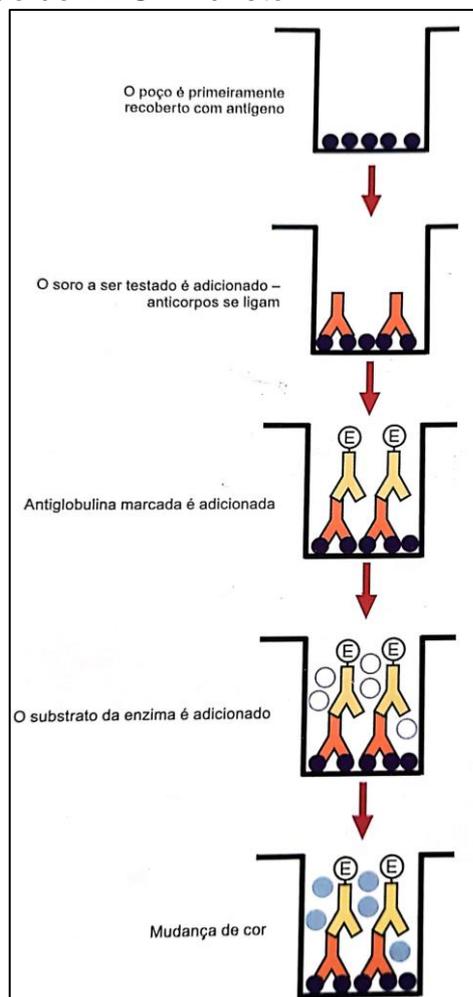
Figura 12 – Representação dos formatos de teste de ELISA.



Fonte: Adaptado de Aydin (2015).

O método utilizado durante as atividades de estágio no LIA foi o ELISA indireto, visualizado na figura 13.

Figura 13 – Exemplificação do ELISA indireto.

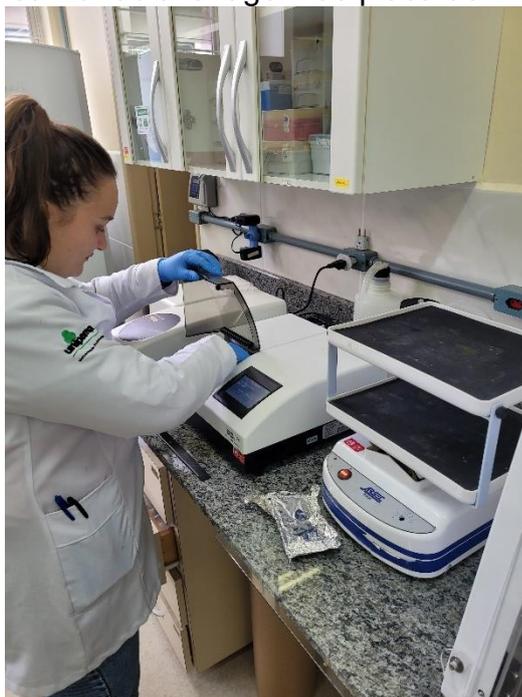


Fonte: TIZARD (2009).

Durante o período de estágio, foi possível acompanhar o teste de ELISA indireto para avaliação da resposta imune frente à vacinação com as vacinas recombinantes desenvolvidas no laboratório. As vacinas desenvolvidas foram para *C. tetani*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. novyi* e *C. septicum*.

Para a realização do teste, foram utilizadas placas de poliestireno contendo 96 cavidades e sensibilizadas no dia anterior com o antígeno de interesse, sendo a proteína recombinante de cada *Clostridium* adicionada de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,0) e deixadas *overnight* a 4 °C. No dia seguinte foi realizada a lavagem das placas em uma lavadora de microplacas, que realiza um ciclo de cinco lavagens, etapa importante para retirar todo o excesso de antígeno que não aderiu na placa (Figura 14).

Figura 14 – Acadêmica realizando a lavagem de placa de ELISA.



Fonte: a autora (2022).

Após lavagem, foi adicionada a solução de bloqueio com leite em pó a 5% em todos os poços da placa, sendo incubada a 37 °C por uma hora. Então realizou-se a diluição seriada dos soros de interesse em PBS-t, desde 1:25 até 1:400, como padronizado no laboratório, em casos em que o soro é muito reativo realiza-se a diluição em PBS-t acrescido de leite em pó a 2,5%. Entre cada etapa, foi realizado o ciclo de lavagens pelo equipamento. Em cada poço da placa foram adicionados 100 µL da amostra diluída e incubada em estufa a 37 °C por uma hora. Após esse período foi feita a adição do anticorpo secundário anti-espécie, o conjugado, também em proporção já estabelecida, dependendo da padronização do teste, sendo diluído em PBS-t e aplicado 100 µL em cada poço da placa, incubando por uma hora a 37 °C.

Após, foi realizada lavagem da placa no equipamento e feita a revelação com solução contendo substrato fosfato-citrato, dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e água (H₂O), no volume de 100 µL/poço. Nessa etapa, a enzima peroxidase ligada ao anticorpo secundário quebra o H₂O₂ em H₂O mais uma molécula de oxigênio, que oxida o OPD e gera coloração amarela (Figura 15). Sendo assim, quanto mais anticorpos tiver a amostra, mais coloração será gerada. Nessa etapa a placa é abrigada da luz por 15 minutos para que ocorra a reação, e após é aplicada a solução de parada, que consiste em ácido sulfúrico a 3%, é realizada a leitura da placa em equipamento específico. A leitura é feita utilizando-se um

espectrofotômetro onde os valores são demonstrados em *software* (Galapagos®) que mede a quantidade de absorvância em cada poço e, a partir disso, sabe-se quais amostras foram reativas e quais não reagiram. Para a realização desse teste de ELISA não foi estabelecido *cutoff*, pois o intuito era apenas saber se os animais soroconverteram ou não. Assim, utilizou-se o valor do dia zero de cada proteína como parâmetro, verificando se as amostras dos D21 e D35 foram superiores ao D0, demonstrando que teve um aumento na produção de anticorpos ao longo do protocolo vacinal.

Figura 15 – Resultado do teste de ELISA, produzindo a coloração amarela.



Fonte: a autora (2022).

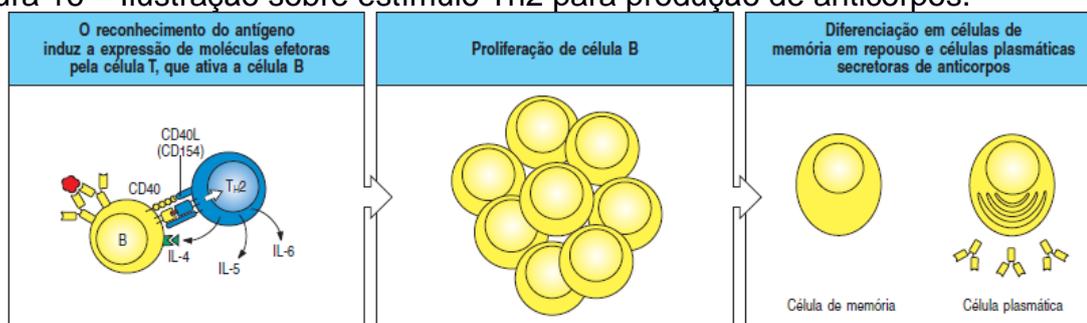
2.2.5 Preparo de formulação vacinal

A partir das proteínas recombinantes expressas de *Clostridium*, foi realizada a preparação de vacinas. Para essas formulações, utilizou-se tanto as proteínas purificadas como as em cultivo, chamadas de bacterinas, e inativadas por formol. As proteínas purificadas foram previamente quantificadas, utilizando Kit BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit Thermo Fisher Scientific®) e as bacterinas por *SDS-PAGE* com utilização de um *software* (*ImageJ*) para o cálculo da concentração. Ao final, as formulações foram compostas de proteína ou bacterina quantificada, adicionadas de adjuvante e PBS.

O adjuvante utilizado foi o hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$), considerado um adjuvante de depósito, pois retarda o tempo que o antígeno injetado será degradado, estimulando uma resposta imune prolongada (TIZARD, 2019). Ainda, o hidróxido de alumínio demonstra ser eficiente na estimulação de Th2 (SHI et al., 2019). Os linfócitos Th2 são importantes, pois estimulam a resposta imune por anticorpos. Diferenciam-

se de células T imaturas em linfócitos T auxiliares 2 e quando ativados, secretam as interleucinas 4, 5, 10, que inibem as células Th1, e 13, as quais estimulam a proliferação dos linfócitos B e, conseqüentemente, a produção de imunoglobulinas (Figura 16) (MURPHY et al., 2010; TIZARD, 2019).

Figura 16 – Ilustração sobre estímulo Th2 para produção de anticorpos.



Fonte: MURPHY et al. (2010).

