

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

VINÍCIUS DOS SANTOS ROMAGNOLI

**DESENVOLVIMENTO DE UM CANDIDATO VACINAL CONTRA *Brachyspira* spp.
E USO DE FILTROS MOLECULARES COMO ESTRATÉGIAS PARA O
CONTROLE DE DOENÇAS EM SUÍNOS**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

VINÍCIUS DOS SANTOS ROMAGNOLI

**DESENVOLVIMENTO DE UM CANDIDATO VACINAL CONTRA *Brachyspira spp.*
E USO DE FILTROS MOLECULARES COMO ESTRATÉGIAS PARA O
CONTROLE DE DOENÇAS EM SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R756d
2023

Romagnoli, Vinícius dos Santos, 1999-
Desenvolvimento de um candidato vacinal contra
Brachyspira spp. e uso de filtros moleculares como estratégias
para o controle de doenças em suínos / Vinícius dos Santos
Romagnoli. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (68 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Referências bibliográficas: f. 59-65.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.647>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Antígenos. 2. Vacinas. 3. Suíno - Doenças. 4. Bactérias
patogênicas. 5. Água - Purificação. I. Mendes, Tiago Antônio de
Oliveira, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 571.9645

VINÍCIUS DOS SANTOS ROMAGNOLI

**DESENVOLVIMENTO DE UM CANDIDATO VACINAL CONTRA *Brachyspira* spp.
E USO DE FILTROS MOLECULARES COMO ESTRATÉGIAS PARA O
CONTROLE DE DOENÇAS EM SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2023.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente

VINICIUS DOS SANTOS ROMAGNOLI

Data: 19/10/2023 09:42:54-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Vinícius dos Santos Romagnoli
Autor



Documento assinado digitalmente

TIAGO ANTONIO DE OLIVEIRA MENDES

Data: 17/10/2023 16:03:24-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Tiago Antônio de Oliveira Mendes
Orientador

*A todos que utilizarem deste trabalho para o
progresso.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, orixás e meus guias. Nunca estive sozinho ou desamparado durante todo o processo.

Aos meus pais, Reinaldo e Ismelinda, por serem exemplares e me mostrarem o caminho a ser seguido. Se hoje vejo mais longe, é porque estou sobre os ombros de gigantes.

À minha irmã, Sophia, por me fazer lembrar todos os dias das responsabilidades assumidas como irmão mais velho.

À Luiza Possa, pela companhia no laboratório e na vida. Sem você, esse trabalho não seria possível.

A Renato Senra, pela amizade e por me ensinar tudo o que sei sobre as teorias e práticas aplicadas durante o meu mestrado.

Ao professor Dr. Tiago Mendes, pela oportunidade de trabalho e confiança depositada em mim, mesmo quando ainda não me conhecia. Isso foi fundamental para minha formação como cientista.

A todos os colegas de LBM, que direta e indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho.

Meu sentimento de gratidão é maior que qualquer combinação de palavras possível nesta página. Meu sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.; apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

***“Newton sonhava, Darwin sonhava, você sonha”.
(Edward O. Wilson)***

RESUMO

ROMAGNOLI, Vinícius dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Desenvolvimento de um candidato vacinal contra *Brachyspira spp.* e uso de filtros moleculares como estratégias para o controle de doenças em suínos.** Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Doenças de origem infecciosa são um grande problema na criação de suínos no mundo, sendo causa de prejuízos econômicos, devido à mortalidade e morbidade causadas nos animais. Dentre essas doenças, destaca-se a disenteria suína, causada pela infecção por *Brachyspira spp.*, patógeno para o qual não existe vacina comercial e cujo tratamento é feito por antibioticoterapia. O uso inadequado desse tipo de tratamento aumenta os riscos de seleção de cepas bacterianas resistentes a antibióticos e, quando os dejetos da produção são descartados no ambiente, essas cepas podem contaminar o ecossistema. Diante disso, uma formulação vacinal contra *Brachyspira spp.* e uma tecnologia de desinfecção de água de baixo custo e de alta eficiência se fazem necessárias. Um antígeno vacinal (rBrac) foi construído a partir da seleção de epítopos de células T CD8⁺ e T CD4⁺ identificados por imunoinformática e clonado em vetor de expressão em bactérias. Posteriormente, o gene foi expresso, purificado e encapsulado em nanocápsulas de polímero poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), com o objetivo de aumentar a estabilidade para administração oral e a resposta imunológica induzida pelo antígeno quimérico construído. Além disso, uma membrana de celulose também foi modificada por hidroxilação e aminação com o objetivo de aumentar a interação com a superfície de células bacterianas e realizar a desinfecção das águas residuárias de granjas suínas. A eficiência da modificação química foi validada por abordagens físico-químicas e teste microbiológicos de crescimento de cultura em placas de Petri foram realizados para verificar a eficiência de remoção de bactérias por adsorção incluída em um filtro com sistema de desinfecção por luz ultravioleta.

Palavras-chave: Antígeno vacinal. *Brachyspira spp.* PLGA. Desinfecção.

ABSTRACT

ROMAGNOLI, Vinícius dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Development of a vaccine candidate against *Brachyspira* spp. and use of molecular filters as strategies for disease control in pigs.** Adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Diseases of infectious origin are a major problem in pig farming in the world, causing economic losses due to mortality and morbidity caused in animals. Among these diseases, swine dysentery stands out, caused by infection by *Brachyspira* spp, a pathogen for which there is no commercial vaccine and whose treatment is done by antibiotic therapy. Inappropriate use of this type of treatment increases the risks of selection of antibiotic-resistant bacterial strains, and when healthy production waste is discarded into the environment, these strains can contaminate the ecosystem. Therefore, a vaccine formulation against *Brachyspira* spp and a low-cost and high-efficiency water disinfection technology are necessary. A vaccine antigen (rBrac) was constructed from the selection of CD8⁺ and CD4⁺ T cell epitopes identified by immunoinformatics and cloned into an expression vector in bacteria. Subsequently, the gene was expressed, purified and encapsulated in poly(lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) polymer nanocapsules, with the aim of increasing stability for oral administration and the immune response induced by the chimeric antigen constructed. In addition, a cellulose membrane was also modified by hydroxylation and amination in order to increase the interaction with the surface of bacterial cells and perform the disinfection of wastewater from pig farms. The efficiency of the chemical modification was validated by physicochemical approaches and microbiological test of culture growth in petri dishes were performed to verify the efficiency of removal of bacteria by adsorption included in a filter with ultraviolet light disinfection system.

Keywords: Vaccine antigen. *Brachyspira* spp. PLGA. Disinfection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Análise histológica de tecido intestinal com pontos de necrose tecidual por consequência de infecção por <i>B. hampsonii</i>	15
Figura 2.	Rede de fatores relacionados à resistência microbiana a antibióticos.....	18
Figura 3.	Monômeros e estrutura do PLGA.....	22
Figura 4.	Representação gráfica dos epítomos selecionados da proteína BmpB..	38
Figura 5.	Representação gráfica dos epítomos selecionados da proteína VspD...	39
Figura 6.	Representação gráfica dos epítomos selecionados da proteína SmpB..	40
Figura 7.	Sequência de nucleotídeos do gene sintético desenhado.....	41
Figura 8.	Confirmação da amplificação do gene sintético rBrac em eletroforese em gel de agarose.....	42
Figura 9.	Placa de Petri com colônias após transformação com gene sintético ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	43
Figura 10.	Confirmação da clonagem por PCR.....	43
Figura 11.	Confirmação da clonagem em pGEM® T-Easy e em pET-28a por digestão, utilizando as enzimas de restrição NheI e XhoI.....	43
Figura 12.	Fração solúvel e insolúvel da expressão do antígeno quimérico.....	44
Figura 13.	A) Análise da purificação da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida. B) Confirmação da proteína de interesse por Western Blotting.....	44
Figura 14.	Cromatograma de purificação do antígeno recombinante.....	45
Figura 15.	(A) Realização do swab retal dos animais. (B) Baías individuais das matrizes.	46
Figura 16.	Rastreamento de animais infectados por <i>Brachyspira spp.</i> , na Unidade de Pesquisa em Melhoramento de Suínos, UFV.....	47
Figura 17.	Análise de tamanho das nanopartículas de PLGA com antígeno quimérico pela intensidade.....	48
Figura 18.	Análise de tamanho das nanopartículas de PLGA com antígeno quimérico pelo volume.....	48
Figura 19.	Análise de composição da membrana por FTIR.....	49
Figura 20.	Análise qualitativa da eficiência da membrana modificada.....	50
Figura 21.	Identificação de patógenos na cultura isolada de suínos.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Antibióticos utilizados para tratamento e prevenção da disenteria	17
	suíña.....	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Célsius
ATR	Técnica De Reflexão Atenuada
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cm	Centímetros
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FTIR	Espectroscopia De Infravermelho Com Transformada De Fourier
g	Gramas
h	Hora
HLA-DP	Antígeno Leucocitário Humano - DP
HLA-DQ	Antígeno Leucocitário Humano – DQ
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano - DR
IPTG	Isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	Kilobases
L	Litros
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
Mg	Miligramas
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PIB	Produto Interno Bruto
pb	Pares De Bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLGA	Poli (Ácido D,L-Láctico-Co-Glicólico)
PVA	Álcool Polivinílico
rpm	Rotação por minuto
Ser/Gly	Serina/Glycina
SLA	Antígeno Leucocitário Suíno
U/μL	Unidades por microlitro
UVC	Ultravioleta -C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
3. JUSTIFICATIVA	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo Geral	25
4.2 Objetivos Específicos	25
5. METODOLOGIA	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	52
8. PERSPECTIVAS	53
9. REFERÊNCIAS	59
10. ANEXO I	66
11. ANEXO II	67

1. INTRODUÇÃO

A criação de suínos movimentava bilhões de dólares na economia mundial todos os anos, sendo um componente-chave no PIB de potências econômicas, como União Europeia, China e Brasil (FAO, 2017). Com escalas de produção tão grandes, é imprescindível que haja equilíbrio entre o bem-estar animal e produção ótima dentro da capacidade disponível. Nesse sentido, as doenças infecciosas são um dos principais fatores que interferem na criação dos animais e, por consequência, são causas de prejuízo econômico na cadeia de produção de carne suína no Brasil e no mundo (VANDERWAAL; DEEN, 2018).

As doenças infecciosas mais comuns em suínos estão relacionadas a vírus e bactérias, causando doenças respiratórias e gastrointestinais (DESROSIERS, 2011). Dentro da categoria de doenças gastrointestinais, destaca-se a infecção por *Brachyspira* spp, patógeno causador da disenteria suína, doença contagiosa, transmitida via fecal-oral por animais contaminados ou por contato com fezes de vetores da bactéria, como roedores, baratas e aves silvestres (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2013; BURROUGH, 2017).

Atualmente, a forma de controle para essa infecção é baseada em utilização de antibióticos (STUBBERFIELD et al., 2021). O uso frequente e inadequado da antibioticoterapia pode gerar, a médio e longo prazo, seleção de cepas bacterianas resistentes, que é um grande desafio para o manejo da saúde animal e para o equilíbrio ambiental (AARESTRUP; WEGENER; COLLIGNON, 2008).

Em relação ao manejo animal, a resistência bacteriana diminui a eficiência dos antibióticos utilizados no tratamento das infecções, aumentando a transmissão do patógeno, a morbidade e a mortalidade dos animais, gerando mais prejuízos aos produtores, além de poder ser disseminada para seres humanos por meio da cadeia alimentar (SULTAN et al., 2018). Ao mesmo tempo, a produção de suínos em larga escala gera alta quantidade de dejetos descartados na natureza. Esse fator, aliado ao problema da resistência bacteriana a antibióticos, pode gerar um desequilíbrio profundo no ecossistema,

aumentando o número de cepas resistentes aos tratamentos disponíveis atualmente, podendo gerar inclusive problemas de saúde pública (LARSSON; FLACH, 2022).

Para reduzir a utilização de antibióticos, formas de controle de infecção a partir da imunização dos animais são importantes. Nesse sentido, a utilização de vacinas de proteínas recombinantes para indução de memória imunológica é promissora, devido à sua segurança e efetividade contra patógenos específicos (FAVARO et al., 2022). Concomitante a isso, deve-se ter como objetivo a diminuição de descarte de rejeitos orgânicos contaminados advindos da produção no meio ambiente. Para esse tipo de controle, tecnologias de desinfecção por adsorção são emergentes no tratamento desses descartes, podendo atuar também prevenindo o surgimento de bactérias resistentes (KIM et al., 2022; WANG et al., 2017).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecção por *Brachyspira* spp.

As doenças infecciosas são responsáveis por grande parte dos prejuízos na cadeia de produção de suínos para alimentação e reprodução (FAO, 2017). Essas doenças geralmente acometem o trato respiratório e trato gastrointestinal dos suínos, apresentando uma expressiva variedade de patógenos (DESROSIERS, 2011). Dentre os causadores de doenças entéricas, destaca-se a *Brachyspira* spp., causadora da disenteria suína (BURROUGH, 2017; LA et al., 2016).

Brachyspira é um gênero de bactérias gram-negativas anaeróbicas obrigatórias, em formato de espiroqueta, pertencentes ao filo Spirochaetota, classe Spirochaetia, ordem Brachyspirales, família Brachyspiraceae que infectam as células intestinais de suínos, aves e humanos (HOVIND-HOUGEN et al., 1982). Algumas espécies desse gênero de bactérias são as principais causadoras da disenteria suína, uma doença intestinal muco hemorrágica que causa impactos na produção. Os sintomas dessa doença interferem no ganho de peso dos animais e no índice de conversão alimentar, resultando em um desempenho abaixo da capacidade real de produção (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2013).

As principais espécies relacionadas à disenteria suína são *B. hyodysenteriae* e *B. hampsonii*, sendo prevalentes em vários países do mundo, de diferentes continentes, incluindo Austrália, Itália, Alemanha e Brasil (JOERLING et al., 2018; LA et al., 2019; RUGNA et al., 2015; SATO et al., 2022). É considerada uma infecção frequente, pela detecção em diversos locais e em grande número de animais, sintomáticos ou assintomáticos, a partir de exames de detecção de rotina (JOERLING et al., 2018).

A infecção de suínos por *Brachyspira* spp. ocorre por via oral-fecal, a partir do contato de animais saudáveis com fezes de animais infectados que compartilham a mesma área de permanência (PARRA-AGUIRRE et al., 2022). A epidemiologia do patógeno é agravada, elevando o potencial de disseminação devido ao comportamento coprofágico que os suínos podem apresentar, especialmente animais mais jovens (SOAVE; BRAND, 1991). A partir desse contato contínuo com as fezes, a transmissão do patógeno aumenta para um número maior de animais e,

consequentemente, contribuindo para a transmissão e disseminação do patógeno, gerando um círculo contínuo de infecção. O patógeno, mesmo sendo anaeróbico obrigatório, consegue permanecer em contato com a atmosfera por um período variável entre um dia e uma semana a 25°C, quando em contato com fezes suínas, o que agrava o problema da alta taxa de contágio (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2013).

Após entrar em contato com o suíno hospedeiro, o patógeno utiliza de mecanismos celulares e moleculares para efetuar a infecção. Os principais fatores de virulência relacionados à *Brachyspira* spp. são proteases, lipopolissacarídeos e hemolisina, expressos pela bactéria (JOERLING et al., 2020; QUINTANA-HAYASHI et al., 2023). Assim que entra em contato com a luz intestinal, mais especificamente no íleo, cólon e ceco, o patógeno expressa as moléculas de virulência e invade os enterócitos, desencadeando uma cascata de sinalização pró-inflamatória e causando perturbação na homeostase do tecido local, como o recrutamento de leucócitos, destruição da borda em escova intestinal e formação de pontos necróticos no tecido (Figura 1) (COSTA et al., 2017; QUINTANA-HAYASHI et al., 2023).

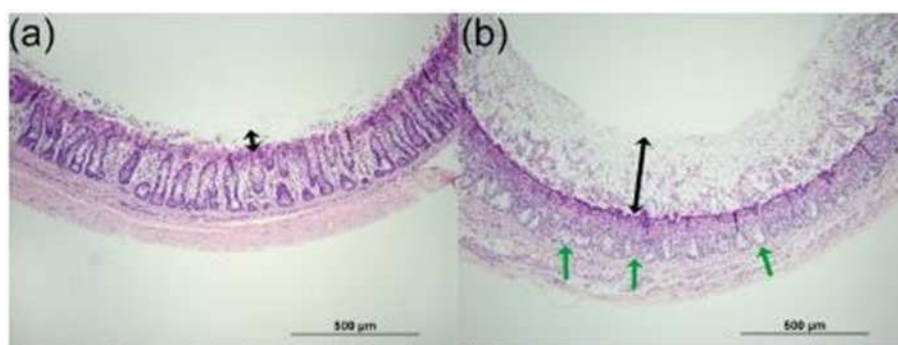


Figura 1. Análise histológica de tecido intestinal com pontos de necrose tecidual por consequência de infecção por *B. hamptonii*. A: tecido intestinal não infectado com *B. hamptonii*. B: tecido intestinal infectado com *B. hamptonii*. Setas pretas indicam espessura de muco na luz intestinal. Setas verdes indicam pontos de necrose tecidual. Fonte: Costa, 2017.