Os preparos de formulações vacinais acompanhados foram das vacinas contra *C. tetani*, *C. perfringens*, *C. sordellii*, *C. novyi*, *C. septicum* e *C. chauvoei*. As vacinas foram elaboradas em fluxo laminar estéril e deixadas sob agitação em temperatura ambiente, *overnight*, envasadas em recipientes estéreis (Figura 17) e armazenadas sob refrigeração a 4 °C. Ainda, as vacinas foram submetidas a teste de esterilidade para verificar se houve contaminação por microrganismos. Para identificação de bactérias, foi realizado o espalhamento de 0,2 mL da vacina em uma placa de *Petry* contendo meio ágar LB e, para identificação de fungos, o mesmo foi realizado em meio ágar *Sabouraud*.

Figura 17 – Envase das vacinas.



Fonte: a autora (2022).

No teste de esterilidade para fungos, houve crescimento de uma colônia de aspecto cremoso e esbranquiçado na placa da vacina TeT 50. Dessa forma, realizou-

se todo o processo de formulação vacinal novamente para garantir que a vacina não estivesse contaminada e, realizou-se um novo teste de esterilidade confirmando que não havia contaminação. As demais formulações vacinais não apresentaram contaminação. Os testes de esterilidade foram realizados para as vacinas que seriam testadas em camundongos e coelhos.

2.2.6 Experimentação Animal

No Brasil, a pesquisa com a utilização de animais é regulamentada pelo CONCEA, criado pela Lei nº 11.794, em que se estabelece condições para a utilização de animais em experimentos de pesquisa, avaliando a necessidade de sua utilização para os fins científicos e demonstrando à comunidade a importância de utilizar um modelo animal para tal experimento (CAMPOS et al., 2019). As atividades realizadas com experimentação animal durante o ECSMV consistiram em coleta de sangue de camundongos, coelhos e ovinos, vacinação de camundongos e coelhos e ensaio de desafio letal em camundongos, além de manejo sanitário de coelhos. Todas as atividades tiveram aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPel (CEUA UFPel).

A vacinação e coleta de sangue de camundongos foram realizadas para o experimento com *C. sordellii*, em que os animais foram vacinados no dia 0, 14 e 21 de forma subcutânea, na região lombar e realizada coleta de sangue pela bochecha na veia submandibular (Figura 18), ou pelo olho na veia retro-orbital, sendo o local de eleição a bochecha, por ser menos invasivo e estressante.

Figura 18 – Coleta de sangue de camundongo pela veia submandibular.



Fonte: a autora (2022).

No dia 35 foi realizada a eutanásia dos camundongos por exsanguinação, através de punção cardíaca. Para serem eutanasiados, os animais foram submetidos à anestesia com isoflurano. Os camundongos utilizados foram da linhagem *Balb C* e um total de 45 animais, alocados em seis grupos, sendo eles: vacinados para a toxina letal de *C. sordellii* na forma purificada (Grupo 1); vacinados para a toxina letal de *C. sordellii* na forma de bacterina (Grupo 2); vacinados com uma quimera para as toxinas letal e hemorrágica de *C. sordellii* em sua forma purificada (Grupo 3); vacinados com uma quimera para as toxinas letal e hemorrágica de *C. sordellii* na forma de bacterina (Grupo 4); vacinados com a vacina comercial existente no mercado nacional (Grupo 5); e um grupo controle vacinado com PBS (Grupo 6).

Também foi possível acompanhar o ensaio de desafio letal nos camundongos. O ensaio consiste em encontrar as doses letais (DL) para matar 100% e 50% da população de camundongos inoculados com as toxinas de *Clostridium*. O desafio é realizado para que os animais possam, após a realização da vacinação, serem desafiados com as toxinas e verificar se a vacina conferiu proteção.

As toxinas utilizadas para o desafio foram de *C. sordellii*, inoculada intraperitonealmente nos camundongos (Figura 19) e de *C. chauvoei*, inoculada de forma intramuscular na coxa esquerda dos animais (Figura 20). Para o desafio letal de *C. sordellii* a DL 50 foi 1:64 e para *C. chauvoei* a DL 50 foi 1:10000 e a DL 100 foi 1:1000. Para chegar a esses resultados, foram testadas diferentes diluições da toxina nos camundongos até encontrar o resultado esperado.

Figura 19 – Aplicação de toxina de forma intraperitoneal em camundongo.



Fonte: a autora (2022).

Figura 20 – Aplicação de toxina de forma intramuscular na coxa em camundongo.



Fonte: a autora (2022).

Para o experimento com ovinos, a coleta de sangue foi realizada em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Infecto-Parasitária, para um experimento de linfadenite caseosa. Os animais do experimento eram fêmeas com idade entre 6 e 12 meses, e a coleta de sangue foi realizada em três momentos, pela veia jugular. Durante o ECSMV foi possível acompanhar somente as coletas de sangue dos ovinos deste experimento.

No manejo de coelhos, a coleta de sangue e vacinação foram acompanhadas, com o objetivo de realizar teste de potência das vacinas de um experimento no LIA. Os animais eram da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, pesando entre 1,7 e 2,2 kg, alocados em seis grupos com oito animais em cada grupo. As vacinas testadas foram para *C. sordellii*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens* e *C. tetani*, além de um grupo com quatro animais para a vacina comercial nacional. Os animais foram vacinados nos dias 0 e 21, no dia 35 foi realizada a eutanásia por exsanguinação através de punção cardíaca. As vacinas foram aplicadas de forma subcutânea na região lombar (Figura 21) e realizada coleta de sangue pela veia auricular (Figura 22), sendo coletado até 1 mL de sangue.

Figura 21 – Aplicação de vacina subcutânea em coelho.



Fonte: a autora (2022).

Figura 22 – Coleta de sangue em coelho pela veia auricular.



Fonte: a autora (2022).

Além das coletas de sangue, foi possível acompanhar o manejo dos coelhos. Visto que o biotério da UFPel não possui estrutura para abrigar lagomorfos, precisouse adaptar uma sala para que os animais pudessem ser alocados sem prejuízo ao bem estar.

Durante o período de experimento, os animais apresentaram uma infecção respiratória que foi causada por uma bactéria do gênero *Pasteurella*, além de

apresentarem uma infestação pelo ácaro *Leporacarus gibbus*, que causou alopecia em alguns animais. Para o tratamento da infecção respiratória foi utilizado antibiótico enrofloxacino 7 mg/Kg, BID, SC (Selvitrex®) e o anti-inflamatório meloxicam 0,2 mg/Kg, SID, SC (Maxicam®) e realizada a limpeza da secreção nasal e aferição da temperatura, bem como a ausculta pulmonar. Já para o tratamento do ácaro não foram utilizados medicamentos, visto que a infestação foi autolimitante e os animais recuperaram-se logo em seguida. Esses casos serão abordados na seção de discussão do relatório.

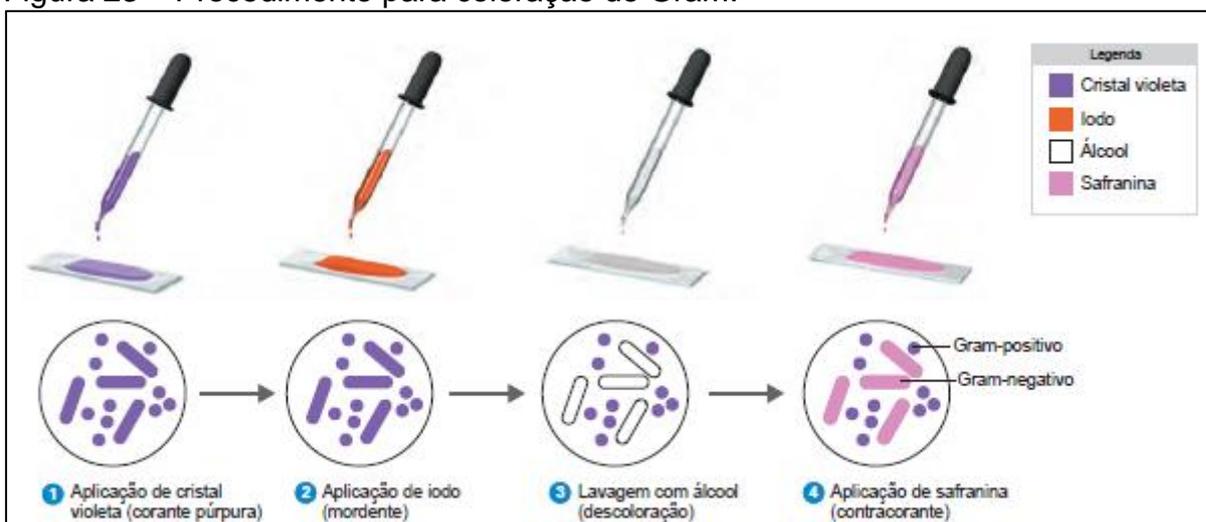
2.2.7 Microbiologia

As atividades envolvendo microbiologia consistiram em cultivo de *Clostridium* spp. e realização de Técnica de Gram. O cultivo de *Clostridium* spp. foi realizado a partir de amostras liofilizadas presentes no laboratório e semeadas em meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com Cisteína, que confere anaerobiose para o meio, e também semeados em placas contendo ágar sangue. As amostras em meio líquido foram acondicionadas em tubos de ensaio e foi adicionado óleo mineral na parte superior para garantir a anaerobiose do meio, sendo deixadas em estufa a 37 °C, em câmara de anaerobiose por 24, 48 e 72 horas, para observar a formação dos esporos. As amostras semeadas em meio ágar sangue foram deixadas em câmara de anaerobiose, a 37 °C por 24, 48 e 72 horas também.

Outra técnica microbiológica acompanhada foi a Técnica de Gram, que se baseia em diferenciar, por coloração, o tipo de parede celular da bactéria, dividindo-a em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-positivas possuem a parede espessa e uniforme, composta de peptidoglicanos e ácidos teicóicos, já as Gram-negativas possuem a parede composta de uma membrana externa e periplasma contendo pouco peptidoglicano, corando-se de azul e vermelho, respectivamente (QUINN et al., 2007). Foi possível acompanhar essa técnica para o diagnóstico de otite em uma amostra de suabe de um coelho proveniente do experimento realizado com as vacinas, e uma amostra de uma lesão causada pela vacinação, também em coelho do experimento. A técnica foi realizada fazendo-se um esfregaço em lâmina a partir de uma amostra cultivada, seguindo o protocolo de coloração: um minuto com cristal violeta, após lavada com água destilada entre cada etapa, aplicado lugol ou iodo por um minuto, álcool ou acetona como solução

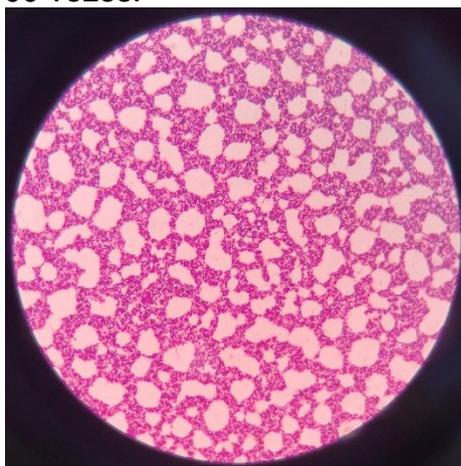
descolorante por 30 segundos e, por fim, aplicado o contracorante Safranina por um minuto (Figura 23). Após, foi realizada a visualização em microscopia ótica na lente de aumento de 100 vezes. A amostra proveniente de otite demonstrou a presença de bactérias Gram positivas (Figura 24) e a amostra proveniente de lesão vacinal, não demonstrou presença de bactérias, somente de células inflamatórias, conforme figura 25.

Figura 23 – Procedimento para coloração de Gram.



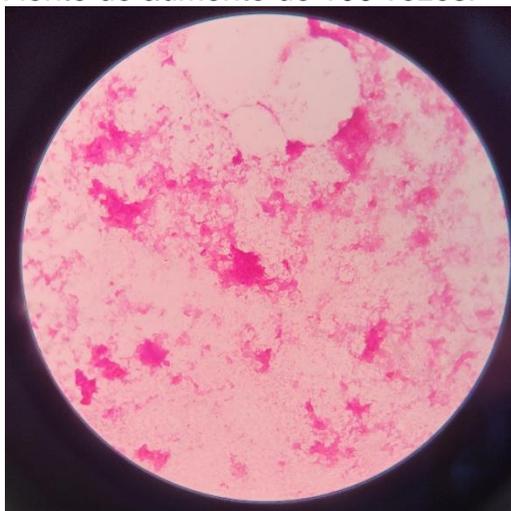
Fonte: TORTORA et al. (2012).

Figura 24 – Coloração de Gram de amostra coletada da orelha de coelho, demonstrando presença de cocos Gram positivos. Visualização em microscopia ótica em lente de aumento de 100 vezes.



Fonte: a autora (2022).

Figura 25 – Coloração de Gram de amostra da lesão no local da vacina. Visualização em microscopia ótica em lente de aumento de 100 vezes.



Fonte: a autora (2022).

As atividades acompanhadas e desenvolvidas foram importantes para uma visão prática de assuntos abordados, muitas vezes, apenas na teoria durante a graduação. Assim, possibilitou consolidar o conhecimento adquirido sobre biologia molecular, sendo uma área em crescimento dentro da medicina veterinária, que possibilita desenvolver tecnologias para prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças.

3 DISCUSSÃO

A presente discussão visa abordar duas atividades realizadas durante o ECSMV: o teste de potência das vacinas recombinantes e o manejo dos coelhos de experimentação.

3.1 Teste de potência para vacinas recombinantes contra clostridioses em animais

3.1.1 Introdução

O Brasil possui, atualmente, um rebanho bovino de 224,6 milhões de cabeças (IBGE, 2021a), um rebanho ovino de aproximadamente 20 milhões de cabeças e um rebanho caprino próximo de 12 milhões cabeças (IBGE, 2021b). Um dos principais desafios enfrentados na produção animal são as doenças infecciosas, que acometem os animais e geram perdas econômicas, algumas vezes inviabilizando a continuidade da atividade em algumas propriedades (ZANELLA, 2016). Dentre as doenças infecciosas de importância em animais de produção, destacam-se as clostridioses, que são de origem bacteriana. As principais doenças causadas por essas bactérias são o tétano, o botulismo, a gangrena gasosa e o carbúnculo sintomático. O mecanismo para o desenvolvimento da doença é através da produção de toxinas que são produzidas pela bactéria e levam ao desenvolvimento dos sinais clínicos. Esses agentes podem ser transmitidos aos humanos, sendo consideradas zoonoses, para as quais a melhor forma de prevenção é a vacinação (LOBATO et al., 2013).

Atualmente, existem vacinas comerciais que abrangem os principais *Clostridium* spp. que acometem os animais. Essas vacinas são de primeira geração e utilizam o microrganismo inativado ou o toxóide obtido da cultura da bactéria para a sua produção. Para isso, as vacinas necessitam ser produzidas em locais de ampla estrutura, pois é necessário cultivar o *Clostridium* spp. em larga escala e inativá-lo, gerando um custo de produção alto. Além disso, esse tipo de produção pode apresentar alguma toxicidade residual devido à incompleta inativação do toxóide, visto que é utilizada a toxina em sua totalidade (FERREIRA et al., 2016).

Dessa forma, as vacinas que utilizam a tecnologia recombinante vêm crescendo no mercado, principalmente de medicina veterinária, e são uma nova alternativa para a produção de vacinas contra clostridioses. Essas são as vacinas de

segunda geração, as quais são mais robustas que as de primeira, principalmente com relação ao custo de produção. As vacinas recombinantes utilizam biofábricas, sendo a bactéria *Escherichia coli* de escolha, pois possui um plasmídeo e tem a capacidade de produzir somente a região necessária do toxóide para o reconhecimento do sistema imune (FERREIRA et al., 2016).

O LIA, onde foi realizado o ECSMV, possui como linha de pesquisa o desenvolvimento de vacinas recombinantes veterinárias contra clostridioses. Essas vacinas são de subunidade, ou seja, utilizam apenas um fragmento do toxóide produzido pelo *Clostridium* spp. As vacinas de subunidade contêm porções de interesse para que o sistema imune as reconheça, não utilizando a totalidade da proteína. Assim, as vacinas desenvolvidas no LIA foram desenhadas utilizando o domínio de ligação ao receptor, preservando o epítipo dominante e, dessa forma, inutilizando o toxóide por inteiro, deixando a vacina mais segura e reduzindo as chances de uma resposta inadequada (FERREIRA et al., 2016; TIZARD, 2019).

O principal objetivo do desenvolvimento de uma nova tecnologia é reduzir custos e simplificar os processos de fabricação de vacinas veterinárias. Nesse caso, a vacina contra as clostridioses abrange o *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. septicum* e *C. haemolyticum*. A tecnologia que o laboratório desenvolveu tem parceria com uma empresa privada, visando otimizar a produção das vacinas existentes.

Na presente discussão serão abordadas as espécies *C. sordellii*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. perfringens* e *C. tetani*, que foram utilizadas no teste de potência. As vacinas foram nomeadas de acordo com a toxina e seu desenho de imunoinformática, conforme tabela 2.

Tabela 2 – Proteínas recombinantes e espécie de *Clostridium* correspondente utilizadas nas formulações vacinais para o teste de potência.

Proteína recombinante	Espécie
Toxina Letal de <i>C. sordellii</i> (TcsL)	<i>C. sordellii</i>
Toxina <i>alpha</i> de <i>C. septicum</i> - corte 2 (TaCs-C2)	<i>C. septicum</i>
Toxina <i>alpha</i> de <i>C. novyi</i> (TCnA)	<i>C. novyi</i>
Toxina <i>epsilon</i> mutada (ETX Mut)	<i>C. perfringens</i>
Toxina tetânica – 50 kDa (TeT-50)	<i>C. tetani</i>

Fonte: a autora (2023).