Um dos desafios relacionados à disenteria suína é a semelhança dos sintomas com outras infecções de trato gastrointestinal, o que dificulta o manejo e torna necessário realizar testes diagnósticos recorrentes para identificar animais infectados (BURROUGH, 2017). Além disso, não há vacinas comerciais para controle desse patógeno, dificultando o controle da doença quando não há diagnóstico adequado (HOLDEN; COLOE; SMOOKER, 2008; LEE et al., 2000).

2.2. Controle e tratamento

O controle adequado das doenças infecciosas é essencial para a manutenção da produção e do bem-estar animal. Esse controle depende de rastreios periódicos para detecção e manejo, ambiental e medicamentoso, de animais diagnosticados, a fim de evitar surtos da doença nos criadouros (HAMPSON; LA; PHILLIPS, 2015; LA; HAMPSON, 2001). Dentro do controle ambiental, é importante o controle de potenciais transmissores, como roedores e baratas, a partir de medidas de higiene, como limpeza periódica dos criadouros e dedetização. Além disso, é importante o isolamento de animais infectados em baias separadas, para diminuição da transmissão direta por via oral-fecal (DESROSIERS, 2011; ZEEH; VIDONDO; NATHUES, 2020).

Atualmente, o controle por tratamento medicamentoso é baseado em antibioticoterapia, com uso tanto para tratamento de animais infectados quanto com dosagens regulares como medida profilática contra a infecção (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2013). Na Tabela 1 estão descritos os antibióticos mais utilizados contra infecção por *Brachyspira* spp.

Tabela 1: Antibióticos utilizados para tratamento e prevenção da disenteria suína.
Fonte: Álvarez-Ordóñez et al., 2013.

Drug	Dosage in SD treatment ^a	Dosage in SD prevention	Point mutations associated to decreased susceptibility ^b	Wild type MIC cutoff values ^c	Clinical MIC breakpoint ^d
Tiamulin	Im: 10 mg/kg bw for 1–3 days Po: 8 mg/kg bw for 5–7 days in drinking water In feed medication: 100 ppm for 7–10 days	In feed medication: 30–40 ppm	23S rRNA gene position 2058 and 2032 L3 ribosomal protein gene 148	>0.25 µg/mL	>2 µg/mL
Valnemulin	In feed medication: 3–4 mg/kg bw for 1–4 weeks	In feed medication: 25 ppm	23S rRNA gene position 2058 and 2032 L3 ribosomal protein gene position 149	>0.125 µg/mL	>5 µg/mL
Tylosin	Im: 10 mg/kg bw for 3–5 days Po: 5–10 mg/kg bw in drinking water for 5–7 days	-	23S rRNA gene position 2058	>16 µg/mL	>32 µg/mL
Tylvalosin	In feed medication: 4.25 mg/kg bw for 10–14 days	In feed medication: 2.125 mg/kg-bw	23S rRNA gene position 2058 and 2059	>1 µg/mL	>32 µg/mL
Lincomycin	Po: 8 mg/kg bw in drinking water for 1 to 10 days In feed medication: 100 ppm until clinical signs disappear followed by 40 ppm	In feed medication: 44 ppm	23S rRNA gene position 2058, 2059 and 2032	>1 µg/mL	>36 µg/mL

A resistência a antibióticos é um problema biológico que se refere ao surgimento de cepas bacterianas resistentes ao tratamento com antibioticoterapia no âmbito da saúde animal e saúde humana (HUEMER et al., 2020; SULTAN et al., 2018). Esse problema é derivado de uma rede complexa de interações entre diversos fatores ambientais, de produção de alimentos e tratamento de doenças (Figura 2), interagindo uns com os outros em maior ou menor grau, dependendo da condição de cada local ou ambiente específico (DAVIES; DAVIES, 2010).

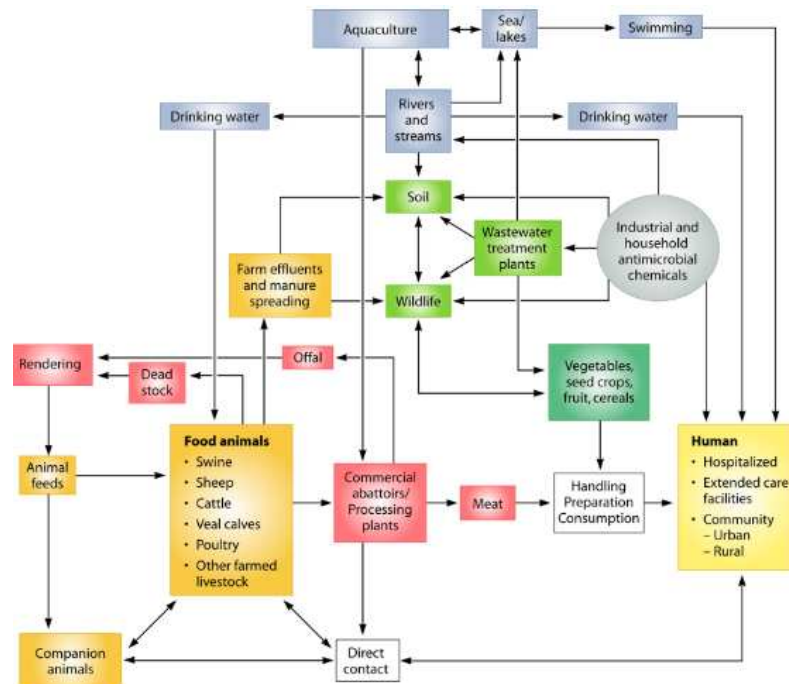


Figura 2. Rede de fatores relacionados à resistência microbiana a antibióticos.
Fonte: Davies e Davies, 2010.

Um importante fator para o desenvolvimento desse problema no campo da produção animal é a utilização indiscriminada e inadequada de antibióticos diversos contra doenças de origem infecciosa. Nesse sentido, a vacinação é uma forma eficaz de prevenir a ocorrência de doenças infecciosas em animais (YAN, Z. et al, 2023). As vacinas são formuladas para estimular a produção de anticorpos no organismo do animal, que ajudam a protegê-lo contra infecções. Existem diversas vacinas disponíveis para diferentes tipos de doenças infecciosas (WOODWORTH, J. S., 2021).

2.3. Tecnologia de produção de vacinas

Apesar de os diversos métodos de prevenção de doenças infecciosas baseados em manejo, como higiene constante de criadouros, combate a vetores, investimento em rastreio e diagnóstico e isolamento de animais infectados, ainda é necessário o controle das infecções por meio de estímulo a respostas imunológicas de memória, advindas da vacinação (DESROSIERS, 2011; VANDERWAAL; DEEN, 2018). Com o desenvolvimento da biotecnologia e da ciência na área da saúde humana e animal, junto do desenvolvimento de formas de manipulação de organismos vivos, diferentes

tipos de vacina foram criados, para diferentes formas de infecção (FRANCIS, 2018; RAUCH et al., 2018).

A tecnologia no desenvolvimento de vacinas tem evoluído rapidamente nos últimos anos, intimamente ligado ao avanço nas técnicas de manipulação de macromoléculas e organismos vivos. Dentre os tipos de vacinas desenvolvidas e frequentemente utilizada na saúde animal, destacam-se as vacinas atenuadas, inativadas e vacinas de subunidades (BRISSE et al., 2020; MINOR, 2015; RAUCH et al., 2018; VERCH; TRAUSCH; SHANK-RETZLAFF, 2018).

As vacinas atenuadas consistem em uma formulação vacinal contendo algum adjuvante adicionado do patógeno de interesse vivo, porém incapaz de causar a doença em questão no organismo a ser imunizado (MINOR, 2015). Alguns exemplos na medicina veterinária são as vacinas contra cinomose em cães e contra enteropatia proliferativa em suínos (JACOBS et al., 2019; NGUYEN et al., 2012). As vacinas inativadas, ao contrário, são formuladas com o patógeno destruído, utilizando assim sua composição química para utilização como antígeno vacinal, como nas vacinas contra febre aftosa e raiva (DIAZ-SAN SEGUNDO et al., 2017; KAUR et al., 2015).

As vacinas utilizando a estrutura celular do patógeno de interesse, como as atenuadas e inativadas, podem apresentar eficiência reduzida no estímulo à resposta imunológica de memória específica, devido à inoculação de uma quantidade grande e variada de epítomos e moléculas antigênicas. Além disso, esse tipo de vacina apresenta um maior potencial de gerar efeitos adversos no animal imunizado, como febre, lesão cutânea, apatia e dor, devido à presença do organismo patogênico na formulação (BRISSE et al., 2020; FRANCIS, 2018; MINOR, 2015; RAUCH et al., 2018; VERCH; TRAUSCH; SHANK-RETZLAFF, 2018). Nesse sentido, as vacinas de subunidades representam um avanço na tecnologia de desenvolvimento e produção de vacinas para uso veterinário.

As vacinas de subunidades são formulações produzidas com subunidades de macromoléculas presentes no patógeno, como proteínas, lipopolissacarídeos e DNA. A obtenção desses antígenos advém de técnicas de identificação, purificação a partir do organismo de interesse ou produção em escala industrial a partir de utilização de engenharia genética (CHEN et al., 2023; KARCH; BURKHARD, 2016). Por não haver nas formulações o organismo patogênico, as vacinas de subunidades apresentam

uma tendência a gerar menos efeitos adversos ao animal imunizado, sendo consideradas potencialmente mais seguras (CHEN et al., 2023). Pode-se dividir esse tipo de vacina em dois grupos: vacinas recombinantes e vacinas quiméricas.

As vacinas recombinantes são vacinas compostas de antígeno selecionado do patógeno de interesse e inserido em um vetor viral ou bacteriano seguro para a espécie-alvo (FAVARO et al., 2022). Assim, o vetor, após administração, tem a capacidade de síntese da proteína selecionada, estimulando assim o sistema imunológico do animal (CHEN et al., 2023). Um exemplo de vacina recombinante utilizada na veterinária é a vacina contra leishmaniose para cães (DE BRITO et al., 2018).

Já as vacinas quiméricas são compostas de um antígeno sintético, formado pela junção de várias porções de antígenos naturais diferentes (LIN et al., 2016). Essas porções, denominadas epítomos, são selecionadas a partir de análises de bioinformática, que predizem a maior probabilidade daquele fragmento gerar uma resposta imunológica celular e/ou humoral (AIMAN et al., 2022; ANUGRAHA et al., 2015; LIN et al., 2016). Assim como a vacina recombinante, a vacina quimérica é considerada segura por não utilizar o patógeno em sua formulação. Além disso, a tendência é de uma maior efetividade em gerar uma resposta imunológica de memória adequada, devido ao fato de, em sua composição, haver apenas os melhores epítomos, selecionados anteriormente (AIMAN et al., 2022; LIN et al., 2016).

A produção de vacinas recombinantes apresentam a vantagem de poderem ser expressas em diversas plataformas de expressão heteróloga de alto rendimento de proteínas, como bactérias, algas e células de mamíferos (HUNTER et al., 2019; JIA; JEON, 2016; KARBALAEI; REZAEE; FARSIANI, 2020). Cada sistema apresenta suas características, vantagens e desvantagens próprias. Nesse sentido, a seleção da plataforma depende das características e complexidade de cada antígeno (KARBALAEI; REZAEE; FARSIANI, 2020).

2.4. Nanopartículas de PLGA

Um dos pontos críticos no desenvolvimento e produção de vacinas é relacionado à forma de entrega do antígeno de interesse, sendo as principais formas de administração das formulações são por via intramuscular, subcutânea e oral (ZHANG; WANG; WANG, 2015). Cada forma de administração apresenta vantagens e desvantagens, que dependem de fatores como facilidade e segurança. Nesse sentido, a vacinação por via oral têm ganhado espaço no mercado atualmente (CREIGHTON; WOODROW, 2019; ZHENG et al., 2018).

A vacinação oral apresenta vários desafios (figura 3) em relação à estabilidade e eficácia do candidato vacinal, devido ao grande número de obstáculos encontrados no trato gastrointestinal do animal, como presença de diversas proteases, muco e variações bruscas de pH (VELA RAMIREZ; SHARPE; PEPPAS, 2017). O contato do antígeno vacinal administrado com diversos tipos de moléculas e condições pode diminuir sua eficiência, fazendo-se necessário o desenvolvimento de mecanismos de proteção ao antígeno para aumento de estabilidade, como utilização de nanopartículas de polímeros resistentes aos fatores descritos (AMIN; BOATENG, 2023).

Nanopartículas são cápsulas com dimensão variando entre 2nm até 10µm, formadas de polímeros que apresentam natureza hidrofóbica e capacidade de envolver o antígeno de interesse, aumentando sua estabilidade (ALLAHYARI; MOHIT, 2016). Nesse sentido, o PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)) se mostra uma opção relativamente fácil e barata de se utilizar, além de ser eficiente na estabilização da formulação vacinal (AMIN; BOATENG, 2023; GU et al., 2019).

O PLGA (figura 3) pode ser encontrado de várias formas no mercado para sintetizar as nanopartículas. Sua composição varia em relação à proporção de ácido láctico e ácido glicólico, variando, por consequência, suas propriedades químicas. Há uma maior taxa de degradação com a proporção dos dois ácidos a 50:50, com essa taxa diminuindo com o aumento da proporção de ácido láctico, como 75:25 ou 85:15 (HUA et al., 2021).

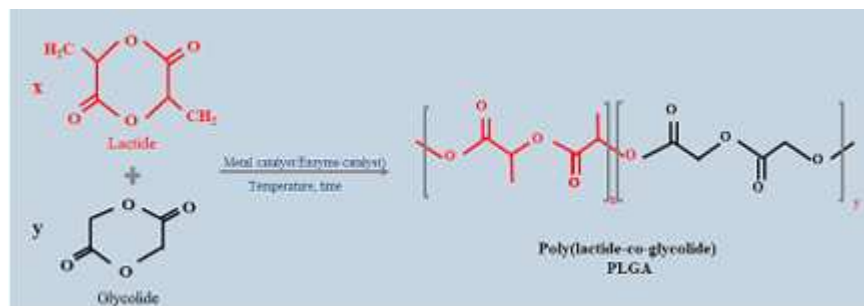


Figura 3. Monômeros e estrutura do PLGA. Fonte: Hua et al., 2021.

O PLGA funciona como protetor para o antígeno vacinal por ser resistente ao suco gástrico. Sua natureza ácida faz com que, em contato com o pH ácido estomacal, permaneça protonado e com a estrutura intacta. Assim que entra em contato com o pH alcalino do intestino delgado, a nanocápsula se ioniza a partir de uma reação ácido-base, formando sal solúvel em água e liberando o antígeno de interesse (DING; ZHU, 2018). Além de utilizado como sistema de entrega, o PLGA também apresenta função de adjuvante quando associado com antígeno vacinal, aumentando resposta humoral e celular, em especial Th1, com aumento de endocitose por células apresentadoras de antígeno (GU et al., 2020).

2.5. Tecnologia de desinfecção por adsorção

A incidência de doenças transmitidas pela água está principalmente relacionada com a qualidade da água potável disponível para consumo, uma vez que estas infecções ocorrem por ingestão ou contato com água contaminada por microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, vírus, protozoários e parasitas (LECLERC; SCHWARTZBROD; DEI-CAS, 2002). Se tratando de produção animal, é comum o descarte de dejetos produzidos nos locais de criação no ecossistema local, como rios, córregos e solo (AGGA et al., 2022).

As formas mais comuns de tratamento de água e esgoto nas estações especializadas se baseiam na utilização de luz ultravioleta e substâncias químicas, como hipoclorito de sódio e ozônio. Essas formas de desinfecção são utilizadas há muito tempo e apresentam algumas desvantagens, como alto custo de operação e possível toxicidade (FIGUEREDO et al., 2021; JIANG; ADAMS, 2006; LI et al., 2019).

Uma alternativa é a utilização de membranas de celulose como filtro de adsorção para desinfecção de águas contaminadas. A celulose, naturalmente, não possui características químicas apropriadas para uma eficiente desinfecção, porém possuem a possibilidade de sofrerem reações químicas, como aminação e hidroxilação, que conferem à membrana um carga positiva, contribuindo para a capacidade de interação molecular com os fosfolipídeos de membrana plasmática com carga negativa na superfície dos microrganismos e, assim, realizar a remoção por adsorção (ERTAS; UYAR, 2017; SAJID et al., 2022; WANG et al., 2017).