3.1.2. Produção das formulações vacinais

As formulações vacinais foram produzidas a partir das proteínas recombinantes expressas em *E. coli* cepa BL21 (D3) *Star*TM, de acordo com a tabela 2. A utilização de bactérias *E. coli* para a expressão de proteínas é muito difundida, pois comparada a outros sistemas procariotos e eucariotos, se torna barata, de fácil manipulação e o crescimento do microrganismo é rápido. A cepa de *E. coli* utilizada para a expressão foi a BL21 (D3) *Star*TM, essa cepa possui uma maior estabilidade do mRNA e, conseqüentemente, facilita a expressão de proteínas por parte da maquinária da bactéria (JIA; JEON, 2016). A expressão foi realizada utilizando-se plasmídeo comercial pET28a, contendo o gene de interesse ou parte imunodominante que codifica para cada proteína, conforme descrito na tabela 2. A expressão das proteínas foi realizada de acordo com a metodologia já descrita na seção 2.2.1, e a avaliação da expressão foi pelas técnicas de *SDS Page* e *Western blot*.

Após confirmada a expressão das proteínas recombinantes, os cultivos, também chamados de bacterinas, foram inativados por formaldeído, durante 24 horas. As bacterinas constituem a estrutura da bactéria *E. coli* contendo os genes de interesse, somente inativada por formaldeído. Essas possuem vantagens em relação às proteínas purificadas, isso porque o custo para a purificação da proteína recombinante é mais elevado para a indústria veterinária (FERREIRA et al., 2016).

Após a realização do processo de expressão das proteínas recombinantes, deu-se início ao processo de formulação vacinal. Foi feita a adsorção das bacterinas em $Al(OH)_3$ à temperatura ambiente, *overnight*, sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração. Os adjuvantes a base de alumínio possuem um vasto uso em vacinas, pois têm um baixo custo, alta eficiência e apresentam-se seguros para a utilização em humanos e animais (HE et al., 2015). O hidróxido de alumínio foi utilizado em uma proporção de 15%. Conforme He et al. (2015), esse adjuvante possibilita a união dos antígenos em sua superfície, mantendo as propriedades físico-químicas. Além disso, a substância é capaz de interagir com células apresentadoras de antígenos, facilitando o seu reconhecimento pelo sistema imune.

As principais células apresentadoras de antígenos são as células dendríticas, macrófagos e células B. Essas realizam o processamento antigênico pela divisão das moléculas em peptídeos menores e ligando-os a receptores especializados. Esses são conhecidos como moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) e

divididos em duas classes, MHC I e MHC II. Essas moléculas possuem importância para a imunidade adaptativa, pois desencadeiam a resposta quando os peptídeos antigênicos, junto ao MHC, se acoplam em receptores específicos nos linfócitos T (TIZARD, 2019). O hidróxido de alumínio promove a diferenciação das células dendríticas e potencializa o processo de reação do sistema imune (HE et al., 2015).

Ao finalizar o processo de adsorção das vacinas, foi realizado o teste de esterilidade para verificar alguma possível contaminação por bactérias ou fungos. No teste de esterilidade para bactérias foi espalhado 200 µL da vacina, com auxílio da alça de *Drigalsky*, em uma placa de *Petry* contendo Ágar LB e armazenado em estufa a 37 °C por 24 horas. Para o teste de fungos, foi espalhado 200 µL da vacina em uma placa de *Petry* contendo Ágar Sabouraud e incubado a 28 °C por 21 dias. Os testes foram realizados de acordo com a Portaria N°49 de 12 de maio de 1997 e Instrução Normativa N° 23 de 18 de março de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

3.1.3. Teste de potência em coelhos

O teste de potência consiste em avaliar a titulação de anticorpos que o imunobiológico foi capaz de induzir, atestando a potência do produto (LIMA et al., 2011). Para as clostridioses, o MAPA prevê em sua normativa a realização do teste de potência para a avaliação das vacinas (MAPA, Port. n°49, 1997). Para a realização do teste, foram utilizados coelhos, alocados em cinco grupos com oito animais, e um grupo controle (vacina comercial) contendo quatro animais. Os animais eram da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, pesando entre 1,7 e 2,2 kg, conforme Portaria N°49 de 12 de maio de 1997 (MAPA, Port. n°49, 1997). A Tabela 3 demonstra a divisão dos grupos e as vacinas testadas.

Tabela 3 – Divisão dos grupos para as vacinas de clostridioses testadas.

Grupos	Patógeno	Formulação	Nº de animais
G1	<i>C. sordellii</i>	Bacterinas TcsL (300 µg) + Al(OH) ₃	8
G2	<i>C. septicum</i>	Bacterinas TaCs-C2 (300 µg) + Al(OH) ₃	8
G3	<i>C. novyi</i>	Bacterinas de TCnA (300 µg) + Al(OH) ₃	8
G4	<i>C. perfringens</i>	Bacterina de ETX Mut (300 µg) + Al(OH) ₃	8
G5	<i>C. tetani</i>	Bacterina de TeT 50 (300 µg) + Al(OH) ₃	8
G6	Vacina comercial	Bacterina-toxóide	4

Fonte: a autora (2022).

No Brasil, não existe um controle oficial que certifique a qualidade das vacinas contra clostridioses quanto à potência da composição do imunobiológico. Para essa certificação, realiza-se o teste de potência por soroneutralização em camundongos, que é reconhecido pelo MAPA (LIMA et al., 2011). Para o teste, é preciso vacinar coelhos para a produção do soro e, posterior avaliação. Os animais foram vacinados com a metade da dose recomendada para bovinos, nesse caso utilizou-se 2 mL, via subcutânea, conforme figura 26.

Figura 26 – Aplicação da vacina em coelho.



Fonte: a autora (2022).

O protocolo de vacinação foi realizado com duas doses, nos dias 0 e 21, com a coleta de sangue pela veia auricular (Figura 27) em ambos os dias, sendo no dia 35 realizada a eutanásia por exsanguinação.

Figura 27 – Coleta de sangue em coelho.



Fonte: a autora (2022).

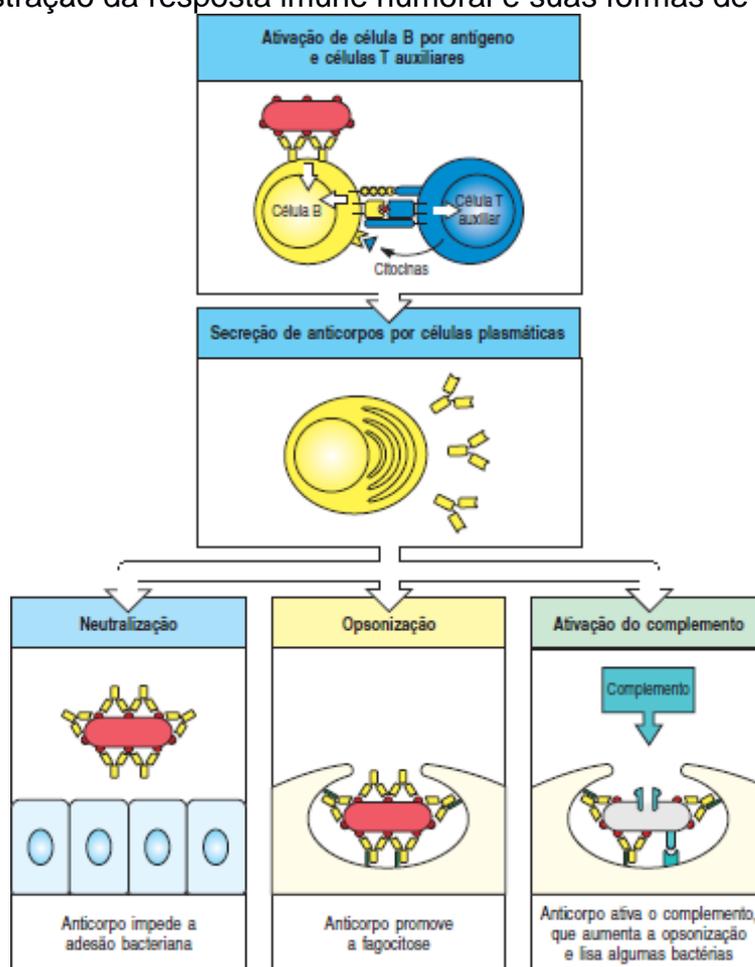
Os animais foram anestesiados com 3 mg/kg IM de xilazina (Xilasin®) e 30 mg/kg IV de tiopental (Thiopentax®). Após anestesiados, foi realizado teste de reflexo para a confirmação da indução anestésica, e então iniciou-se o procedimento. Os coelhos foram colocados em decúbito lateral direito e localizado o coração para a realização da punção cardíaca. O sangue foi armazenado em tubos do tipo *falcon* de 50 mL, totalizando uma média de 70 mL de sangue por animal. O sangue foi deixado por 15 minutos em estufa a 37 °C para retração do coágulo e depois centrifugados a 3.000 RPM por 15 minutos. Realizou-se a coleta do soro e posterior armazenamento em *freezer* -80 °C.

Atualmente, o teste de potência tem sido desenvolvido para a sua realização *in vitro*, visando minimizar o uso de animais para a experimentação (TORGEMAN et al., 2017). Lima et al. (2011), padronizaram um teste *in vitro* utilizando células VERO para realização do teste de potência para vacinas contra *C. novyi* tipo B. Os autores obtiveram um coeficiente de correlação entre as técnicas de 98,38%, mostrando que é possível utilizar o teste *in vitro*. Contudo, o método *in vivo* ainda continua sendo o indicado pelo MAPA e apresenta alta sensibilidade e segurança.

3.1.4. Avaliação da resposta imune humoral

O sistema imunológico é representado por dois tipos de respostas: resposta imune humoral e resposta imune celular. A resposta imune humoral é mediada por anticorpos produzidos pelas células B e faz parte da resposta imune adaptativa. Quando o organismo entra em contato com um antígeno, ocorre a ativação das células B virgens com ajuda das células T auxiliares. Os anticorpos atuam de três formas: pela neutralização dos patógenos, pela opsonização através da facilitação da captura do antígeno pelos fagócitos e através da ativação das proteínas do sistema complemento, conforme demonstrado na figura 28 (MURPHY et al., 2010).

Figura 28 – Ilustração da resposta imune humoral e suas formas de atuação.



Fonte: Murphy et al. (2010).

As imunoglobulinas são glicoproteínas conhecidas como imunoglobulinas e que se dividem em cinco classes, conforme tabela 4 (TIZARD, 2019). A produção deles ocorre a partir de uma sinalização das células T auxiliares para as células B que se proliferam e diferenciam-se em células plasmáticas (MURPHY et al., 2010).

Tabela 4 – Cinco principais classes de imunoglobulinas e local de síntese.

Imunoglobulina	Sintetizada principalmente em:
IgM	Baço e linfonodos
IgG	Baço e linfonodos
IgA	Trato intestinal e respiratório
IgE	Trato intestinal e respiratório
IgD	Baço e linfonodos

Fonte: Adaptado de Tizard (2009).

A resposta imune humoral frente à vacinação dos animais foi avaliada utilizando os testes de ELISA e de soroneutralização em camundongos. O ELISA realizado foi o indireto, que consiste na utilização de um segundo anticorpo ligado à enzima que se liga ao anticorpo primário que reconheceu o antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo (AYDIN, 2015). Primeiramente, realizou-se a padronização do teste a partir de *pools* das amostras de soros provenientes dos coelhos vacinados. As microplacas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com os antígenos nas concentrações de 100 ng e 200 ng, e deixadas *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, deu-se continuidade ao teste avaliando diversas concentrações das amostras de soro e do anticorpo conjugado anti-coelho. A realização do teste ocorreu conforme já descrito no item 2.2.4.

A partir dos resultados dos ELISAs para padronização, notou-se que haviam respostas inespecíficas na placa de TcsL e TaCs-C2, com amostras reagindo muito intensamente no dia 0. Com isso, optou-se por realizar a diluição do soro em leite em pó diluído em PBS-t, na proporção de 2,5%. Essa estratégia diminui reações inespecíficas, pois a proteína advinda do leite liga-se nas regiões da placa que não foram ocupadas pelo antígeno na sensibilização. Dessa forma, o anticorpo primário liga-se somente no antígeno, evitando outro tipo de ligação e reações inespecíficas. Além do leite em pó, pode-se utilizar caseína, gelatina ou soroalbumina como estratégia para evitar inespecificidade (GASPAR et al., 2015). Dessa forma, realizou-se uma nova padronização, dessa vez utilizando 100 ng, 200 ng e 400 ng e a diluição dos soros foi feita em leite em pó 2,5% para diminuir as ligações inespecíficas.

Após a etapa de padronização, as condições necessárias para realização do teste foram determinadas de acordo com a tabela 5, e iniciou-se o processo para avaliação de potência. As placas foram sensibilizadas com a concentração de

antígeno específica para cada proteína e realizado o ELISA indireto com os soros dos animais, individualmente, além do soro dos animais vacinados com a vacina comercial, a fim de comparação. Para o grupo 6, da vacina comercial, foi testado somente três soros de um total de quatro, visto que em um dos animais a coleta de sangue nos dias 0 e 21 não foi realizada.

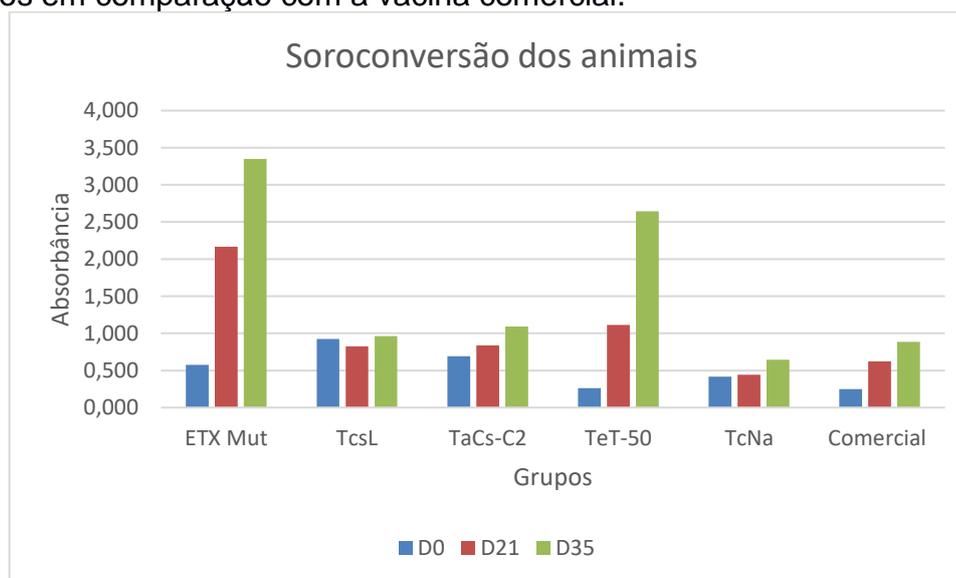
Tabela 5 – Condições para cada proteína após a realização da padronização do teste de ELISA.

Proteína Recombinante	Concentração Proteína	Diluição soro	Diluição Anticorpo conjugado
TcsL	200 ng	1:25	1:2500
TaCs-C2	200 ng	1:25	1:2500
TCnA	100 ng	1:25	1:2500
ETX Mut	400 ng	1:400	1:2500
TeT 50	200 ng	1:50	1:2500

Fonte: a autora (2022).

A soroconversão dos animais está demonstrada, através da realização de uma média nos grupos, no gráfico abaixo (Figura 29).

Figura 29 – Média da soroconversão de cada animal vacinado para os antígenos estudados em comparação com a vacina comercial.



Fonte: a autora (2022).

Os animais testados para as proteínas TcsL e TcNa não soroconverteram de forma satisfatória. Uma explicação para essa baixa eficiência pode ser pelo fato de os animais terem passado por uma infecção respiratória, podendo ter alterado a imunogenicidade da vacina, devido à necessidade de uso de medicações para o tratamento da pneumonia. Alguns estudos apontam que a utilização de medicamentos anti-inflamatórios pode alterar a produção de anticorpos (SALEH et al., 2016; SHAHEED et al., 2022). Swift (1922), através de um estudo pioneiro, relatou que o uso de salicilato em coelhos vacinados para *Streptococcus viridans* diminuiu a quantidade de anticorpos fixadores de complemento, além de hemolisinas e aglutininas. Nesse estudo foi usado um grupo controle que foi somente vacinado e sem administração do anti-inflamatório. Ainda, foi realizado *in vitro* o tratamento do antígeno e após a vacinação dos animais, demonstrando também a diminuição da produção de anticorpos nos animais tratados com salicilato. Conforme estudos ao longo de décadas, demonstrou-se que a utilização de medicamentos e a presença de infecções podem alterar a dinâmica do sistema imunológico frente à vacinação (SALEH et al., 2016; SHAHEED et al., 2022). Dessa forma, a baixa soroconversão poderia ser justificada pelo tratamento dos animais para o processo infeccioso e inflamatório.