3. JUSTIFICATIVA

A produção de suínos movimentava bilhões de dólares todos os anos no mundo, sendo um importante fator na economia. Atrrelado à alta produção, desafios são recorrentes, como o alto índice de doenças infecciosas e alta produção de resíduos contaminados. Atualmente não existem vacinas comerciais para imunização contra *Brachyspira spp*, fazendo com que o controle da disenteria suína seja feito principalmente por antibioticoterapia. Além disso, o uso indiscriminado desses medicamentos pode gerar problemas relacionados a seleção de genes de resistência bacteriana a antibióticos. Ademais, o grande volume de rejeitos contaminados descartados no ambiente pode causar um grande desequilíbrio nos ecossistemas locais, com possibilidade de contaminação de nascentes, lençóis freáticos e solo. Nesse sentido, o desenvolvimento de tecnologias de controle de patógenos suínos, como antígenos vacinais e membranas de adsorção para remoção de patógenos de águas residuárias se faz necessário.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação vacinal composta de proteína recombinante quimérica nanoencapsulada em polímero PLGA para teste de controle de infecção por *Brachyspira spp.* e filtro contendo membrana de celulose derivatizada para remoção de patógenos suínos de águas residuárias por adsorção.

4.2 Objetivos Específicos

- Mapear e predizer epítomos lineares de célula B, T CD4⁺ e T CD8⁺ e antígenos com potencial vacinal previamente descritos na literatura;
- Construir uma proteína quimérica com potencial vacinal a partir das análises de imunoinformática;
- Clonar o gene sintético codificador da proteína quimérica em vetores de clonagem e expressão específicos para *E. coli*;
- Expressar e otimizar a expressão do antígeno em larga escala em *E. coli*;
- Purificar o antígeno em FPLC;
- Desenvolver protocolo de produção de nanocápsula de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA);
- Padronizar parâmetros de síntese e controle de qualidade das nanocápsulas de PLGA;
- Encapsular o antígeno purificado utilizando as nanocápsulas de PLGA;
- Modificar quimicamente membrana de celulose para otimizar a adsorção de bactérias patogênicas;
- Testar a eficiência da modificação química em membrana de celulose;
- Testar a eficiência de uma membrana de celulose quimicamente modificada para remoção de bactérias patogênicas de águas residuárias por adsorção acoplada a desinfecção por lâmpada ultravioleta.

5. METODOLOGIA

5.1 Desenho do antígeno

O primeiro passo para a construção *in silico* do antígeno foi predizer e mapear epítomos de células T CD4⁺, T CD8⁺ e células B de proteínas já existentes na literatura que foram testadas como antígenos vacinais anteriormente, calculando a probabilidade de um aminoácido participar de um epítomo e gerar uma resposta imunológica, atribuindo valores numéricos a cada um. O mapeamento de epítomos de célula B foi realizado no programa online BepiPred 3.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-3.0/>). O ponto de corte utilizado foi o valor padrão de 0,1512 sugerido pelo software, com *output* de alta confiança dos epítomos top 20% e o tamanho padrão dos epítomos preditos foi de 15 aminoácidos (CLIFFORD et al., 2022).

Os epítomos de células T CD4⁺ foram analisados utilizando o programa NetMHCII 4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCIIpan-4.0/>), para seleção de peptídeos com alta probabilidade de forte ligação com moléculas MHC classe II. Foram utilizados como referência os isotipos HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP de MHC tipo II humano, pelo motivo de haverem disponíveis para análise apenas as espécies *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Foi utilizado 15 resíduos de aminoácidos para padronização de tamanho dos epítomos e uma separação em três grupos: epítomos com ligação forte (top 1%), epítomos com ligação fraca (top 5%) e epítomos sem ligação (95% restantes) (REYNISSON et al., 2020).

Os epítomos de células T CD8⁺ foram preditos utilizando o programa NetCTLpan 1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetCTLpan-1.1/>), para a seleção dos peptídeos com maiores valores para ligação com a molécula MHC tipo I, clivagem no proteassomo e eficiência de transporte TAP. Para a predição de epítomos para T CD8⁺, foi utilizado o SLA, antígeno leucocitário específico para suínos (STRANZL et al., 2010).

Em todas as análises, foi considerada a cobertura a um mínimo de 30% de alelos da população. Os epítomos identificados com maiores valores para T CD4⁺ e T CD8⁺ e menores valores possíveis para célula B nas análises descritas foram utilizados para a construção de um antígeno proteína quimérico sintético.

5.2 Síntese do gene sintético e desenho de primers

Os epítomos selecionados foram ligados utilizando linker Ser/Gly, com proporção G₃S₂, para aumento de solubilidade e criação de sítio de clivagem pelo proteassomo, importante etapa para apresentação eficiente de antígenos na indução da resposta imunológica por vacinas (CEBALLOS-ALCANTARILLA; MERKX, 2021). Posteriormente, foi realizada a otimização dos códons utilizando a ferramenta online Codon Optimization Tool, da Integrated DNA Technologies – IDT (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>), utilizando como espécie de referência a *Escherichia coli* K12. Após, foram adicionados sítios de restrição nas extremidades do gene específicos para as enzimas NheI e XhoI. O par de primers específico para o gene sintético foi desenhado utilizando o software OligoExplorer 1.4 (GeneLink). As sequências finais dos primers e do gene sintético foram enviadas para a empresa IDT para síntese química em formato gBlock (fragmento linear de DNA dupla).

5.3 Amplificação e clonagem no vetor plasmidial pGEM®-T Easy

Posteriormente à síntese química do gene recombinante, o mesmo foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers específicos para o gene, complementares às extremidades 5'-3': Primer *forward* Brac_CL_F (ATATATGCTAGCGTCAAAGCTAAAA) e primer *reverse* Brac_CL_R (ATATATCTCGAGTTATAAGATGTGGTACA). Após a confirmação do fragmento amplificado por eletroforese em gel de agarose, o produto de PCR foi extraído do gel e purificado utilizando Kit Bioflux® (Biospin Gel and PCR Purification Kit), de acordo com instrução do fabricante e utilizado para clonagem em vetor de clonagem.

Para ligação do fragmento do gene purificado com o vetor pGEM-T *Easy* (Promega), foram utilizadas as instruções do manual do fabricante:

ng de inserto = (kb do inserto x ng do vetor / kb do vetor) X taxa molar inserto:vetor,

no qual ng de inserto/vetor corresponde à quantidade de inserto/vetor a ser utilizado na ligação, em nanogramas; kb corresponde ao tamanho do inserto/vetor em kilobases (kb) e taxa molar inserto:vetor é a razão entre a quantidade de inserto e vetor da ligação.

Para a ligação, foram utilizados 50ng do plasmídeo e 150ng de inserto. A reação permaneceu em temperatura ambiente por duas horas e posteriormente foi incubada a 4°C overnight.

5.4 Transformação de *E. coli* DH5α com os plasmídeos recombinantes

Para a transformação, foi utilizado o método baseado em choque térmico. 10μL da ligação foram adicionados a 100μL de células quimicamente competentes *E. coli* DH5α em um microtubo estéril de 1,5mL. Em seguida, a amostra foi incubada em gelo por 20 minutos, seguida de incubação a 42°C em banho-maria por 45 segundos e, por último, gelo por 2 minutos. Após a última incubação em gelo, foram adicionados 1mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) líquido ao microtubo com a bactéria competente e mantido sob agitação de 180rpm a 37°C por três horas.

Após esse período, a amostra foi centrifugada a 5000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante foi ressuspensionado cuidadosamente em 100μL de LB líquido. Com o pellet ressuspensionado, realizou-se o plaqueamento em meio sólido LB-ágar 1,5%, contendo 100μg/mL de Ampicilina, 100mM de IPTG e 50μg/mL de X-Gal, incubando a placa em estufa a 37°C overnight.

Após 20 horas de incubação, colônias brancas foram selecionadas e inoculadas em tubo estéril de 15ml contendo 5ml de meio de cultura LB adicionado de ampicilina a 100μg/mL. O inóculo foi mantido sob agitação de 180rpm a 37°C overnight. Posteriormente, 600μL da cultura de cada clone foi adicionada em microtubo estéril com glicerol, com concentração final de 20%, e estocado a -80°C. O restante da cultura foi utilizado para extração de DNA plasmidial, utilizando o Kit Bioflux® Miniprep, de acordo com as instruções do fabricante.

5.5 Confirmação da clonagem por PCR

Para confirmar a presença do gene rBrac no sítio de clonagem do vetor, foram realizadas reações de PCR, com volume final de 25μL e as seguintes proporções de reagentes:

- 2,5μL de tampão 10X com MgCl₂;

- 0,5µL de dNTPs 10mM;
- 0,5µL de cada primer (forward e reverse);
- 0,13µL de enzima Taq DNA Polimerase 5,0 U/ul (Invitrogen, CA, EUA);
- 1µL de DNA molde;
- 19,87µL de água nuclease free.

Os primers utilizados foram: M13F (GTTTTCCCAGTCACGAC) e M13R (CAGGAAACAGCTATGACC) específicos para pGEM®-T *Easy*; e Brac_CL_F (ATATATGCTAGCGTCAAAGCTAAAA) e primer *reverse* Brac_CL_R (ATATATCTCGAGTTATAAGATGTGGTACA), específicos para o gene inserido no vetor. Os passos de temperatura da PCR consistiram em um hot start a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Após os ciclos, foi adicionado mais um passo de temperatura de 72°C por 7 minutos. Para análise do resultado da PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%.

5.6 Digestão enzimática e ligação do inserto no vetor de expressão pET-28a

Para obtenção do fragmento a partir do vetor de clonagem pGEM®-T *Easy*, foi realizada uma digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*. Conforme instruções do fabricante, a reação de digestão ocorreu utilizando 5µL de 10X Universal Buffer (UB) (Cellco), 1µg de DNA e 0,5µL de *NheI* e *XhoI*, completando o volume final para 50µL com água ultrapura, seguido de incubação a 37°C, por 2 horas. Após a digestão do vetor de clonagem com liberação do inserto, os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas de interesse foram extraídas do gel e purificadas utilizando o Kit BioFlux (Biospin Gel and PCR Purification Kit) de acordo com as instruções do fabricante. O inserto extraído e purificado foi ligado ao vetor de expressão pET28a utilizando 1µL de T4 DNA Ligase (Promega), 1uL de Tampão Ligase 10X, 100ng do vetor e 200ng do fragmento, completando a reação para um volume final de 10µL.

5.7 Transformação de *E. coli* BL21 (DE3) com vetor de expressão

A transformação em *E. coli* BL21 (DE3) foi realizada por choque térmico, utilizando a mesma metodologia utilizada anteriormente para transformação da *E. coli* DH5 α . O plaqueamento foi realizado utilizando meio sólido LB-ágar 1,5%, contendo 100 μ g/mL de canamicina. Após incubação a 37°C overnight, foi realizada a seleção dos clones, inóculo e extração de DNA plasmidial. Com os plasmídeos de cada colônia extraídos, foi realizada uma reação de PCR utilizando primer específico da região T7 do vetor para confirmação da clonagem em pET-28a e primer específico para o gene recombinante.

5.8 Expressão e purificação do antígeno quimérico

Para expressar a proteína recombinante, 10 μ L do estoque do clone positivo foram pré-inoculados em 50mL de meio de cultura LB líquido contendo 100 μ g/mL de Canamicina e incubadas overnight a 37°C sob agitação de 180rpm. Após o crescimento, as culturas foram inoculadas em frasco Erlemeyer contendo 2000mL de meio LB líquido (Canamicina 100 μ g/mL) e cultivadas até densidade óptica (OD 600nm) de 0,5-0,6 a 37°C sob agitação de 180rpm. Após atingir a OD desejada, a expressão proteica foi induzida com a adição de 1 mM de IPTG por 3 horas a 37°C sob agitação a 180rpm. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada por 13000rpm, 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e em seguida o pellet armazenado a -80°C.

O pellet obtido após a centrifugação foi ressuspensionado em 100mL de tampão de ligação (20mM NaHPO₄, 500 mM NaCl e 20mM imidazol, pH 7.6). Posteriormente, o conteúdo ressuspensionado foi sonificado em banho de gelo por 10 minutos, a 60% de amplitude, para lise celular. Após a etapa de sonicação, o conteúdo foi centrifugado a 14000 rpm, 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, correspondente à fração solúvel, foi coletado e armazenado a 4°C. O pellet, correspondente à fração insolúvel, foi ressuspensionado com tampão de ligação (20mM NaHPO₄, 500 mM NaCl e 20mM imidazol, pH 7.6), adicionado de ureia 8M.

O antígeno quimérico foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando sistema “ÄKTAprime plus” (GE Healthcare, Piscataway, EUA). Nesta etapa, a fração

solúvel foi aplicada em uma coluna “HisTrap HP” de 5 mL, após ser submetida a filtração em filtro 0,22µm. A coluna foi previamente equilibrada utilizando 5 vezes o seu volume com o tampão de ligação (8M ureia, 20mM NaHPO₄, 500 mM NaCl e 20mM imidazol, pH 7.6). A eluição foi realizada através da adição do tampão de eluição (8M ureia, 20mM NaHPO₄, 500 mM NaCl e 500mM imidazol, pH 7.6). As frações purificadas do antígeno quimérico foram agrupadas em um *pool* e quantificadas, em triplicata, utilizando o método colorimétrico de Bradford, a partir de uma curva padrão da proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*), com leitura em espectrofotômetro em 595 nm.

As frações obtidas a partir da purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%. O gel de separação 12,5% foi preparado utilizando solução de bis-acrilamida 30%, tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v. O gel de concentração foi preparado utilizando solução de bis-acrilamida 30%, tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v.

Foi adicionado às amostras tampão próprio (SDS 10%, Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, azul de Bromofenol 1%, 2-β-mercaptoetanol 5% e glicerol 10%) e, após, as amostras foram fervidas em termociclador por 10 minutos, para desnaturação proteica. A eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e pH 8,3), sob voltagem constante de 100V durante 2h. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1%, metanol 50% e ácido acético 10%) por 15min sob agitação e, em seguida, descorados em solução metanol 25% e ácido acético 7,5% overnight.

Para confirmação da expressão e purificação do antígeno quimérico, foi realizada uma análise por Western Blotting. As proteínas separadas no SDS-PAGE 12,5% foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando sistema semi-seco. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio com BSA 3% em PBS-W por 1h. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-W e incubada por 1h em solução de anticorpo primário anti-his em proporção 1:3000 (GE Healthcare; código: 27-4710-01). Novamente a membrana foi lavada com PBS-W 3 vezes e incubada por 1h em anticorpo secundário anti-mouse conjugado à peroxidase, em proporção 1:7500. A revelação para detecção do antígeno foi realizada

com solução de 10mg de DAB (3,3'-Diaminobenzidine) com 1mL de solução de NiCl_2 0,3%, 1mL de tampão Tris 1M pH 7,6, 8mL de H_2O e 10 μL de H_2O_2 .

5.9 Rastreamento de animais infectados por *Brachyspira* spp.

O rastreamento para identificação de animais infectados foi conduzido na Unidade de Pesquisa e Melhoramento em Suínos, localizada na Universidade Federal de Viçosa (MG), com consentimento e autorização prévias. A coleta do material para identificação de patógenos intestinais de suínos foi previamente aprovado por Comitê de Ética de Experimentação Animal da empresa parceira Animalnutri, sob número de protocolo 004/2023 (Anexo I). Fezes foram coletadas por swab retal de 17 animais, sendo 10 com idade <15 dias e 7 animais com idade de 42 dias. As amostras foram armazenadas sob refrigeração para processamento.

A partir das fezes coletadas, foi extraído DNA genômico total, utilizando o Kit Omega E.Z.N.A ®, segundo recomendações do fabricante. O DNA obtido foi submetido a uma reação de PCR, em um volume total de 25 μL , com os reagentes nas seguintes proporções:

- 2,5 μL de tampão 10X com MgCl_2 ;
- 0,5 μL de dNTPs 10mM;
- 0,5 μL de cada primer (forward e reverse);
- 0,13 μL de enzima Taq DNA Polimerase 5,0 U/ μL (Invitrogen, CA, EUA);
- 1 μL de DNA molde;
- 19,87 μL de água nuclease free.

Após confirmação dos animais positivos para *Brachyspira* spp, as amostras correspondentes foram armazenadas a -80°C para posterior utilização.

5.10 Produção de Nanopartícula de PLGA

O preparo da nanopartícula de Poli (ácido D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) com o antígeno quimérico foi baseada em método de dupla emulsão (SARTI et al., 2011). A primeira solução foi composta de uma mistura de 5ml de PLGA com diclorometano (10 mg/ml) e misturada com vórtex em velocidade máxima por 5 minutos. A essa

solução, foram adicionados 200 μ L de antígeno, com concentração de 0,2mg/mL. A primeira emulsificação foi realizada em banho ultrassônico a 4°C (Sonicator Sonics Vibra Cell VC-505) em amplitude e potência máximos por 5 minutos de pulso contínuo.

Após a formação da primeira emulsão, foi adicionado 20ml de solução aquosa de álcool polivinílico (PVA), a uma concentração de 1% e misturado em vórtex com velocidade máxima por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a segunda emulsificação em banho ultrassônico a 4°C em amplitude e potência máximos por 10 minutos. Posteriormente à emulsificação, a solução foi colocada sob agitação em agitador magnético por 2 horas para evaporação do solvente orgânico, utilizando velocidade máxima. As nanopartículas de PLGA formadas foram submetidas a três ciclos centrifugação (14000rpm, 4°C) e redispersão em água destilada. Para análise da formação e dispersão das nanopartículas, utilizou-se o método de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

5.11 Preparação e oxidação da membrana de celulose

Para a modificação química, foi utilizada uma membrana de celulose regenerada com 12000-14000 Da (Laboratórios Spectrum®). A membrana foi lavada em água destilada corrente por 30 minutos. Após a lavagem, os pedaços foram secos em estufa a 37°C por 2 horas. Após a secagem, a membrana foi submetida ao processo de oxidação.

A oxidação foi baseada no trabalho de Wang e colaboradores, 2017. A membrana foi imersa em recipiente com 1L de solução de Ácido Bórico a 0,1M, pH = 10,5. A essa solução foi adicionado 2g de Brometo de Sódio e 0,3g de TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) e homogeneizada por agitação magnética a temperatura ambiente por 3h. Posteriormente, a membrana foi seca em estufa a 60°C por 10 minutos. Após a secagem, a membrana foi impregnada com uma pasta de alginato, composta de 40ml de solução de Ácido Bórico descrita anteriormente, adicionada de 5g de Alginato e 6ml de Hipoclorito de Sódio, homogeneizados até obter uma pasta lisa e completamente homogênea. A pasta foi aplicada em toda a superfície da membrana e mantida por 1h.

Após o tempo de incubação com a pasta, a membrana foi lavada com água destilada. Posteriormente, foi cortada em pedaços com área de 1cm² e incubadas em solução de metanol (250ml) e PEI (polyethylenimine) (4g) por 24h. Após as 24h, a membrana foi lavada em 100ml de metanol anidro para remoção do PEI. Posteriormente à lavagem, foi incubada em 20ml de solução de glutaraldeído a 25°C por 2h. Por fim, a membrana foi submetida a ciclos de lavagem em água destilada corrente.

5.12 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada no Laboratório de Análise Multivariada de Dados Químicos (MCDALab) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Para isso, 100mg da membrana foi macerado em nitrogênio líquido e submetidos à técnica de reflexão atenuada (ATR) utilizando o equipamento Varian 660-IR, operando em modo de transmitância com varredura na faixa de comprimento de onda de 400 – 4000 cm⁻¹. A análise foi feita usando uma membrana controle, sem modificação e duas partes da membrana modificada: uma parte com coloração mais clara e uma parte com coloração mais escura.

5.13 Teste de remoção bacteriana

Um protótipo de uma estação de tratamento foi construído utilizando dois aquários interligados, contendo entre eles um filtro com a membrana modificada e, acoplado, uma lâmpada ultravioleta-C (UVC) de 9 watts. Dentro dos aquários, bombas circulavam o volume de líquido pelo filtro a uma velocidade constante de 2L/min. O experimento foi realizado em duas fases: a primeira com a lâmpada UVC desligada e a segunda com a lâmpada UVC acesa. Um volume final de 20L de solução salina (NaCl 0,9%) com 30ml de inóculo de cultura de *E. coli* isoladas de intestino suíno, em concentração de 1x10⁶ células foi utilizado para a realização dos testes. Foram coletadas alíquotas de 5mL após a passagem pelo filtro contendo a membrana sem modificação, passagem pelo filtro com membrana modificada e com a lâmpada desligada e passagem pelo filtro com membrana modificada e lâmpada ligada. A

eficiência foi demonstrada por plaqueamento em meio de cultura LB ágar utilizando método de microgota.

5.14 Identificação das bactérias na cultura isolada

Para identificação das bactérias presentes na cultura isolada de intestino suíno, foi realizada extração de DNA genômico utilizando o kit Blood-Animal-Plant Preparation Kit (Cellco), de acordo com o manual do fabricante. Os primers utilizados estão descritos no quadro 1.

Quadro 1. Primers utilizados para identificação de bactérias.

Espécie	Sequência	Referência
<i>Lawsonia intracellularis</i>	F: GCTGTGGATTGGGAGAAATC	WATTANAPHANSAK et al., 2010
	R: CAAGTTGACCAGCCTCTGC	
<i>Brachyspira ssp.</i>	F: AGTGAAATAGTTGCTCATATCAAAT	RUBIN et al., 2013
	R: GCATCACTGATTAAAGAACCAAT	
<i>Clostridium difficile</i>	F: TTGAGCGATTTACTTCGGTAAAGA	MUTTERS et al., 2009
	R: CCATCCTGTACTGGCTCACCT	
<i>Clostridium perfringens</i>	F: AAATGTAACAGCAGGGGCA	DUMONCEAUX et al., 2006
	R: TGAAATTGCAGCAACTCTAGC	
<i>Escherichia coli</i>	F: TGATTGGCAAATCTGGCCG	WALKER et al., 2017
	R: GAAATCGCCCAAATCGCCAT	
<i>Salmonella cholerasuis</i>	F: AGATATGCGGCTTGCTGACT	AKIBA; KUSUMOTO; IWATA, 2011
	R: AGCGTGGCTCGAAACAGTAT	
<i>Salmonella typhimurium</i>	F: GCTGCTTTCTCTACTTAAC	SAEKI et al., 2013
	R: GTAATGGAATGACGAACAT	
<i>Streptococcus suis</i>	F: CAGGCAATGATTTATCTGGAGATG	ARAI et al., 2018
	R: GCGTGATTGGCTGAGCTGACCT	
Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2)	F: TCTACATTTCCAGCAGTTTG	SUN et al., 2020
	R: CTCCCGCCATACCATA	
Rotavírus	F: GCTAGGGAYAAAATTGTTGAAGGTA	MARTHALER et al., 2014
	R: ATTGGCAAATTCCTATTCCTCC	

O DNA obtido foi submetido a uma reação de PCR, em um volume total de 25µL, com os reagentes nas seguintes proporções:

- 2,5µL de tampão 10X com MgCl₂;
- 0,5µL de dNTPs 10mM;
- 0,5µL de cada primer (forward e reverse);
- 0,13µL de enzima Taq DNA Polimerase 5,0 U/ul (Invitrogen, CA, EUA);
- 1µL de DNA molde;
- 19,87µL de água nuclease free.

Os ciclos de temperatura da PCR foram padronizados para todos os primers e consistiram em um hot start a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Após os ciclos, foi adicionado mais um passo de temperatura de 72°C por 5 minutos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização da proteína recombinante

O antígeno recombinante foi construído baseado nas predições de epítomos de proteínas já testadas anteriormente e proteínas com possível potencial antigênico, porém ainda sem testes *in vivo* contra *Brachyspira spp.* Para os epítomos de células T CD4⁺ e células T CD8⁺, foram feitas seleções positivas, sendo selecionados os epítomos com os maiores escores possíveis. Para os epítomos de células B, foi realizada uma seleção negativa, na qual os epítomos com maiores escores foram excluídos da seleção. Detalhes das proteínas selecionadas para predição dos epítomos estão descritos no quadro 1. A representação gráfica dos epítomos selecionados das proteínas previamente testadas pode ser visualizada nas figuras 4, 5 e 6.

Quadro 2. Descrição dos genes correspondentes às proteínas utilizadas para predição dos epítomos para construção do antígeno quimérico.

Nome da proteína	Descrição do Gene	Tamanho	Referência
BmpB	Lipoproteína de membrana. Recombinante expressa em <i>E. coli</i> BL21 com cauda de histidina. Resulta em produção de anticorpos, mas não é completamente eficiente. Proteção de cerca de 50%.	29,7kDa	LA et al., 2004; LEE et al., 2000.
Vsp	Proteína de membrana. Recombinante expressa em <i>E. coli</i> BL21. Proteção vacinal não foi testada.	39kDa	WITCHELL et al., 2011
SmpB	Proteína ligante de RNA. Recombinante expressa em <i>E. coli</i> BL21.	18,8kDa	HOLDEN; COLOE; SMOOKER, 2008
ORF-H7 ORF-H12 ORF-H34	Candidatos vacinais escolhidos após análises <i>in silico</i> e confirmação por qPCR.	-	SONG et al., 2009

A seleção dos epítomos foi baseada na maior probabilidade de gerar respostas para células T CD4⁺ e T CD8⁺ pelo fato de gerarem respostas protetivas celulares contra patógenos intracelulares, que é o caso da *Brachyspira spp* (LA et al., 2004; LIU et al., 2021).

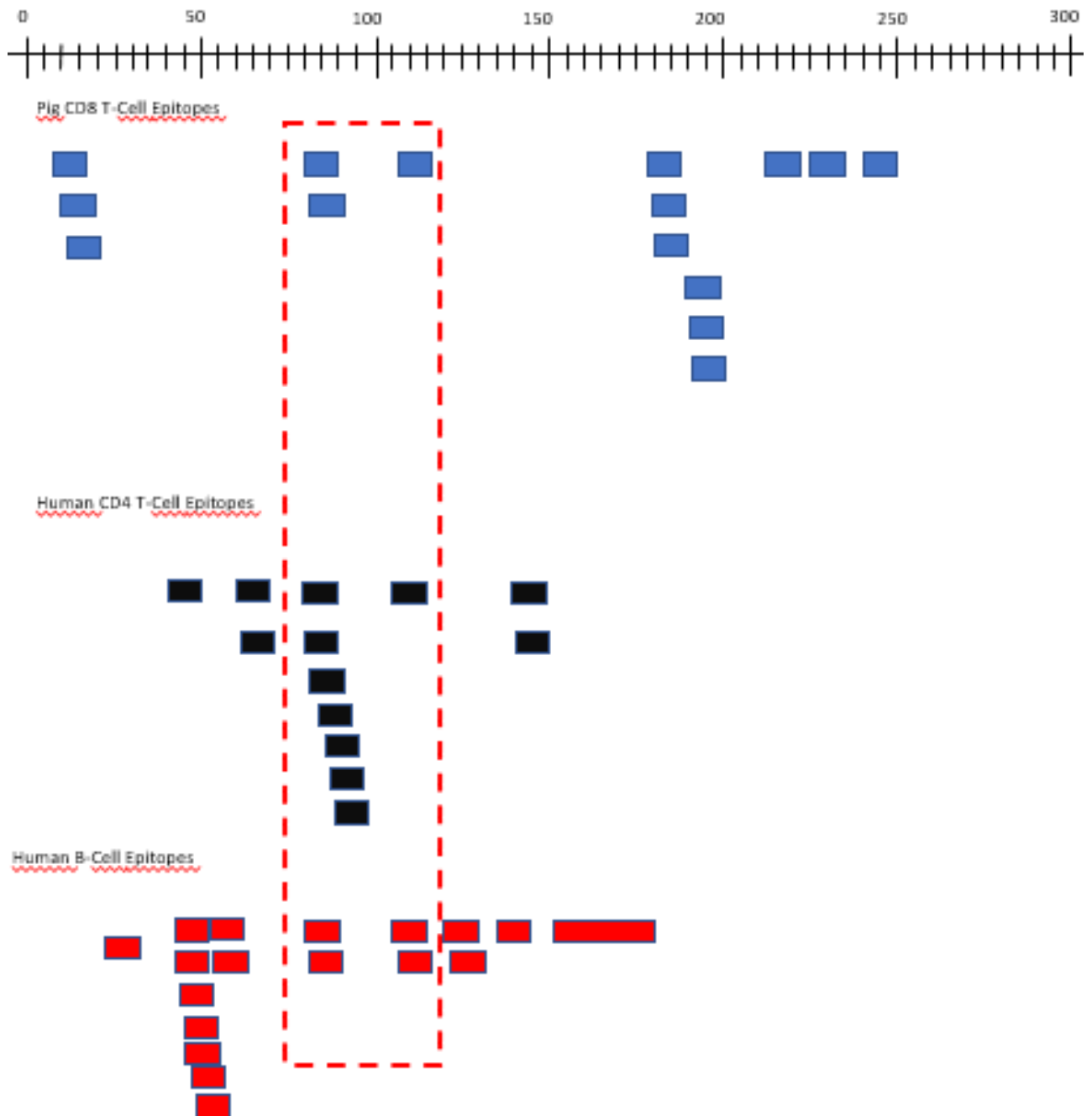


Figura 4. Representação gráfica dos epítomos selecionados da proteína BmpB.

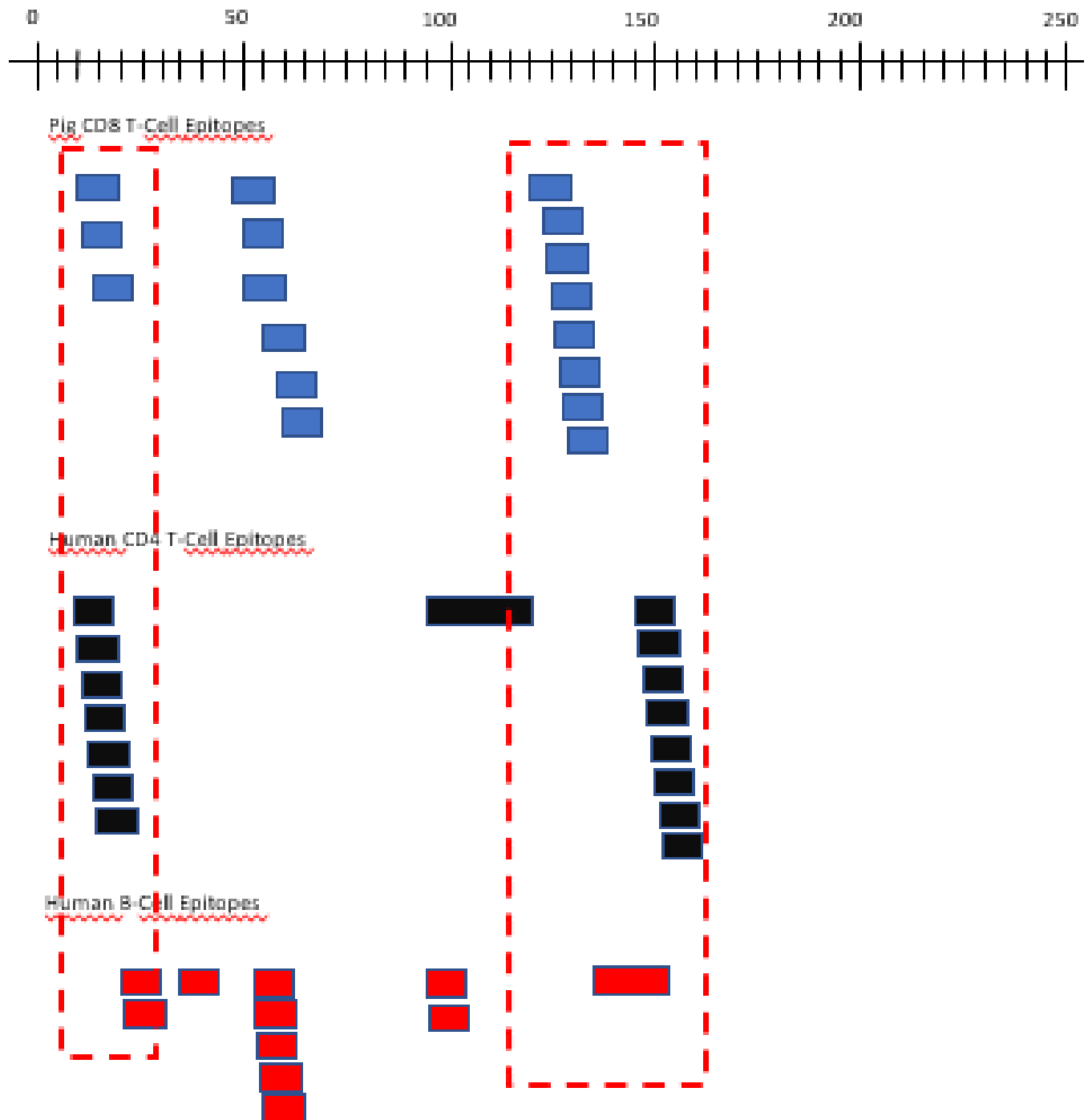


Figura 5. Representação gráfica dos epítomos selecionados da proteína VspD.