Para a proteína TaCs-C2, também não houve uma soroconversão satisfatória. Na realização do ELISA para essa proteína, notou-se que ocorreram, novamente, reações inespecíficas, contudo o D21 e D35 foram superiores ao D0, demonstrando a soroconversão. Em um estudo de Thachil et al. (2013), foi realizada a vacinação de perus com uma bacterina-toxóide contra *C. septicum* e houve uma soroconversão significativa após o protocolo de vacinação. Ainda, os autores observaram que houve uma diminuição no número de mortalidade por dermatite clostridial durante o desafio nos animais vacinados em comparação aos não vacinados. Além da mortalidade, foi observada uma redução no uso de antibióticos nos animais vacinados. Alves et al. (2021) descreveram que uma vacina recombinante para a toxina alfa de *C. septicum* demonstrou soroconversão satisfatória em comparação a outras vacinas para o mesmo agente. Novamente, a hipótese de que a infecção respiratória dos coelhos pode ter alterado a imunogenicidade das vacinas foi levantada no grupo vacinado.

Os animais testados para a proteínas TeT-50 também não soroconverteram de forma desejada. O desenvolvimento de vacinas contra *C. tetani* busca aprimorar a inativação da neurotoxina. Assim, as vacinas recombinantes são ótimas candidatas,

pois é possível selecionar somente o domínio de ligação com o receptor e excluir os aminoácidos que levam à formação da neurotoxina (PRZEDPELSKI et al., 2020). Liu et al. (2020) realizaram estudo de uma vacina recombinante de subunidade para tétano e ficou demonstrado que a titulação de anticorpos foi maior na vacina recombinante do que na vacina comercial. Esse fato se explica pelo desenvolvimento da vacina, priorizando o domínio em que os epítomos de proteção estão localizados. Dessa forma, evidencia-se a importância do desenvolvimento de vacinas mais robustas, demonstrando uma melhor resposta imune humoral em relação às vacinas de primeira geração.

A proteína recombinante ETX Mut soroconverteu em todas as oito amostras de forma satisfatória. Ferreira et al. (2019), em um estudo com a toxina alfa de *C. perfringens*, relataram uma soroconversão da vacina recombinante superior a comercial, demonstrando uma eficácia das vacinas recombinantes. Em relação à toxina épsilon, em um estudo de 365 dias, demonstrou-se que bovinos vacinados com a vacina recombinante obtiveram 100% de soroconversão. Ainda, a vacina comercial apresentou uma produção de anticorpos inferior à recombinante (GALVÃO et al., 2021). Em um trabalho de Ferreira et al. (2018), ovinos e bovinos foram vacinados com uma vacina recombinante para a toxina épsilon e demonstrou-se uma titulação maior de anticorpos em comparação às vacinas disponíveis no mercado. Além disso, observou-se que a bactéria recombinante testada gerou uma titulação de anticorpos neutralizantes de até 10 UI/mL comparando-se à titulação do toxóide comercial, sendo o exigido pelo CFR9/USDA de 2 UI/mL (USDA, 2017).

Somente a vacina para ETX Mut teve uma soroconversão satisfatória. Os animais testados para essa vacina também foram acometidos pela infecção respiratória. Dessa forma, tem-se a possibilidade que as regiões vacinais desenhadas para as outras proteínas podem não estar gerando uma resposta imune eficiente, dessa forma necessita uma revisão de bioinformática e imunoinformática dos antígenos desenhados e a busca por novos alvos vacinais para que haja uma eficiência na produção de resposta imune dos animais. Contudo, não se descarta que a infecção possa ter alterado a imunogenicidade das vacinas.

A soroneutralização em camundongos é um teste que visa titular e verificar se a vacina testada foi capaz de produzir anticorpos e neutralizar a toxina em questão, sendo o teste padrão para a avaliação da potência das vacinas contra clostridioses (LOBATO et al., 2008). As amostras de soro dos coelhos que soroconverteram foram

encaminhadas para um laboratório externo para a realização do teste. O teste deve ser realizado para cada toxina, utilizando camundongos da linhagem swiss com peso entre 16-20 gramas. De modo geral, utiliza-se a toxina padrão misturada ao soro produzido nos coelhos, deixa-se incubando por 1 hora e após é injetado 0,2 mL via intravenosa nos camundongos. Os animais devem ser observados por 72 horas para que seja calculada a concentração inibitória média, e o resultado é expresso em unidade internacional por mL (UI/mL) (MOREIRA et al., 2016). Cada toxina precisa gerar um número mínimo de UI/mL para que seja considerada satisfatória e ateste a sua eficácia (Tabela 6). Em relação aos resultados da soroneutralização, não foi possível ter acesso, pois as amostras foram encaminhadas para um laboratório externo para realização e até momento de confecção deste relatório não há resultados.

Tabela 6 – Valores de referência em UI/mL para cada antígeno.

Vacina	UI/mL mínimo	Referência
TscL	1 UI/mL	MAPA (1997)
TaCs-C2	2,5 UI/mL	MAPA (1997)
TcNa	3,5 UI/mL	MAPA (1997)
ETX Mut	2 UI/mL	MAPA (1997)
TeT 50	2,5 UI/mL	MAPA (1997)

Fonte: a autora (2022).

O teste de potência, utilizado para atestar a eficácia de vacinas, é o método indicado pelo MAPA para vacinas contra clostridioses. Para sua realização, várias etapas foram desenvolvidas, como a utilização de animais de experimento e realização de teste imunoenzimático. A avaliação da resposta imune humoral demonstrou que algumas amostras não converteram de forma desejada. A infecção que os animais adquiriram pode ter influenciado no resultado da vacinação, visto que foram utilizados medicamentos que podem ter interferido na modulação da resposta imune humoral (SALEH et al., 2016; SHAHEED et al., 2022). Ainda, tem-se a hipótese de que a região de eleição para produção da vacina não foi eficiente. Dessa forma, deve-se rever as regiões dos epítomos dominantes e redesenhar as proteínas recombinantes com novas regiões para o antígeno.

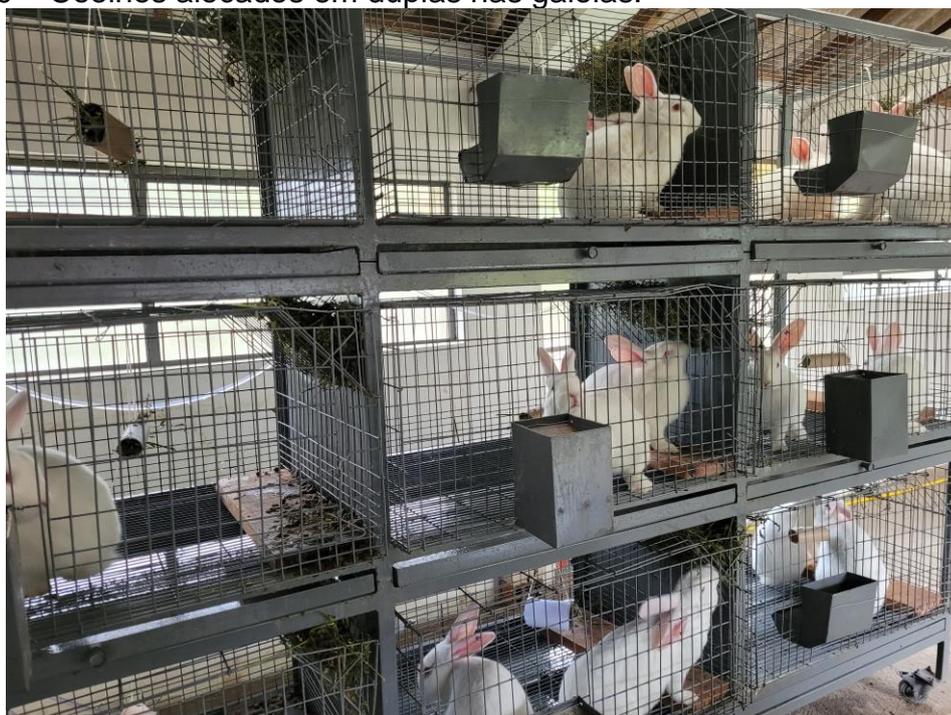
3.2. Manejo dos animais de experimentação: Bem-estar animal, infecção respiratória e infestação por ácaro

3.2.1 Bem-estar animal no manejo de coelhos

Para realização dos testes de potência das vacinas, os coelhos foram recebidos e alocados em duplas por gaiolas, totalizando 45 animais (Figura 30). Antes do início do experimento, um animal veio a óbito, em circunstâncias não definidas. A morte desse animal não influenciou no experimento, dessa forma, o total de animais foi reduzido a 44.

Os coelhos foram pesados e distribuídos de acordo com o peso e classificados por sexo. Os animais receberam água *ad libitum* e ração específica para coelhos duas vezes ao dia, na quantidade de 70 gramas por animal, além de suplementação com couve ou feno uma vez por semana.

Figura 30 – Coelhos alocados em duplas nas gaiolas.



Fonte: a autora (2022).