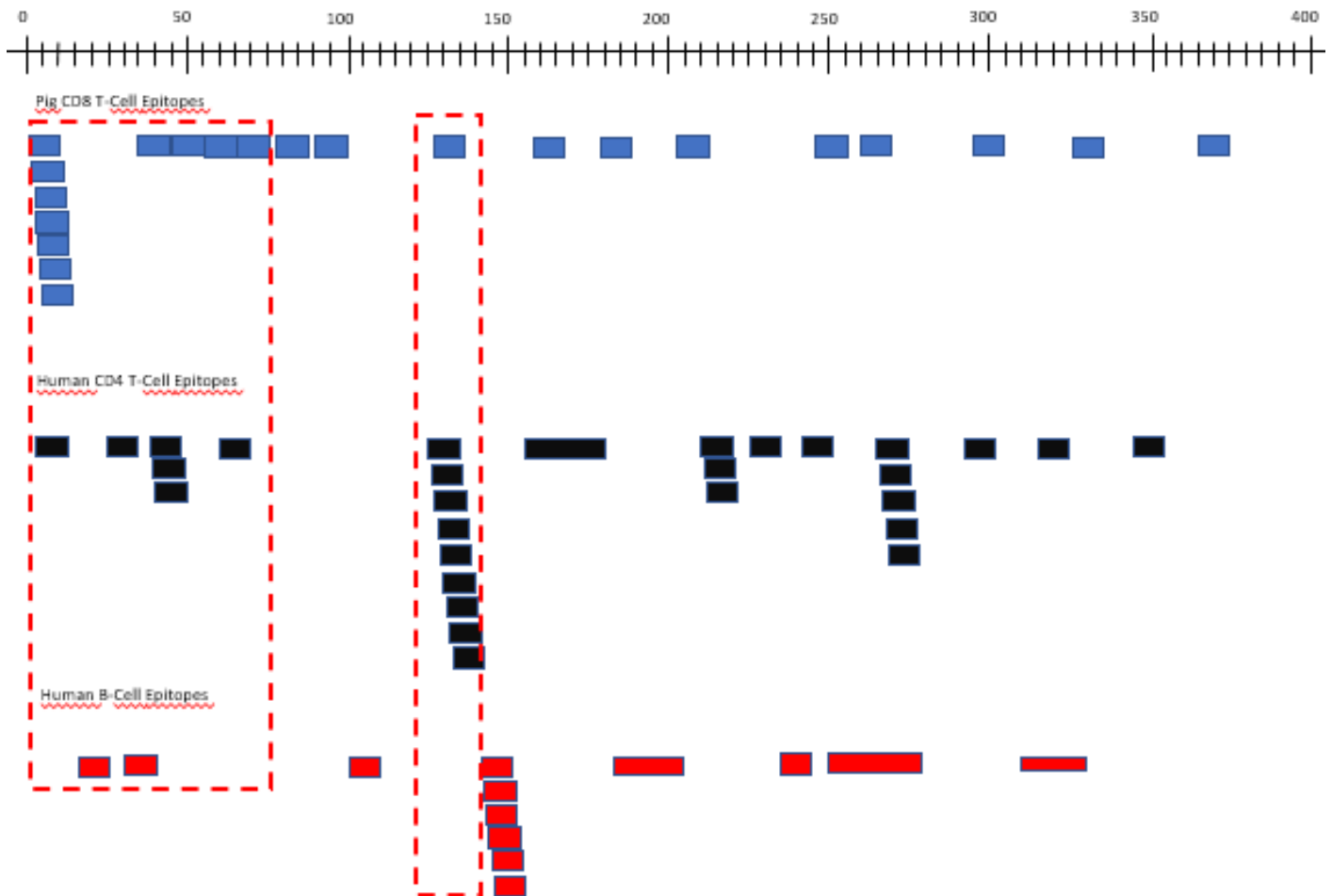


Figura 6. Representação gráfica dos epítomos selecionados da proteína SmpB.

A montagem do antígeno quimérico consistiu na combinação dos epítomos selecionados, sendo agrupados em peptídeos de, no máximo, 70 aminoácidos. Foram colocados 6 linkers de glicina/serina na sequência proteica, para aumento de solubilidade e flexibilidade. Abaixo é demonstrada a sequência de aminoácidos do antígeno quimérico construído a partir das análises descritas.

Sequência de aminoácidos do antígeno recombinante:

VKAKIESALKAIRVNPTVVVSGGDKGETKMTFKITIEPADSKVTFNNDLNEYKTGKAGCTIGLTPASTKNGSGS
 GIDLNAFQHYAYFNDEVSNKGYDLTAIADTYISAMNIYSTGSGSGMTVLLSMSYCSIFGMYGSGSQFGFVLGNN
 TIKGTFGFRSQSLSTHLGYILLNNNFGTYFGTTISCGIGYTSEAFSIGIGYNYTTGSGSGLGISTDTQIRYYTGI
 DAFNEIRLYIKYQQLGYGSGSGKVAVMPFLNSVPIEYMINNKLDEKYGFKIETVYFPSGGPMNEALGAGL
 WEVGTLSAASVYSLANYNAHVADIGHSEGSGSGFTLNGIEYYGSLMFIPYNDTMIVVNELNIEDYVKG
 VLPHEMSPDWPMEALKAQAVAARTYAMYHIL

GSGSG: linker de glicina e serina para aumento de solubilidade e flexibilidade.

Propriedades físico-químicas da proteína:

- Número de aminoácidos: 400;
- Peso molecular teórico: 42,7kDa;
- Ponto isoelétrico: 5,20;
- Índice de instabilidade: 30,25 (proteína estável - referência de proteína estável < 60);
- Índice de hidrofobicidade: -0,015 (proteína polar – referência de proteína polar < 0);

A sequência proteica construída foi otimizada para expressão gênica em *E coli* K12, organismo modelo de referência. Para a clonagem nos vetores utilizados, foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *XhoI*. O gene recombinante otimizado está representado a seguir (Figura 7).

```

GCTAGC GTC AAA GCT AAA ATC GAG TCC GCT TTA AAG GCG ATC CGC GTG AAT C
CT ACG GTC GTG GTT TCG GGG GGA GAC AAA GGG GGT GAG ACC AAA ATG ACT T
TT AAA ATT ACA ATC GAA CCT GCC GAC TCC AAA GTG ACC TTT AAT AAT GAC C
TG AAT GAG TAC AAG ACT GGG AAG GCT GGC TGT ACT ATT GGG TTA ACT CCA G
CA TCC ACC AAG AAT GGC AGC GGG TCT GGT ATT GAT TTG AAT GCG TTT CAA C
AC TAT GCC TAC TTC AAT GAT GAA GTA AGC AAT AAG GGT TAC GAT TTG ACT G
CT ATC GCA GAC ACT TAC ATC TCC GCT ATG AAC ATT TAT TCA ACT GGC TCA G
GC AGC GGC ATG ACC GTG CTT TTG TCC ATG TCG TAC TGC TCA ATT TTC GGC A
TG TAT GGA TCG GGT TCA GGG CAA TTC GGT TTC GTA TTA GGA AAC AAT ACC A
TC AAG GGA ACA TTC GGA TTC CGT AGT CAA TCA CTT TCT ACA CAC TTG GGT T
AT ATT TTA CTG AAT AAT AAC TTC GGT ACA TAT TTC GGT ACC ACC ATT AGC T
GC GGT ATT GGC TAT ACT TCC GAA GCA TTC TCA ATC GGG ATC GGG TAT AAC T
AT ACA ACC GGG TCG GGT TCA GGG CTG GGG ATC AGC ACC GAC ACC CAA ATC C
GC TAC TAC ACC GGC ATC GAT GCT TTC AAC GAG ATC CGT CTG TAT ATC AAA T
AC GGT CAG TTA GGC TAT GGA TCG GGC AGT GGT AAA GTT GCG GTT ATG CCT T
TT TTA AAT TCG GTG CCC ATC GAG TAT ATG ATC AAC AAT AAG TTG GAT GAA A
AG TAC GGA TTT AAA ATC GAG ACT GTG TAT TTT CCC AGT GGG GGT CCA ATG A
AT GAG GCG CTG GGG GCC GGT TTA TGG GAG GTA GGC ACG TTG TCT GCA GCC T
CA GTT TAC AGC TTA GCA AAT TAT AAT GCA CAC GTG GTC GCC GAT ATT GGA C
AT TCT GAA GGG TCT GGA TCG GGG TTT ACA CTT AAC GGG ATC GAA TAT TAT G
GA AGC CTG ATG TTT ATT CCG TAC AAC GAC ACA ATG ATT GTT GTC AAT GAG T
TA AAT ATT GAA GAC TAC GTG AAA GGT GTA CTT CCC CAT GAA ATG TCC CCA G
AC TGG CCG ATG GAA GCA CTG AAA GCA CAA GCA GTC GCT GCA CGC ACT TAT G
CG ATG TAC CAC ATC TTA TAA CTCGAG
  
```

GCTAGC: sítio de restrição aminoterminal (*NheI*);

CTCGAG: sítio de restrição carboxiterminal (*XhoI*).

Figura 7. Sequência de nucleotídeos do gene sintético desenhado.

6.2 Amplificação e clonagem do gene sintético

Após a síntese química do gene recombinante, o mesmo foi amplificado por reação de PCR. Após confirmação por eletroforese em gel de agarose, o produto da reação foi purificado para posterior clonagem (Figura 8).

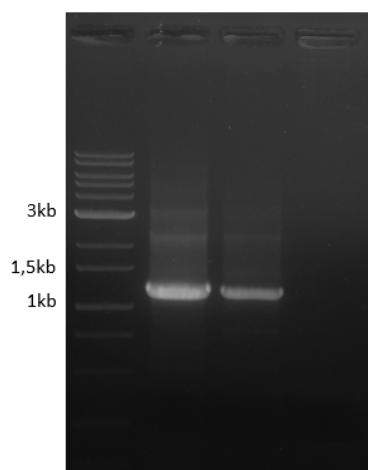


Figura 8. Confirmação da amplificação do gene sintético rBrac em eletroforese em gel de agarose.

Com o produto de PCR purificado, foram realizadas duas ligações, uma em vetor de clonagem pGEM-T Easy e uma em vetor de expressão pET-28a. Para a transformação com o vetor pGEM-T Easy, foi utilizada a *E. coli* DH5 α e para a transformação com o vetor pET-28a, foi utilizada a *E. coli* BL21(DE3). Após o crescimento das colônias em placas de Petri (Figura 9), foram selecionados clones para confirmação por PCR, utilizando primer específico para o gene recombinante e primers específicos para os vetores utilizados (Figura 10). A clonagem também foi confirmada por digestão utilizando as enzimas de restrição *Nhe*I e *Xho*I para ambos os vetores (Figura 11).

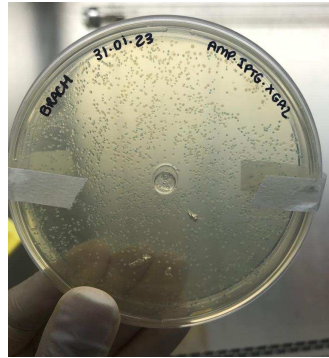


Figura 9. Placa de Petri com colônias após transformação com gene sintético ligado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy.

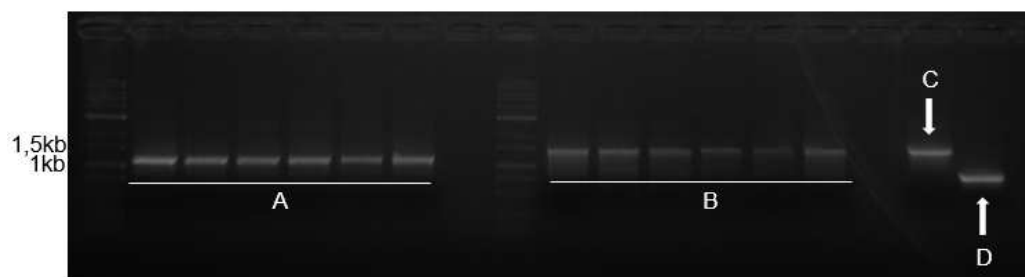


Figura 10. Confirmação da clonagem por PCR. A: confirmação da clonagem no vetor pGEM® T-Easy utilizando primer específico. B: confirmação da clonagem no vetor pGEM® T-Easy utilizando o primer M13. C: confirmação da clonagem no vetor pET-28a com primer específico. D: confirmação da clonagem no vetor pET-28a com primer T7.

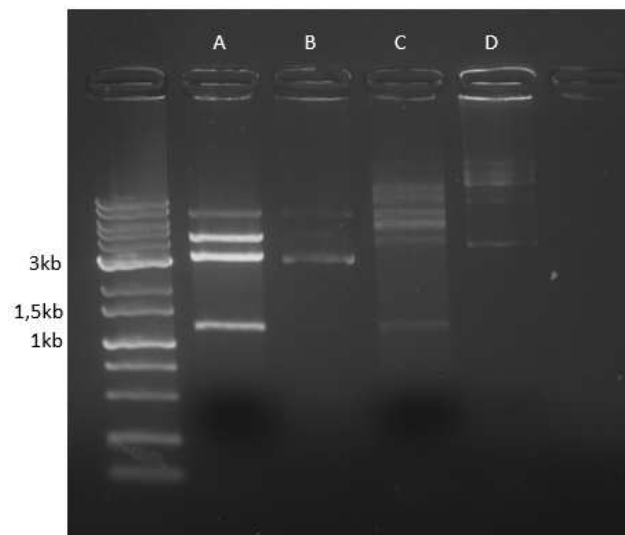


Figura 11. Confirmação da clonagem em pGEM® T-Easy e em pET-28a por digestão, utilizando as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*. A: pGEM-T Easy com inserto digerido. B: pGEM-T Easy sem inserto digerido. C: pET-28a com inserto digerido. D: pET-28a sem inserto digerido.

6.3 Expressão e purificação do antígeno quimérico

Após as confirmações das transformações realizadas, o clone positivo para o vetor de expressão pET-28a foi estocado a -80°C . A partir desse estoque foi realizado o inóculo para expressão do gene recombinante. A expressão da proteína de interesse foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, para verificação das frações solúvel e insolúvel (figura 12). A fração insolúvel foi selecionada para purificação por cromatografia de afinidade.

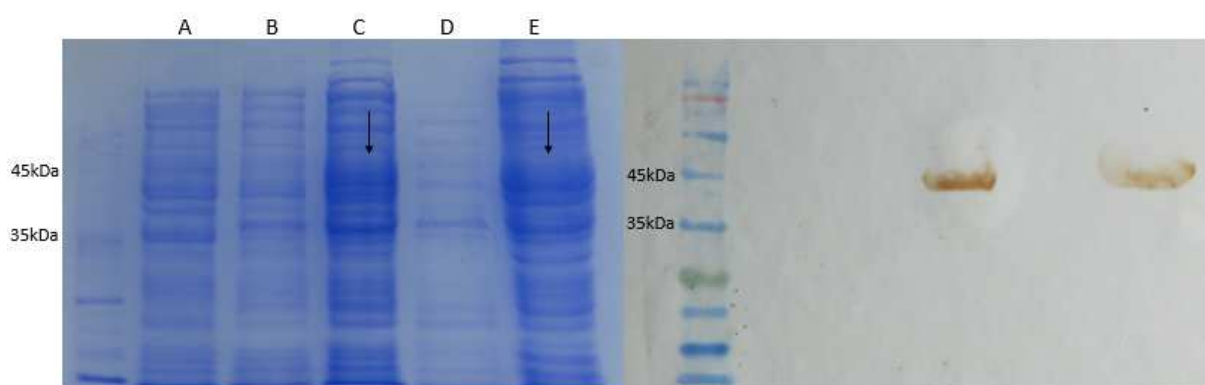


Figura 12. Fração solúvel e insolúvel da expressão do antígeno quimérico. A: *E. coli* wild-type. B: alíquota não induzida. C: alíquota induzida. D: fração solúvel. E: fração insolúvel.

Após a purificação, foram selecionadas 9 frações para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 13A). Posteriormente, foi realizado o imunoenensaio Western Blotting para confirmação da expressão do antígeno quimérico (Figura 13B). As frações purificadas foram agrupadas em um *pool* e quantificadas pelo método de Bradford. A concentração da proteína purificada foi de 0,2mg/mL, com rendimento final de 2mg/L de inóculo.

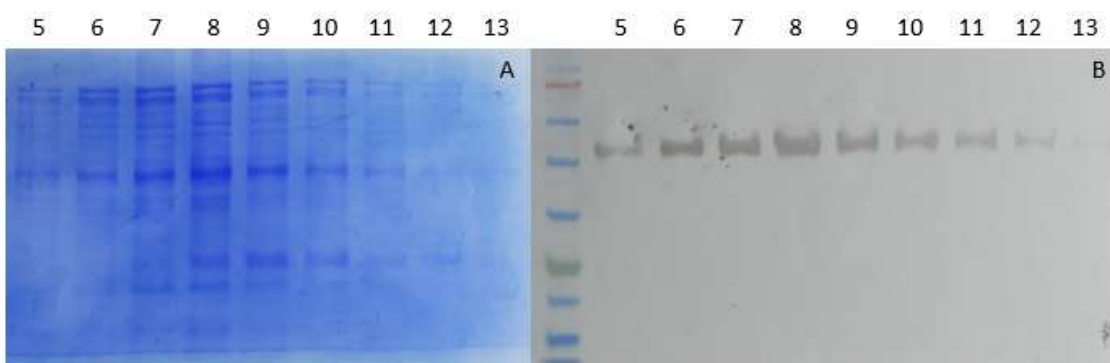


Figura 13. A) Análise da purificação da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida. B) Confirmação da proteína de interesse por Western Blotting. Os números correspondem às frações purificadas.

A seleção das frações para análise em eletroforese em gel de poliacrilamida, Western Blotting e quantificação por Bradford foi baseada na análise do cromatograma fornecido pelo software Unicorn, GE®, que acompanha o cromatógrafo utilizado para a purificação do antígeno quimérico. As frações de número 5 a 13 estão correspondentes à maior área sob a curva de absorbância de luz ultravioleta durante a eluição da coluna de afinidade, indicando que são as frações com maior concentração da proteína purificada. Essa análise é corroborada pela figura 12B, na qual as frações correspondentes a um menor valor de absorbância no gráfico apresentam marcações mais fracas na membrana de celulose utilizada no Western Blotting (Figura 14).

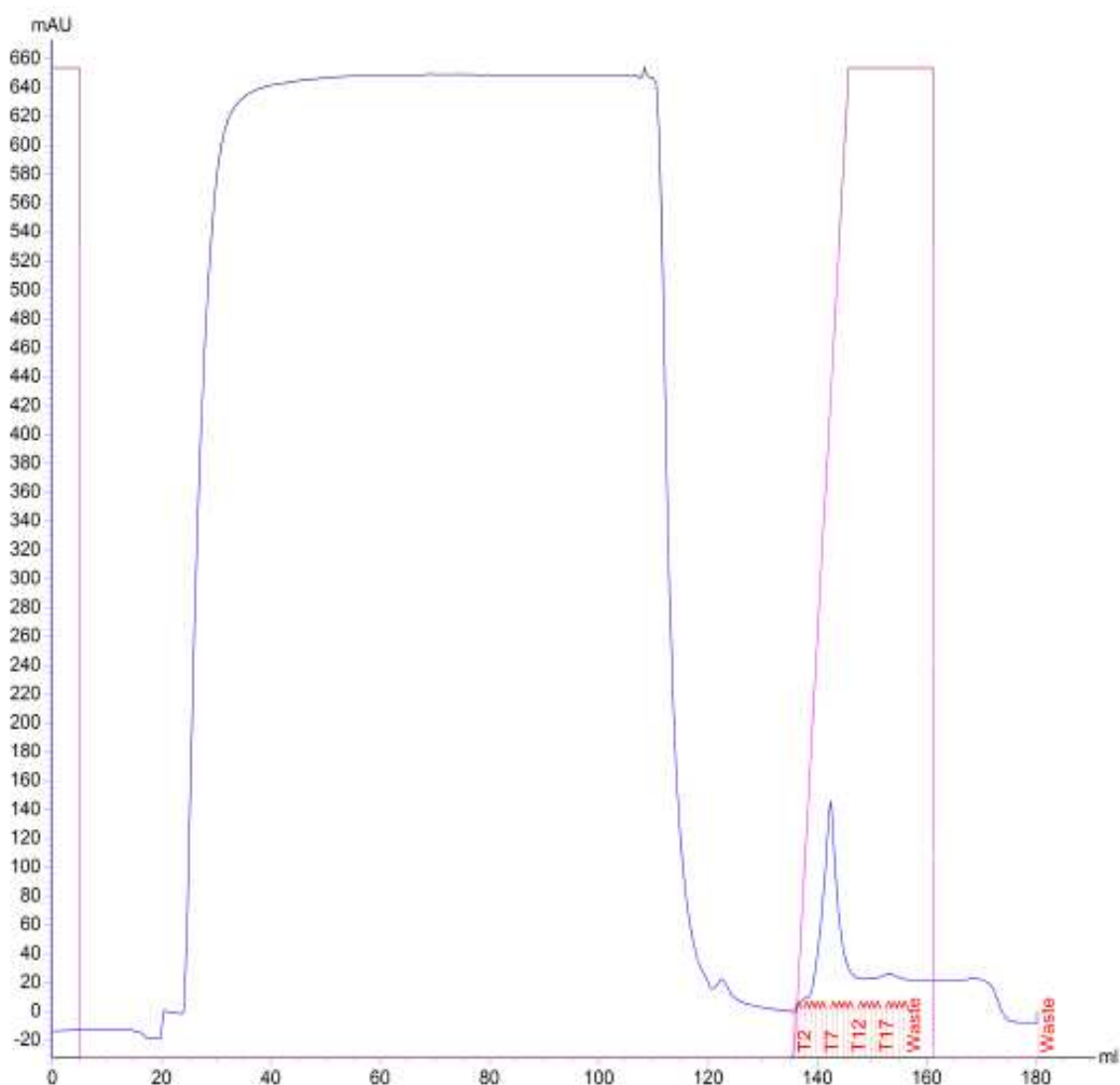


Figura 14. Cromatograma de purificação do antígeno recombinante.

Três dos seis antígenos selecionados para predição dos epítomos-base para a construção do antígeno quimérico foram clonadas em vetores de expressão e corretamente expressas em *E. coli* BL21 (DE3), em quantidade suficiente para realização de testes *in vivo* (HOLDEN; COLOE; SMOOKER, 2008; LA et al., 2004; LEE et al., 2000; WITCHELL et al., 2011). Isso justifica a escolha por essa cepa no presente estudo e pode explicar o sucesso da expressão do antígeno quimérico, pela compatibilidade dos epítomos. A expressão do antígeno quimérico proposto apresenta potencial para escalonamento, o que significa que podem ser realizados para otimizar a expressão em larga escala para a indústria, a fim de aumentar a produção para fins comerciais.

6.4 Rastreamento de animais positivos para *Brachyspira* spp.

Para o rastreamento de animais infectados com *Brachyspira* spp, foram selecionadas 2 matrizes e seus respectivos leitões, separados em baias individuais, na Unidade de Pesquisa em Melhoramento de Suínos, UFV. Foram coletadas amostras de fezes por swab retal de 5 leitões de cada matriz, selecionados aleatoriamente, sendo esses leitões animais com menos de 15 dias de vida, ainda não vacinados. Também foram selecionados aleatoriamente 7 animais com 42 dias de vida para coleta de fezes. Os animais estavam identificados e foram contidos manualmente para a coleta do material (Figura 15).



Figura 15. (A) Realização do swab retal dos animais. (B) Baias individuais das matrizes.

A partir das fezes coletadas, foi extraído DNA genômico total para realização de PCR, com a finalidade de identificar animais infectados (figura 16). Dentre os 17 animais, 3 animais foram considerados positivos para *Brachyspira spp.* devido à detecção do gene NADH oxidase, de 354pb, específico para o gênero *Brachyspira*. Todos os animais detectados como positivos tinham <15 dias de idade, eram filhotes da mesma matriz e permaneciam juntos na mesma baia.

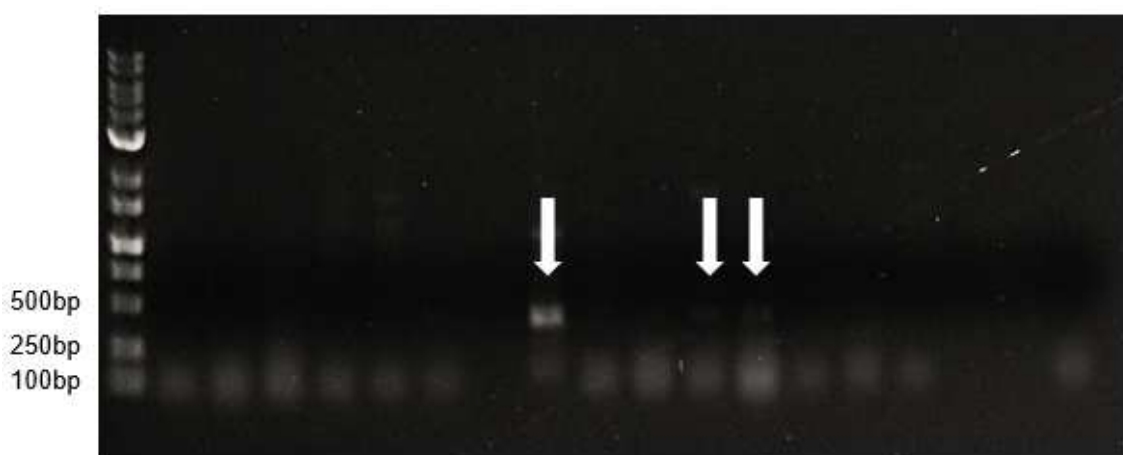


Figura 16. Rastreamento de animais infectados por *Brachyspira spp.*, na Unidade de Pesquisa em Melhoramento de Suínos, UFV.

É perceptível a importância do rastreamento para identificação e possível controle da infecção por *Brachyspira spp.*, pelo fato de os animais infectados permanecerem no mesmo local de convivência com animais saudáveis aumentar a chance de disseminação da doença. A identificação e as medidas de biossegurança adequadas são de suma importância para diminuição da probabilidade de surtos (DESROSIERS, 2011).

6.5 Síntese de nanopartícula de PLGA

O antígeno quimérico, após sintetizado, foi encapsulado em nanopartículas de PLGA. As nanopartículas foram submetidas à síntese baseada em dupla emulsão e posterior evaporação do solvente orgânico (SARTI et al., 2011). A confirmação da

formação das nanopartículas e suas dimensões estão demonstradas nas figuras 17 e 18.

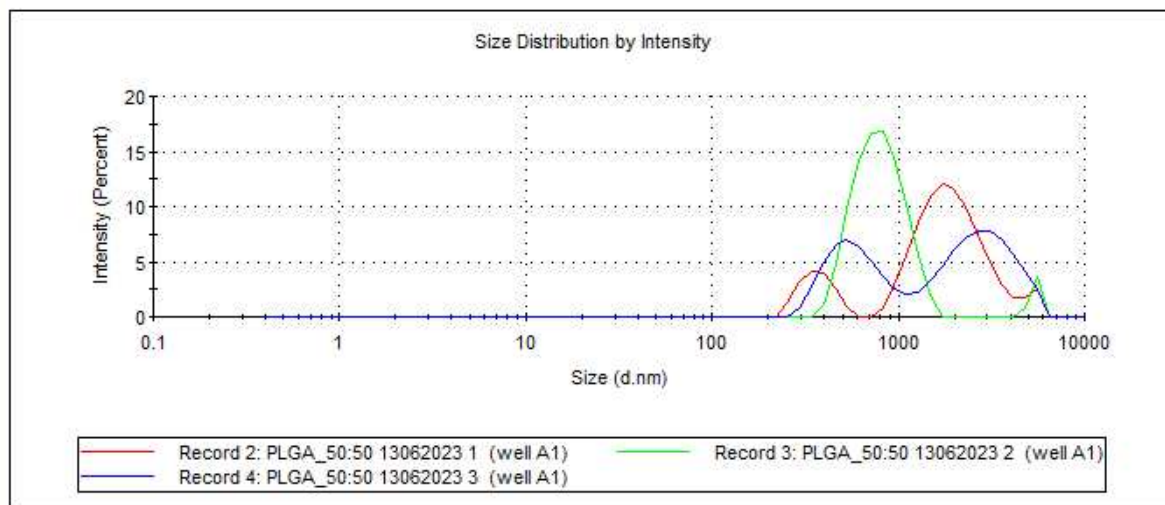


Figura 17. Análise de tamanho das nanopartículas de PLGA com antígeno quimérico pela intensidade.

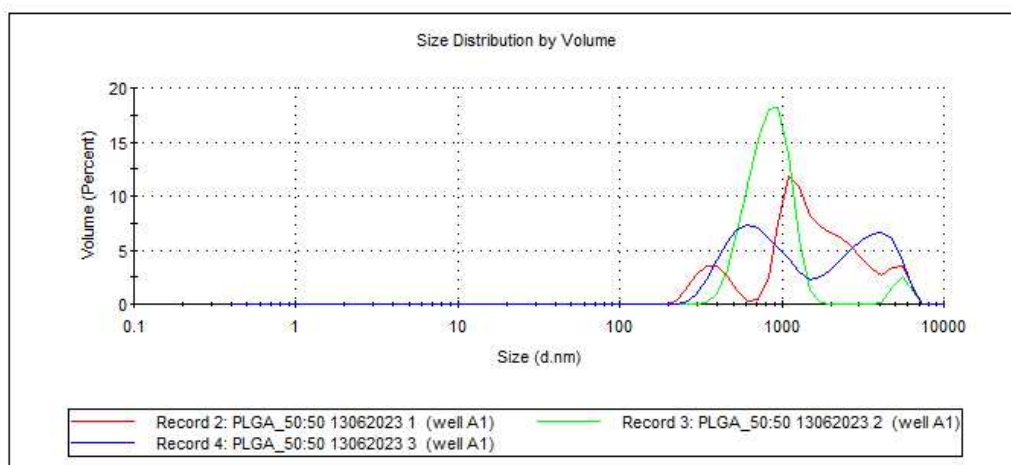


Figura 18. Análise de tamanho das nanopartículas de PLGA com antígeno quimérico pelo volume.

Após análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS), pode-se comprovar a formação da nanopartícula pela formação dos gráficos de dimensão. As análises foram realizadas em triplicatas técnicas, representadas pelas curvas de diferentes cores. O tamanho médio das triplicatas, pelo volume e pela intensidade, foram similares, permanecendo em torno de 1000nm. O desvio-padrão alto entre as

triplicatas indica uma despadronização em relação ao tamanho das partículas, com alta variabilidade de dimensão na mesma amostra.

Em relação ao tamanho das nanopartículas, estudos relatam uma variação de dimensão ótima entre 250nm e 600nm para utilização como entrega de medicamentos e antígenos vacinais (AMIN; BOATENG, 2023; SHIPUNOVA et al., 2021; WANG et al., 2021). Porém, a cápsula desenvolvida com uma dimensão maior pode apresentar uma vantagem de resistir mais tempo no trato gastrointestinal, devido sua, proporcionalmente, menor superfície de contato. Isso facilitaria a entrega do antígeno a porções mais distais do intestino. Para corroborar essa hipótese, estudos *in vivo* devem ser realizados.

6.6 Modificação da membrana de celulose e eficiência de desinfecção

A membrana de celulose foi submetida a reações de modificação química em sua estrutura e posteriormente analisada por FTIR. O resultado da análise está representada na figura 19.

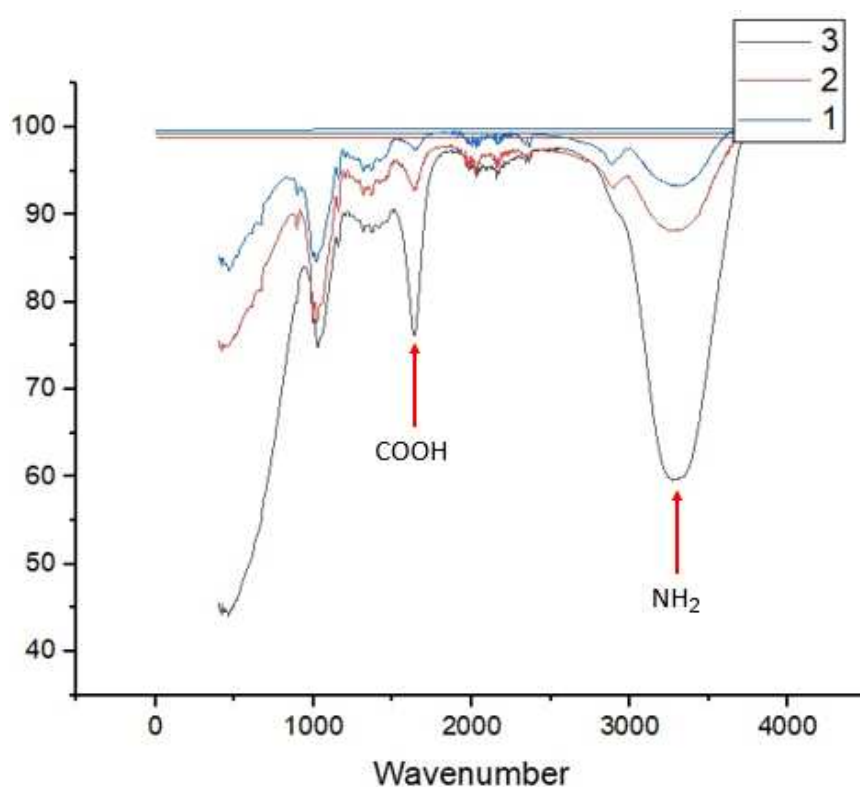


Figura 19. Análise de composição da membrana por FTIR. 1: membrana sem modificação, 2: partes mais claras, 3: partes mais escuras. COOH: grupo carboxílico. NH₂: grupo amino.

Percebe-se a eficiência na modificação da membrana de celulose pela metodologia proposta pela configuração do gráfico representado pela figura 18. As curvas 2 e 3, referentes à membrana modificada, apresentam um conteúdo de grupos carboxílico e amino maior que a membrana controle. Além disso, também se percebe que a quantidade de pasta de alginato interfere no resultado final. A membrana mais clara (2) foi impregnada com uma quantidade menor de pasta, em comparação com a membrana mais escura (3). Importante destacar que a concentração de alginato na pasta e o tempo de reação foram os mesmos, mudando apenas a quantidade total de pasta utilizada em cada ponto da membrana, justamente para avaliar a interferência desse reagente no resultado final.