O enriquecimento ambiental é uma ferramenta muito importante para o bem-estar animal, principalmente para os animais de experimentação. Os coelhos possuem o hábito de interação social entre os indivíduos e demonstram um comportamento exploratório do ambiente em que vivem (MASTELLONE et al., 2019). A estrutura dentária é idealizada para a mastigação e desgaste dos dentes, por isso

é necessário que os animais possuam uma forragem áspera disponível ou algum objeto que possam mastigar para realizar o desgaste dos dentes, como brinquedos de borracha, madeira ou papelão. Deixar o objeto pendurado na gaiola estimula o animal a se erguer para alcançá-lo, tornando-se um exercício para ele (CROWELL-DAVIS, 2021).

Assim, optou-se por realizar o enriquecimento ambiental dos animais durante o período do experimento. Foram utilizados rolos de papelão com o interior vazio e pendurados nas gaiolas com auxílio de barbante, nos quais adicionou-se feno ou couve no seu interior para estimular a curiosidade e o comportamento exploratório dos animais (Figura 31).

Figura 31 – Rolo de papelão utilizado como objeto de enriquecimento ambiental para os coelhos.



Fonte: a autora (2022).

3.2.2 Infecção respiratória

Durante o experimento, os animais foram acometidos por uma infecção respiratória. Primeiramente, foi observado que os coelhos apresentavam sinais de secreção nasal purulenta (Figura 32), dificuldade respiratória, tosse, espirros, febre, otite e quatro animais vieram a óbito, apresentando cianose e anorexia.

Figura 32 – Secreção nasal purulenta em coelho.



Fonte: a autora (2022).

Os animais estavam confinados em duplas nas gaiolas e possuíam contato entre si com as gaiolas próximas, além disso o comedouro e bebedouro eram únicos para cada gaiola. Após observação dos sinais clínicos, foi coletado *swab* nasal e ocular de dois animais e encaminhado para o Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFPel. Dos 44 animais, quatro morreram e foram encaminhados para o Laboratório de Patologia Veterinária da UFPel para realização de necropsia. Após o exame, os órgãos foram encaminhados para o Laboratório de Bacteriologia, pois devido aos sinais clínicos, epidemiologia e sinais macroscópicos da necropsia, a suspeita era de pasteurelose.

Como resultado dos testes, na bacteriologia houve crescimento de colônias bacterianas mucoides na amostra de tecido pulmonar, no teste de Gram foram visualizados cocos Gram negativos, na prova de catalase foi positiva e na de oxidase negativa. Na realização das provas bioquímicas, não foi possível confirmar a espécie, pois na prova de aminoácidos lisina e arginina as amostras foram positivas, sendo a *P. multocida* caracterizada como negativa. As outras provas bioquímicas foram coerentes com a espécie *P. multocida*. Dessa forma, o diagnóstico foi de infecção bacteriana por *Pasteurella* sp. Nos outros órgãos não houve crescimento e nos *swabs* nasais e oculares houve contaminação por fungos ambientais.

O diagnóstico da pasteurelose é baseado nos sinais clínicos, indicando possível desordem respiratória, além de exames de imagem e realização de cultura

microbiana (JEKL, 2021). Além disso, as alterações patológicas macroscópicas podem indicar a infecção pela bactéria. O animal pode apresentar hemorragias petequiais difusas, fluido sanguinolento na cavidade pleural e saco pericárdico, ainda apresentar linfonodos aumentados e presença de hemorragia (QUINN et al., 2007).

Dessa forma, foi iniciado tratamento dos animais com o uso de oxitetraciclina 60 mg/Kg a cada 3 dias IM (Teldrin®), enquanto era realizado o antibiograma das amostras provenientes dos coelhos. Houve resistência ao antibiótico que estava sendo utilizado e sensibilidade para enrofloxacino, sendo eleito para o tratamento. Assim, foi administrado enrofloxacino 7 mg/Kg, BID, SC (Selvitrex®) durante sete dias e anti-inflamatório meloxicam 0,2 mg/Kg, SID, SC (Maxicam®) durante três dias.

Para o tratamento da infecção por *Pasteurella* spp. em coelhos é indicada a terapia de suporte com uso de medicações anti-inflamatórias, realização da desobstrução das vias aéreas, além de utilização de antibióticos. A prevenção da infecção por *Pasteurella* spp se dá através da limpeza das instalações e isolamento dos animais infectados (JEKL, 2021). Nesse caso, o isolamento dos animais não foi realizado, pois todos apresentavam sinais de infecção respiratória, sendo apenas realizada a limpeza do local e ajuste de janelas para não entrar vento e umidade.

A transmissão da bactéria *Pasteurella* spp. ocorre por contato direto ou aerossóis (QUINN, et al., 2007). Devido à disposição dos animais em gaiolas próximas e em duplas, além de dividirem o mesmo bebedouro, pode ter influenciado na disseminação da doença. Ainda, os animais passaram por um longo transporte até chegarem no local e, também, precisaram se ambientar a um local novo. De acordo com Yang et al. (2022), esses são fatores que ocasionam o desenvolvimento da doença e disseminam a infecção no plantel.

É comum os coelhos serem acometidos por infecções respiratórias e uma das causas mais comuns é pela bactéria *Pasteurella multocida*, que leva à secreção nasal mucopurulenta, espirros, dispneia, otite, conjuntivite e pneumonia, que pode ser fibrinopurulenta ou fibrinohemorrágica. A bactéria dissemina-se no organismo do coelho pelas vias aerógenas e através da circulação sanguínea, podendo levar à otite por meio da trompa de Eustáquio (JEKL, 2021). Alguns animais são portadores crônicos do micro-organismo e não manifestam sinais clínicos. Contudo, momentos de estresse, mudança de ambiente e rotina, transporte e superlotação podem levar ao desenvolvimento da doença (YANG et al., 2022). Os coelhos são respiradores nasais obrigatórios e como a infecção respiratória gera secreção purulenta e edema,

nos casos mais graves, a cavidade nasal fica obstruída e o animal entra em cianose e respira pela boca, impedindo a ingestão de água e alimento, levando o animal a óbito se não houver suporte de urgência (JEKL, 2021; ZHU et al., 2020), o que pode ter ocorrido neste estudo.

De acordo com Jekl (2021), o mercado Europeu possui uma vacina para os sorotipos A e D de *Pasteurella multocida*, mais comuns em coelhos. A vacina é indicada para animais a partir de quatro semanas de idade e reforço na sétima e décima semana de idade, vacinando-se o animal a cada seis meses. Ainda, há um protocolo para coelhos mais velhos, em que se realiza a vacinação e depois o reforço em três semanas, com posterior revacinação semestral.

Após a realização do tratamento com a utilização de antibiótico e anti-inflamatório os animais apresentaram uma melhora significativa dos sinais respiratórios, com a diminuição da secreção nasal purulenta e espirros. Dessa forma, demonstra-se a importância de unir a clínica, com a epidemiologia e o correto diagnóstico para o melhor resultado para os animais.

3.2.3 Infestação por ácaro *Leporacarus gibbus*

Os coelhos do experimento também apresentaram uma infestação por ácaro *Leporacarus gibbus* (Figura 33).

Figura 33 – Ácaro *Leporacarus gibbus* em microscópio.



Fonte: a autora (2022).

Esse é um ectoparasito comum dos coelhos e, muitas vezes, não desenvolve sinais clínicos nos animais. Contudo, em casos de imunossupressão ou outras doenças associadas, os animais podem manifestar prurido, alopecia e dermatite. O ácaro fica localizado no pelo do animal e se alimenta de debris e secreções sebáceas (DEAK; TURCU, 2020). Os coelhos do experimento apresentavam o ácaro localizado em seu pelo, como pequenos pontos pretos espalhados por toda extensão do dorso. Alguns animais apresentaram alopecia (Figura 34) e todos os animais apresentaram o ácaro. Foi realizada a coleta do parasito e feita a raspagem da pele com a utilização de bisturi e fita adesiva e, posteriormente, encaminhou-se as amostras para o Grupo de Estudos em Doenças Parasitárias da UFPel.

Figura 34 – Alopecia na região do dorso em coelho.



Fonte: a autora (2022).

A partir das amostras enviadas, foi confirmada a presença do ácaro *Leporacarus gibbus* e a equipe que realizou o diagnóstico identificou ser o primeiro relato de caso de infestação pelo ácaro no sul do Rio Grande do Sul. A recomendação de tratamento foi a utilização de ivermectina, porém os animais já estavam próximos do final do experimento e já haviam apresentado melhora dos sinais clínicos, então optou-se por não realizar o tratamento.

O ácaro possui potencial zoonótico e pode acometer os humanos que entrarem em contato com o coelho (DUMITRACHE et al., 2021). Há relatos de casos de donos de coelhos que estavam infestados pelo ácaro apresentarem sinais de dermatite, contudo não houve isolamento do ácaro no humano. Porém, os coelhos que possuíam contato direto com a pessoa apresentaram o ácaro (d'OVIDIO; SANTORO, 2013). Dumitrache et al. (2021) relataram o primeiro caso do ácaro em um gato de 14 meses.

O animal não tinha contato com outros animais e apresentou sinais de prurido e dermatite, o único ectoparasito encontrado foi o *L. gibbus*. Assim, demonstra-se que o ácaro pode infestar outras espécies além dos coelhos.

3.2.4 Conclusão

A partir do relato de caso referente aos coelhos do experimento, demonstrou-se a importância do conhecimento das doenças infecciosas para um bom e adequado manejo dos animais. Embora o ECSMV não tenha sido realizado na área de parasitologia e clínica veterinária, o conhecimento advindo dos casos ocorridos nos animais proporcionou um desenvolvimento de senso crítico para importância de outras áreas da veterinária, bem como para o bom desenvolvimento de um experimento com utilização de animais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O relatório de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária descreveu as atividades realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada e discutiu sobre o teste de potência para vacinas recombinantes contra clostridioses e o manejo com os animais do experimento.

A realização do ECSMV proporcionou a vivência da rotina de laboratório e a possibilidade de conhecer novas áreas da medicina veterinária. Ainda, foi possível unir o conhecimento teórico sobre biologia molecular adquirido durante a graduação na realização das atividades práticas. O acompanhamento das técnicas proporcionou experienciar ramos da medicina veterinária que estão em crescimento para a produção de imunobiológicos, medicamentos, e outros tipos de tratamento para doenças.

O experimento que foi acompanhado oportunizou a experiência com a experimentação animal e com a produção de vacinas recombinantes. Dessa forma, foi possível colocar em prática os conhecimentos de rotina laboratorial e bem estar animal. Além disso, foi possível desenvolver senso crítico e o trabalho em equipe.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. L. F. et al. *Clostridium septicum*: a review in the light of alpha-toxin and development of vaccines. **Vaccine**, v. 39, n. 35, p. 4949-4956, 2021.
- AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4-15, 2015.
- BAESHEN, M. N. et al. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 953-962, 2015.
- BRUNELLE, J. L.; GREEN, R. One-dimensional SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *In*: LORSCH, J. **Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C**. Oxford: Elsevier 2014. Cap. 12, p. 151-159.
- CAMPOS, A. S. et al. Introdução geral. *In*: DIAZ, B. L. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. 1. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, 2019.
- CROWELL-DAVIS, S. Rabbit behavior. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 53-62, 2021.
- DEAK, G.; TURCU, C. A case of infestation with *Leporacarus gibbus* in pet rabbit. **Scientia Parasitologica**, v. 21, n. 3, p. 138-141, 2020.
- d'OVIDIO, D.; SANTORO, D. *Leporacarus gibbus* infestation in client-owned rabbits and their owner. **Veterinary Dermatology**, v. 25, p. 46-47, 2013.
- DUMITRACHE, M. O. et al. First case report of dermatitis associated with *Leporacarus gibbus* in cat. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 4, p. 1-5, 2021.
- FERDOUS, S. et al. Optimization of *E. coli* tip-sonication for high-yield cell-free extract using finite element modeling. **American Institute of Chemical Engineers**, v. 67, n. 10, p. 1-12, 2021.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: production strategies and applications as veterinary vaccines. **Toxins**, v. 8, n. 11, p. 1-24, 2016.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Immunogenicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin recombinant bacterin in rabbit and ruminants. **Vaccine**, v. 36, n. 50, p. 7589-7592, 2018.
- FERREIRA, M. R. A. et al. Inactivated recombinant *Escherichia coli* as candidate vaccine against *Clostridium perfringens* alpha toxin in sheep. **Anaerobe**, v. 59, p. 163-166, 2019.

FRANCIS, M. D.; PAGE, R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. **Current Protocols in Protein Science**, v. 5, n. 24, p. 1-29, 2010.

GALVÃO, C. C. et al. Measurement over 1 year of neutralizing antibodies in cattle immunized with trivalent vaccines recombinants Alpha, Beta and Epsilon of *Clostridium perfringens*. **Toxins**, v. 13, p. 1-11, 2021.

GASPAR, E. B. et al. Diagnóstico Veterinário por Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima: Revisão Atualizada. **Documentos EMBRAPA Pecuária Sul**, v. 145, p. 1-28, 2015.

HE, P. et al. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 477-488, 2015.

IBGE. Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas). Rio de Janeiro, 2021. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>>. Acesso em: 19 nov. 2022.

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, 2021. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso em: 19 nov. 2022.

JEKL, V. Respiratory disorders in rabbits. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 24, n. 2, p. 459-482, 2021.

JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biology**, v. 6, n. 8, p. 1-17, 2016.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Western Blotting. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 283-293, 2006.

LIMA, C. G. R. D. et al. Padronização de teste de potência *in vitro* para vacinas que contenham toxoide alfa de *Clostridium novyi* tipo B. **Repositório da Produção Científica Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 507-512, 2011.

LIU, F. J. et al. Evaluation of a recombinant tetanus toxin subunit vaccine. **Toxicon**, v. 187, p. 75-81, 2020.

LOBATO, F. C. F. et al. Avaliação da potência de vacinas contra *Clostridium septicum* comercializadas no Brasil. **Repositório da Produção Científica Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 225-228, 2008.

LOBATO, F. C. F. et al. Clostridioses dos animais de produção. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 29-48, 2013.

MARANA, S. R. et al. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. **Acta Crystallization Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, n. 8, p. 750-752, 2006.

MASTELLONE, V. et al. Mirrors improve rabbit natural behavior in a free-range breeding system. **Animals**, v. 9, n. 8, p. 1-10, 2019.

MIGUEL, M. P. et al. Western blotting: A técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em Medicina Veterinária. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 15, p. 1704-1719, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Secretária da Defesa Agropecuária**. Portaria nº 49, de 12 de maio de 1997. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/portaria/portaria-sda-mapa-no-49-de-12-05-1997.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Secretária da Defesa Agropecuária**. Instrução Normativa nº 23, de 18 de março de 2022. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/instrucoes-normativas/instrucao-normativa-sda-mapa-no-23-de-18-03-2002.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

MOREIRA, G. M. S. G. et al. Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against *Clostridium perfringens* Alpha, Beta, and Epsilon toxins in farm ruminants. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22816, p. 1-9, 2016.

MURPHY, K. et al. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de biologia molecular. *In*: ZAHA, A. et al. **Biologia Molecular Básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed 2014. cap. 16, p. 331-362.

PRZEDPELSKI, A. et al. A novel high-Potency tetanus vaccine. **American Society for Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 1-12, 2020.

QUINN, P.J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ROSANO, G. L. et al. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: a 5-year update. **The Protein Society**, v. 28, n. 8, p. 1412-1422, 2019.

SALEH, E. et al. Effect of antipyretic analgesics on immune responses to vaccination. **Human vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 9, p. 2391-2402, 2016.

SHAHEED, C. A. et al. Immunomodulatory effects of pharmaceutical opioids and antipyretic analgesics: mechanism and relevance to infection. **British Pharmacological Society**, v. 88, n. 7, p. 3114-3131, 2022.

SHI, S. et al. Vaccine adjuvants: understanding the structure and mechanism of adjuvant activity. **Vaccine**, v. 37, n. 24, p. 3167-3178, 2019.

SWIFT, H. F. The action of sodium salicylate upon the formation of immune bodies. **Journal of Experimental Medicine**, v. 36, n. 6, p. 735-760, 1922.

THACHIL, A. J. et al. Vaccination of turkeys with *Clostridium septicum* bacterin-toxoid: evaluation of protection against clostridial dermatitis. **Bio One**, v. 57, n. 2, p. 214-219, 2013.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 10 ed. Rio de Janeiro: GEN Grupo Editorial Nacional pelo selo Guanabara Koogan, 2019.

TORGEMAN, A. et al. An *in vitro* cell-based potency assay for pharmaceutical type A botulinum antitoxins. **Vaccine**, v.35, n. 52, p. 7213-7216, 2017.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOWBIN, H. et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Center for Veterinary Biologics**. Supplemental assay method for potency testing *Clostridium perfringens* type D Epsilon antigens. Disponível em <https://www.aphis.usda.gov/animal_health/vet_biologics/publications/203.pdf>. Acesso em 28 dez. 2022.

YANG, W. et al. Pathogenicity, colonization, and innate immune response to *Pasteurella multocida* in rabbits. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 416, p. 1-10, 2022.

ZANELLA, J. R. C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para a saúde e produção animal. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 51, n. 5, p. 510-519, 2016.

ZHU, W. et al. Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits in China. **Veterinary Microbiology**, v. 244, p. 1-5, 2020.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de conclusão do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que a acadêmica **Raíssa Gasparetto**, realizou Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no **Laboratório de Imunologia Aplicada, CD Tec, UFPE** sob supervisão do Professor Dr. Fabricio Rochedo Conceição no período de 08 de setembro de 2022 a 23 de dezembro de 2022, perfazendo 450 horas.



Fabricio Rochedo Conceição