Após a confirmação de modificação na membrana de celulose por FTIR, foi realizado o teste utilizando-a como membrana de remoção por adsorção no protótipo de estação de tratamento de água. A figura 20 demonstra o resultado da filtração utilizando a membrana com e sem presença de luz UV. Foi utilizada a cultura de *E. coli* isolada de intestino suíno, em concentração de 1×10^6 células.

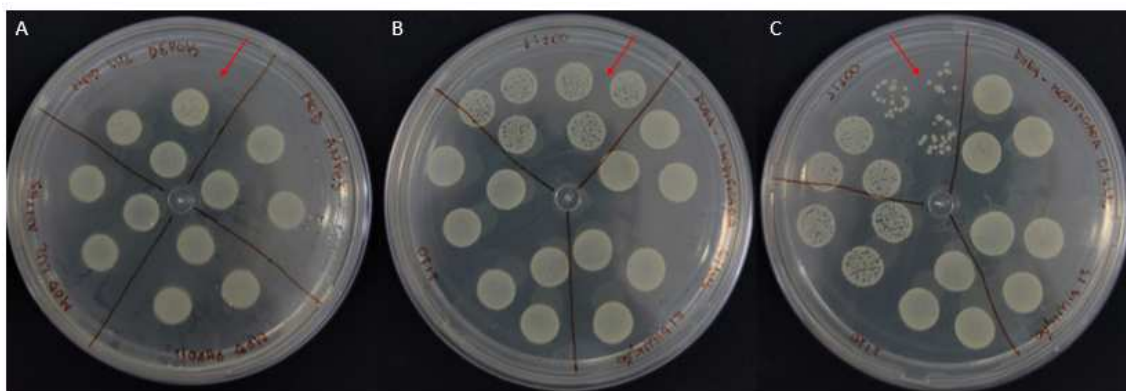


Figura 20. Análise qualitativa da eficiência da membrana modificada. A: plaqueamento da cultura antes da filtração, em diluição 1:100. B: plaqueamento da cultura depois da filtração sem luz UV, em diluição 1:100. C: plaqueamento da cultura depois da filtração com luz UV, em diluição 1:100.

A partir dos resultados dos plaqueamentos das alíquotas pré e pós filtração, consegue-se perceber uma menor concentração bacteriana após a passagem da solução contaminada pela membrana, quando comparada com a passagem pelo filtro sem a membrana. O melhor resultado foi encontrado combinando a membrana com a luz UV ligada.

A combinação da membrana modificada com a irradiação de luz ultravioleta foi importante para a diminuição de quantidade bacteriana total, porém as modificações químicas na celulose apresentam a capacidade de degradar plasmídeos (KIM et al., 2022). Pensando em resistência bacteriana a antibióticos, a degradação de plasmídeos é um mecanismo importante para a diminuição de compartilhamento horizontal desses genes de resistência dentro do ecossistema (EISENREICH et al., 2022; LARSSON; FLACH, 2022).

6.7 Identificação de bactérias de cultura isolada

Após cultura de estoques bacterianos isolados de intestino de suíno, o DNA genômico total da amostra foi extraído utilizando kit comercial e submetido a análise por PCR para identificação de patógenos presentes, utilizando os primers descritos no quadro 2. O resultado desse experimento está representado na figura 21.



Figura 21. Identificação de patógenos na cultura isolada de suínos. A: resultado positivo para *C. perfringens*. B: resultado positivo para *C. difficile*. C: resultado positivo para *E. coli*. D: resultado positivo para *S. suis*.

O resultado positivo para diversas espécies na cultura indica uma grande diversidade de patógenos hospedeiros no trato gastrointestinal suíno. Essa identificação foi importante para a análise da eficiência da membrana modificada em relação à sua capacidade de desinfecção de efluentes. Diferentes espécies bacterianas tendem a apresentar diferentes mecanismos celulares e moleculares de sobrevivência e composição em sua membrana, interferindo na eficiência da tecnologia (STUBBENDIECK; STRAIGHT, 2016).

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho explora e desenvolve duas potenciais tecnologias relacionadas ao controle de patógenos suínos. O desenvolvimento do antígeno vacinal quimérico a partir de predição de epítomos por imunoinformática apresenta grande potencial de eficácia, devido à seleção criteriosa dos peptídeos componentes do antígeno. Além de potencial de induzir resposta imunológica de memória *in vivo*, o antígeno quimérico desenvolvido apresenta facilidade de expressão em plataformas baratas, como *E. coli*, com possibilidade de escalabilidade para produção em nível industrial.

A modificação química em membrana de celulose também apresenta grande potencial de efetividade contra transmissão de genes de resistência a antibióticos no ambiente. Além disso, apresenta relativa facilidade de produção e modificação, com o adicional de ser de baixo custo, facilitando a logística de produção e utilização.

8 PERSPECTIVAS

Os próximos passos para esse trabalho são baseados na padronização da cultura *in vitro* de *Brachyspira hyodysenteriae* e em ensaio *in vivo* para avaliação da segurança e eficácia do antígeno vacinal desenvolvido. Além disso, espera-se expressar o antígeno em cepas probióticas, como a *E. coli* NISSLE, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis*. O projeto já foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV, conforme certificado presente no anexo I. Para prosseguimento do projeto, há planejada a metodologia que será utilizada para sua execução.

8.1 Metodologia

8.1.1 Aquisição dos camundongos

Para o experimento, 160 camundongos isogênicos fêmeas da linhagem BALB/c serão adquiridos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa com 3 semanas de idade (já passados os 21 dias de desmame) e transportados em veículo automotivo com velocidade controlada e equipado com ar condicionado para controle da temperatura, até o Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV. Já no Biotério Setorial, os animais permanecerão em aclimação por mais 3 semanas, onde serão separados em grupos de seis animais por gaiola (30 cm x 20 cm x 13 cm), em condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e fotoperíodo (12h claro/escuro), onde será ofertada ração comercial e água *ad libitum*.

8.1.2 Tamanho amostral

Para se obter o número de animais adequados ao desenvolvimento adequado deste projeto, o planejamento estatístico segue descrito abaixo após a seguinte fórmula:

$$N = 1 + [2C \cdot (s/d)^2].$$

Na fórmula, *s* é o desvio padrão aceitável de acordo com a projeção proposta neste projeto e *d* é a diferença esperada entre os grupos. *C* é dependente de valores escolhidos para a força ou poder do teste e deve ser previamente calculado de acordo com a fórmula:

$$C = (z\alpha + z\beta)^2$$

Considerando $p < 0,05$, o valor de $\alpha = 0,05$ (chance de considerar dois grupos diferentes quando não o são), e β equivale a chance de encontrar diferença existente em nível de significância. O índice z é definido de acordo com a tabela de probabilidade da normal z para o cálculo de intervalo de confiança.

Sendo assim, determinar o valor de $z\alpha$ deve-se dividir o valor do intervalo de confiança por 2, por exemplo, para um intervalo de 0,95 (considerado neste trabalho) o valor a ser procurado na tabela é 0,475. Na tabela, este valor correspondente a linha 1,9 e coluna 0,06, somando estes dois valores chega-se ao número 1,96 que deve ser o valor correspondente ao z aqui utilizado. É aconselhável que, os testes em experimentos da área de saúde deve ter uma força de teste considerada como 90% para o qual o valor de $z \sim$ é 1,282.

Desta maneira, aplicando estes valores na formula:

$$C = (1,96 + 1,282)^2$$

$$C = 10,51$$

Nos experimentos com animais isogênicos, o desvio máximo aceitável é de 20% (0,2) e a diferença esperada entre os grupos é de 40% (0,4). Sendo assim:

$$N = 1 + [2 * 10,51 * (0,2/0,4)^2]$$

$$N = 1 + (21,02 * 0,25)$$

$$N = 6,255 \text{ (arredondado para 7)}$$

Levando em consideração que poderá haver perda de animais, acrescenta-se 20% ao número de animais, resultando em 8 animais por grupo experimental. Como serão 20 grupos, no total, serão necessários 160 animais. Além disso, outras investigações de perfil experimental semelhante e usadas como referência neste trabalho (Crocquet-Valdes et al., 2011; Crosby et al., 2018), também desenvolveram suas pesquisas utilizando de 6 a 10 animais por grupo experimental.

8.1.3 Patógeno

O patógeno *Brachyspira hyodysenteriae* a ser utilizado neste projeto será adquirido de amostras de animais de produtores locais e cultivados no Laboratório Biotecnologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

O patógeno será cultivado em câmara de anaerobiose, em ambiente controlado sem presença de gás oxigênio, em meio de cultura e suplementação adequados com

a espécie. Além disso, todos os procedimentos de cultivo serão realizados em condições assépticas, utilizando-se capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta e material estéril e descartável. As células serão cultivadas em meio Brain-Heart Infusion (BHI), com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco, EUA) e 0,5% de anfotericina B (Yeasen, Bio, Inc., China) em frascos de cultura de tecidos T-25 cm² (Corning, EUA) incubados a 37 °C.

8.1.4 Delineamento experimental

Camundongos BALB/c fêmeas adultos (6 a 8 semanas de idade; N total de 160 animais) serão imunizados conforme um protocolo tipo dose-reforço, onde será administrado 3 doses (com uma dose inicial e dois reforços) de 100µL cada contendo salina (grupo controle 1), adjuvante apenas (controle 2) ou formulações contendo 10µg do antígeno e os adjuvantes, em intervalos de 14 dias entre as doses, por via oral. Após 14 dias da última imunização, os camundongos serão desafiados através da inoculação oral de 1×10^3 UFC de *Brachyspira hyodysenteriae* obtidos de culturas celulares.

Um total de 14 grupos (N=8 animais por grupo) serão utilizados, conforme a divisão abaixo:

Grupo 1: Controle não imunizado (salina) e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 2: Controle imunizado com PLGA e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 3: Teste imunizado com antígeno + PLGA e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 4: Controle imunizado com hidróxido de alumínio + saponina e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 5: Teste imunizado com antígeno + hidróxido de alumínio + saponina e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 6: Controle imunizado com *E. coli* NISSLE wild-type e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 7: Teste imunizado com *E. coli* NISSLE + vetor pXIES + antígeno e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 8: Teste imunizado com *E. coli* NISSLE + vetor pEXU + antígeno e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 9: Controle imunizado com *Lactococcus lactis* wild-type infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 10: Teste imunizado com *Lactococcus lactis* + vetor pXIES + antígeno e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 11: Teste imunizado com *Lactococcus lactis* + vetor pEXU + antígeno e infectado com *B. hyodysenteriae*;

Grupo 12: Controle imunizado com *Lactobacillus acidophilus* wild-type e infectado com *B. hyodysenteriae*

Grupo 13: Teste imunizado com *Lactobacillus acidophilus* + vetor pXIES + antígeno e infectado com *B. hyodysenteriae*

Grupo 14: teste imunizado com *Lactobacillus acidophilus* + vetor pEXU + proteína e infectado com *B. hyodysenteriae*

8.1.5 Coleta de sangue e eutanásia

Os camundongos serão observados diariamente para cálculo de mortalidade até duas semanas após o desafio com os patógenos. Será coletado 10 microlitros de sangue dos animais de cada grupo pelo método de sangria pela cauda, sempre que anteceder a vacinação e ao final do período experimental para obtenção de soro. Por se tratar de um experimento para investigar o potencial vacinal dos tratamentos, não será adequado o uso de barbitúricos ou outros anestésicos para a extração do sangue, visto que os mesmos podem modular a resposta imune e interferir diretamente nos resultados da pesquisa (Thompson et al., 2002; Markovic and Murasko, 1990).

A eutanásia (Resolução normativa nº37 – Diretriz para prática de Eutanásia do CONCEA – Brasília de 15 de fevereiro de 2018), será conduzida por pessoal devidamente treinado e qualificado, utilizando a técnica de inalação de CO₂ em substituição à utilização de barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis recomendados pela Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), visto que o uso destas substâncias pode interferir e/ou modular a resposta imune dos animais (Thompson et al., 2002; Markovic and Murasko, 1990). Desta forma, como o objetivo central do presente trabalho é avaliar o potencial vacinal dos tratamentos, não será adequado o uso de barbitúricos ou outros anestésicos, visto que os mesmos podem interferir nos resultados.

8.1.6 Avaliação de carga parasitária

Ao final do período experimental e após a eutanásia, amostras biológicas serão coletadas para quantificação dos patógenos por qPCR. A carga de patógeno nas fezes será realizada a partir da extração de DNA das fezes coletadas em períodos de 7 dias. Para determinar as diferenças relativas na carga patogênica entre os diferentes grupos de camundongos, aproximadamente 10 mg de baço e fígado serão coletados e homogeneizados para a extração do DNA. O DNA será extraído usando kit DNeasy (QIAGEN, Valencia, CA) com um volume de eluição de 100 µl de água deionizada e as cargas de *B. hyodysenteriae* serão determinadas usando um sistema de detecção em tempo real multicolor iCycler IQ (Bio-Rad, Hercules, CA). Os seguintes primers e sondas direcionados ao gene NOX do patógeno serão usados e incluídos: P1 (5'-AGAGGAAAGTTTTTCGCTTC-3') e P2 (15-GCACCTATGTTAAACGTCCTTG-3'). As análises de PCR serão consideradas negativas para DNA de *B. hyodysenteriae* se os valores do limite crítico (CT) excederem 40 ciclos. A carga de *B. hyodysenteriae* nos órgãos será normalizada em relação ao DNA total. Cada amostra será executada em triplicata.

8.1.7 Isolamento de esplenócitos e análise de citocinas

Após a eutanásia, o baço dos camundongos será removido assepticamente, lavado duas vezes com PBS e uma suspensão de células será obtido pela maceração do órgão em PBS seguida de filtração através e uma rede de nylon. Eritrócitos na suspensão de esplenócitos serão removidos por lise e as células remanescentes. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) também serão isoladas pelo método do Ficoll-Hypaque usando centrifugação por gradiente de densidade, seguida de lavagem e ressuspensão de 5×10^6 células/mL em meio RPMI suplementado com 5% soro bovino fetal, 50 U/mL de penicilina e 50g/mL de estreptomicina. A proliferação de esplenócitos e PBMCs será avaliado através do ensaio colorimétrico de MTT utilizando a proteína quimérica, antígeno bruto dos patógenos, o mitógeno PHA-L (controle positivo) e meio (controle negativo) como estímulo.

O sobrenadante das culturas estimuladas serão coletados e utilizados para mensuração de citocinas INF- γ , IL-4 e IL-10, utilizando-se kit comercial, conforme instruções do fabricante. O anticorpo de captura proveniente do kit, será diluído para 4 µg/mL em PBS e distribuídos em microplaca de 96 poços. Após incubada em

temperatura ambiente e overnight, a placa será lavada 3 vezes com 0,05% Tween 20 em PBS e bloqueada com 300 µL de PBS 1% BSA, com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Após bloqueio, as placas serão lavadas uma vez e será adicionado 50 µL do sobrenadante das culturas, do padrão e do meio. As placas serão incubadas overnight a 4 °C e lavadas 3 vezes novamente. Será adicionado 100 µL do anticorpo de detecção na concentração de 400 ng/mL, incubando-as por 2 horas. Após este período, as placas serão lavadas 3 vezes e será adicionada 100 µL de streptavidina (diluição 1:200) com incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Após os poços serem lavados, será adicionado 100 µL da solução do substrato (10 mL de tampão citrato-fosfato + 15 mg de OPD + 4 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)). Após incubação por 20 minutos será adicionado 30 µL da solução de parada (ácido sulfúrico 0,5M). Será feita leitura das absorbâncias em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 495 nm.

8.1.8 Análise estatística

Para detectar diferença entre grupos de dados, inicialmente será realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Sminov com valor *P* corrigido pelo método de Dallal-Wilkinson-Lilliefor individualmente em todos os conjuntos de dados. Para comparar dois grupos, será realizado t-teste não pareado quando os dados apresentarem distribuição normal ou o teste Mann-Whitney para dados que não seguem uma distribuição normal. Comparação de frequência entre dois grupos será realizado utilizando o teste qui-quadrado. Para comparação entre três ou mais grupos será utilizado ANOVA quando os dados apresentarem distribuição gaussiana e quando os dados forem não paramétricos, será utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido de Tukey. Como diferentes hipóteses serão levantadas e testadas utilizando o mesmo conjunto de dados será utilizado a correção de Bonferroni como teste de múltiplas hipóteses. Será considerado significativo diferenças de valor *P* entre 0,05 e 0,01, como muito significativo entre 0,01 e 0,001 e extremamente significativo para valores *p* menor que 0,001.

9 REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; COLLIGNON, P. **Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies. Expert Review of Anti-Infective Therapy**Expert Reviews Ltd., , 2008.
- AGGA, G. E. et al. Lagoon, Anaerobic Digestion, and Composting of Animal Manure Treatments Impact on Tetracycline Resistance Genes. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2022.
- AIMAN, S. et al. Multi-epitope chimeric vaccine design against emerging Monkeypox virus via reverse vaccinology techniques- a bioinformatics and immunoinformatics approach. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 25 ago. 2022.
- AKIBA, M.; KUSUMOTO, M.; IWATA, T. Rapid identification of Salmonella enterica serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 1, p. 9–15, abr. 2011.
- ALLAHYARI, M.; MOHIT, E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 806–828, 3 mar. 2016.
- ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Swine dysentery: Aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 5, p. 1927–1947, 2013.
- AMIN, M. K.; BOATENG, J. Surface functionalization of PLGA nanoparticles for potential oral vaccine delivery targeting intestinal immune cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 222, 1 fev. 2023.
- ANUGRAHA, G. et al. Chimeric Epitope Vaccine from Multistage Antigens for Lymphatic Filariasis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 82, n. 4, p. 380–389, 1 out. 2015.
- ARAI, S. et al. Assessment of pig saliva as a streptococcus suis reservoir and potential source of infection on farms by use of a novel quantitative polymerase Chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 9, p. 941–948, 1 set. 2018.
- BRISSE, M. et al. Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 583077, 30 set. 2020.
- BURROUGH, E. R. Swine Dysentery: Etiopathogenesis and Diagnosis of a Reemerging Disease. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 1, p. 22–31, 1 jan. 2017.
- CEBALLOS-ALCANTARILLA, E.; MERKX, M. Understanding and applications of Ser/Gly linkers in protein engineering. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2021. v. 647p. 1–22.

CHEN, S. et al. Precision-engineering of subunit vaccine particles for prevention of infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 3 fev. 2023.

CLIFFORD, J. N. et al. BepiPred-3.0: Improved B-cell epitope prediction using protein language models. **Protein Science**, v. 31, n. 12, 1 dez. 2022.

COSTA, M. O. et al. Infection of porcine colon explants with “*Brachyspira hampsonii*” leads to increased epithelial necrosis and catarrhal exudate. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 3, 1 abr. 2017.

CREIGHTON, R. L.; WOODROW, K. A. Microneedle-Mediated Vaccine Delivery to the Oral Mucosa. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 4, 21 fev. 2019.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DE BRITO, R. C. F. et al. Peptide vaccines for leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1043, 11 maio 2018.

DESROSIERS, R. **Transmission of swine pathogens: different means, different needs. Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, jun. 2011.

DIAZ-SAN SEGUNDO, F. et al. Foot-and-mouth disease vaccines. **Veterinary Microbiology**, v. 206, p. 102–112, 1 jul. 2017.

DING, D.; ZHU, Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. **Materials Science and Engineering C**, v. 92, p. 1041–1060, 1 nov. 2018.

DUMONCEAUX, T. J. et al. Enumeration of specific bacterial populations in complex intestinal communities using quantitative PCR based on the chaperonin-60 target. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 1, p. 46–62, 2006.

EISENREICH, W. et al. Link Between Antibiotic Persistence and Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 19 jul. 2022.

ERTAS, Y.; UYAR, T. Fabrication of cellulose acetate/polybenzoxazine cross-linked electrospun nanofibrous membrane for water treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, p. 378–387, 1 dez. 2017.

FAVARO, M. T. DE P. et al. Recombinant vaccines in 2022: a perspective from the cell factory. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2022.

FIGUEREDO, M. et al. Photocatalytic ozonation in water treatment: Is there really a synergy between systems? **Water Research**, v. 206, 1 nov. 2021.

FRANCIS, M. J. Recent Advances in Vaccine Technologies. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 48, n. 2, p. 231–241, 1 mar. 2018.

GU, P. et al. Polyethylenimine-coated PLGA nanoparticles-encapsulated *Angelica sinensis* polysaccharide as an adjuvant to enhance immune responses. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, 1 nov. 2019.

GU, P. et al. Polyethylenimine-coated PLGA nanoparticles-encapsulated Angelica sinensis polysaccharide as an adjuvant for H9N2 vaccine to improve immune responses in chickens compared to Alum and oil-based adjuvants. **Veterinary Microbiology**, v. 251, 1 dez. 2020.

HAMPSON, D. J.; LA, T.; PHILLIPS, N. D. Emergence of Brachyspira species and strains: Reinforcing the need for surveillance. **Porcine Health Management**, v. 1, n. 8, p. 1–6, 12 jun. 2015.

HOLDEN, J.; COLOE, P. J.; SMOOKER, P. M. An evaluation of the immunogenicity and protective responses to Brachyspira hyodysenteriae recombinant SmpB vaccination. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 3–4, p. 354–363, 30 abr. 2008.

HOVIND-HOUGEN, K. et al. Intestinal Spirochetosis: Morphological Characterization and Cultivation of the Spirochete Brachyspira aalborgi gen. nov., sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1127–1136, dez. 1982.

HUA, Y. et al. Poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere production based on quality by design: a review. **Drug Delivery**, v. 28, n. 1, p. 1342–1355, 2021.

HUEMER, M. et al. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, 3 dez. 2020.

HUNTER, M. et al. Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. **Current Protocols in Protein Science**, v. 95, n. 1, 1 fev. 2019.

JACOBS, A. A. C. et al. Efficacy of a novel inactivated Lawsonia intracellularis vaccine in pigs against experimental infection and under field conditions. **Vaccine**, v. 37, n. 15, p. 2149–2157, 3 abr. 2019.

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

JIANG, H.; ADAMS, C. Treatability of chloro-s-triazines by conventional drinking water treatment technologies. **Water Research**, v. 40, n. 8, p. 1657–1667, 2006.

JOERLING, J. et al. Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence gene profiles of Brachyspira hyodysenteriae isolates from pigs in Germany. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2018.

JOERLING, J. et al. Differential expression of hemolysin genes in weakly and strongly hemolytic Brachyspira hyodysenteriae strains. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, 29 maio 2020.

KARBALAEI, M.; REZAEE, S. A.; FARSIANI, H. Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867–5881, 1 set. 2020.

KARCH, C. P.; BURKHARD, P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. **Biochemical Pharmacology**, v. 120, p. 1–14, 15 nov. 2016.

KAUR, M. et al. Rabies vaccines: Where do we stand, where are we heading? **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 3, p. 369–381, 1 mar. 2015.

KIM, S. et al. Review of adsorption–membrane hybrid systems for water and wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 286, 1 jan. 2022.

LA, T. et al. Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1–2, p. 97–109, 19 ago. 2004.

LA, T. et al. Comparison of *brachyspira hyodysenteriae* isolates recovered from pigs in apparently healthy multiplier herds with isolates from herds with swine dysentery. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2016.

LA, T. et al. An atypical weakly haemolytic strain of *Brachyspira hyodysenteriae* is avirulent and can be used to protect pigs from developing swine dysentery. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, 19 jun. 2019.

LA, T.; HAMPSON, D. J. Serologic detection of *Brachyspira* (Serpulina) *hyodysenteriae* infections. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 1, p. 45–52, jun. 2001.

LARSSON, D. G. J.; FLACH, C. F. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 257–269, 1 maio 2022.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial Agents Associated with Waterborne Diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 371–409, 2002.

LEE, B. J. et al. Identification of the gene encoding BmpB, a 30 kDa outer envelope lipoprotein of *Brachyspira* (Serpulina) *hyodysenteriae*, and immunogenicity of recombinant BmpB in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p. 245–257, 2000.

LI, X. et al. Evaluation survey of microbial disinfection methods in UV-LED water treatment systems. **Science of the Total Environment**, v. 659, p. 1415–1427, 1 abr. 2019.

LIN, X. et al. Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in Guinea pigs. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, 14 out. 2016.

LIU, G. et al. Nanotechnology-empowered vaccine delivery for enhancing CD8⁺ T cells-mediated cellular immunity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 176, p. 1–20, 1 set. 2021.

MARTHALER, D. et al. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. **Journal of Virological Methods**, v. 209, p. 30–34, 4 set. 2014.

MINOR, P. D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. **Virology**, 1 maio 2015.

- MUTTERS, R. et al. Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Hospital Infection**, v. 71, n. 1, p. 43–48, jan. 2009.
- NGUYEN, D. T. et al. Evaluation of synthetic infection-enhancing lipopeptides as adjuvants for a live-attenuated canine distemper virus vaccine administered intranasally to ferrets. **Vaccine**, v. 30, n. 34, p. 5073–5080, 20 jul. 2012.
- PARRA-AGUIRRE, J. et al. Experimental natural transmission (seeder pig) models for reproduction of swine dysentery. **PLoS ONE**, v. 17, n. 9 September, p. 1–16, 1 set. 2022.
- QUINTANA-HAYASHI, M. P. et al. Porcine intestinal glycosphingolipids recognized by *Brachyspira hyodysenteriae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 175, 1 fev. 2023.
- RAUCH, S. et al. New vaccine technologies to combat outbreak situations. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. SEP, 19 set. 2018.
- REYNISSON, B. et al. Improved Prediction of MHC II Antigen Presentation through Integration and Motif Deconvolution of Mass Spectrometry MHC Eluted Ligand Data. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 6, p. 2304–2315, 5 jun. 2020.
- RUBIN, J. E. et al. Reproduction of Mucohaemorrhagic Diarrhea and Colitis Indistinguishable from Swine Dysentery following Experimental Inoculation with “*Brachyspira hampsonii*” Strain 30446. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 27 fev. 2013.
- RUGNA, G. et al. Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003-2012. **Veterinary Journal**, v. 203, n. 1, p. 115–119, 1 jan. 2015.
- SAEKI, E. K. et al. Multiplex PCR (mPCR) for the Detection of *Salmonella* spp. and the Differentiation of the Typhimurium and Enteritidis Serovars in Chicken Meat. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 1, p. 25–29, fev. 2013.
- SAJID, M. et al. Layered double hydroxide-modified membranes for water treatment: Recent advances and prospects. **Chemosphere**, v. 287, 1 jan. 2022.
- SARTI, F. et al. In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A. **Biomaterials**, v. 32, n. 16, p. 4052–4057, jun. 2011.
- SATO, J. P. H. et al. Diversity and potential genetic relationships amongst Brazilian *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from cases of swine dysentery. **Veterinary Microbiology**, v. 266, 2022.
- SHIPUNOVA, V. O. et al. Plga nanoparticles decorated with anti-her2 affibody for targeted delivery and photoinduced cell death. **Molecules**, v. 26, n. 13, 1 jul. 2021.
- SOAVE, O.; BRAND, D. Coprophagy in animals: a review. **The Cornell Veterinarian**, v. 81, p. 357–364, 1991.
- SONG, Y. et al. A reverse vaccinology approach to swine dysentery vaccine development. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1–2, p. 111–119, 28 maio 2009.

STRANZL, T. et al. NetCTLpan: Pan-specific MHC class I pathway epitope predictions. **Immunogenetics**, v. 62, n. 6, p. 357–368, jun. 2010.

STUBBENDIECK, R. M.; STRAIGHT, P. D. Multifaceted interfaces of bacterial competition. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 16, p. 2145–2155, 2016.

STUBBERFIELD, E. et al. Whole-Genome Sequencing of *Brachyspira hyodysenteriae* Isolates From England and Wales Reveals Similarities to European Isolates and Mutations Associated With Reduced Sensitivity to Antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 31 ago. 2021.

SULTAN, I. et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2066, 21 set. 2018.

SUN, N. et al. Matriline exhibits antiviral activity in a PRRSV/PCV2 co-infected mouse model. **Phytomedicine**, v. 77, 1 out. 2020.

VANDERWAAL, K.; DEEN, J. Global trends in infectious diseases of swine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 45, p. 11495–11500, 6 nov. 2018.

VELA RAMIREZ, J. E.; SHARPE, L. A.; PEPPAS, N. A. Current state and challenges in developing oral vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 114, p. 116–131, 15 maio 2017.

VERCH, T.; TRAUSCH, J. J.; SHANK-RETZLAFF, M. Principles of vaccine potency assays. **Bioanalysis**, v. 10, n. 3, p. 163–180, 1 fev. 2018.

WALKER, D. I. et al. A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. **Water Research**, v. 126, p. 101–110, 2017.

WANG, W. et al. Two-sided surface oxidized cellulose membranes modified with PEI: Preparation, characterization and application for dyes removal. **Polymers**, v. 9, n. 9, p. 455, 16 set. 2017.

WANG, W. et al. Improved oral delivery of insulin by PLGA nanoparticles coated with 5 β -cholanic acid conjugated glycol chitosan. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 16, n. 6, 1 nov. 2021.

WATTANAPHANSACK, S. et al. Development of a polymerase chain reaction assay for quantification of *Lawsonia intracellularis*. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, p. 598–602, 2010.

WITCHELL, T. D. et al. The major surface Vsp proteins of *Brachyspira hyodysenteriae* form antigenic protein complexes. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1–2, p. 157–162, 21 abr. 2011.

ZEEH, F.; VIDONDO, B.; NATHUES, H. Risk factors for the infection with *Brachyspira hyodysenteriae* in pig herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 174, 1 jan. 2020.

ZHANG, L.; WANG, W.; WANG, S. Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 11, p. 1509–1523, 2 nov. 2015.

ZHENG, Z. et al. Noninvasive vaccination against infectious diseases. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 14, n. 7, p. 1717–1733, 3 jul. 2018.

10 ANEXO I

	ANEXO 7 FLUXO PARA AVALIAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA CEUA-ANIMALNUTRI	
	ÁREA: CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais	
PROCEDIMENTO	CÓDIGO: POP-CEUA-001/007	VERSÃO: 00
OPERACIONAL PADRÃO	DATA EMISSÃO: 26/07/2022	DATA VALIDADE: 26/07/2024

CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Ensaio piloto para padronização de modelo de infecção experimental em suínos", registrada com o nº **CEUA-Animalnutri 004/23**, sob a responsabilidade de César Augusto Pospissil Garbosa - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-Animalnutri) DA ANIMAL NUTRI CONSULTORIA EM NUTRIÇÃO ANIMAL LTDA ME, em **03/04/2023** e, sua Emenda ao protocolo de estudo em **14/04/2023**.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa
Vigência da Autorização	2 meses
Espécie/Linhagem/Raça	Suínos (<i>Sus domesticus</i>)
Nº de Animais	10
Peso/Idade	6kg/21 dias
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Recanto/Patos de Minas - MG

Patos de Minas, 14 de abril de 2023.


 Lidia Marinho Silva Lima
 Coordenadora da CEUA-Animalnutri

11 ANEXO II


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
Campus Universitário – Viçosa, MG, Brasil, 36570-900 – Telefone: (31) 3612-2315

Viçosa, 19 de dezembro de 2022

Prof.
 Tiago Antônio de Oliveira Mendes
 Coordenador do projeto
 DBB/UFV

Sr. Coordenador,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado “Desenvolvimento de uma proteína quimera para uso como antígeno vacinal contra diarreia aguda e crônica em suínos”, aqui nomeado Processo 40/2022, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, tendo como base para análise a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTIC, bem como a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTIC.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

- 1 Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV;
- 2 Metodologia completa obrigatoriamente com:
 - Local (is) Geral (is) e específico (s) oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
 - O nome científico do animal em questão;
 - Número total de animais utilizados na pesquisa.
- 3 Resultados;
- 4 Nome do Coordenador do Projeto:
Assinatura:
- 5 Nome do Responsável Técnico:
Assinatura:
Inscrição em CRMV


 Prof. Fabrício Luciani Valente
 Coordenador
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Campus Universitário – Viçosa, MG, Brasil, 36570-900 – Telefone: (31) 3612-2313

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Desenvolvimento de uma proteína quimera para uso como antígeno vacinal contra diarreia aguda e crônica em suínos”, registrada com o nº 40/2022, sob a responsabilidade do Professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08/10/2008, do Decreto nº 6.899, de 15/07/2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, em 19/12/2022. Após a conclusão do projeto, o relatório final deverá ser submetido à CEUA para emissão de certificado definitivo.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	3 anos
Espécie/linhagem/raça	Camundongo - Balb/c
Nº de animais/sexo	160 fêmeas
Peso/Idade	20 g/6 a 8 semanas
Origem	Biotério Central da UFV

CERTIFICATE

We certify that the proposition entitled “Development of a chimera protein for use as a vaccine antigen against acute and chronic diarrhea in swine”, registered with the number 40/2022, under the responsibility of Professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes from the Department Biochemistry and Molecular Biology is in accordance with the precepts of Law 11,7794, of 10/08/2008, Decree 6,899, of 07/15/2009, and the rules issued by Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, and was approved by the Ethics Committee in the Use of Animals (CEUA) of Universidade Federal de Viçosa, on 12/19/2022. Upon completion of the project, the final report must be submitted to CEUA for the issuance of the definitive certificate.

Purpose	Research
Validity of authorization	3 years
Species/Linseage/Breed	Mouse - Balb/c
Number of animals/Sex	160 female
Weight/Age	20 g/6 a 8 weeks
Origin	UFV central vivarium


Fabricio Luciani Valente

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV