

**FABRICIA MODOLO GIRARDI**

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA  
DETECÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA CANINA COM USO DE PROTEÍNA  
RECOMBINANTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

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

T

G521d  
2021  
Girardi, Fabricia Modolo, 1984-  
Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) para  
detecção da proteína C reativa canina com uso de proteína  
recombinante / Fabricia Modolo Girardi. – Viçosa, MG, 2021.  
1 tese eletrônica (78 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Veterinária, 2021.

Referências bibliográficas: f.64-78.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.052>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Proteínas de Fase Aguda. 2. Inflamação - Tratamento. 3.  
*Escherichia coli*. 4. Expressão Gênica. 5. Plasmídeos. I. Vilorio,  
Marlene Isabel Vargas, 1949-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.708960473

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

**FABRICIA MODOLO GIRARDI**

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA  
DETECÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA CANINA COM USO DE PROTEÍNA  
RECOMBINANTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 11 de novembro de 2021

Assentimento:



---

Fabricia Modolo Girardi  
Autora



---

Marlene Isabel Vargas Vitoria  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grata pela força da fé que minha família me deu para ultrapassar os momentos difíceis.

À Professora Marlene Isabel Vargas Vilorio pela orientação.

Agradeço ao professor Leandro Licursi de Oliveira pela colaboração indispensável.

Aos Professores Evandro Silva Favarato, Fabrício Luciani Valente e Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo por aceitarem contribuir para esse trabalho sendo membros da banca de defesa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e ao Departamento de Veterinária, por permitir e disponibilizar toda a estrutura para minha formação acadêmica.

À Rosi pela paciência e atenção.

Agradeço ao Laboratório de Imunobiológicos do DVT, em especial ao Marcus Rebouças por sua dedicação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL) da Universidade Federal de Viçosa.

Aos meus amigos do laboratório, em particular à Pollyanna por ter ajudado na minha ausência e todas as pessoas que me ajudaram no trabalho, por toda a descontração e por me incentivarem a não desistir.

Aos professores que transmitiram em suas aulas seus conhecimentos e que me iluminaram com novas ideias.

Aos autores dos livros e artigos que sendo citados ou não, me direcionaram na pesquisa e na escrita da tese.

Agradeço ao meu marido Leandro Abreu da Fonseca pelo carinho e companheirismo.

## RESUMO

GIRARDI, Fabricia Modolo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2021. **Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da proteína C reativa canina com uso de proteína recombinante.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio.

No cão, a proteína C reativa (PCR) é a proteína de fase aguda de maior destaque, com a capacidade de apresentar valores basais baixos em animais saudáveis e nas comorbidades podem sofrer elevação alcançando pico em 24 a 48 horas após o insulto, normalizando em 2 a 3 semanas após a recuperação. O termo proteína C reativa foi dado em 1930 pela capacidade de precipitar polissacarídeo C de *S. pneumoniae*, já o isolamento e caracterização da PCR canina se deu em 1984. Uma vez que o estudo da PCR canina tem tido muito destaque em diversas enfermidades inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi expressar a proteína recombinante (PCR\_dog vetor PET 14b) através de extratos de *Escherichia coli* - Rosetta (DE3) - plasmídeo pRARE e desenvolver o ensaio imunoenzimático (ELISA) no formato sanduíche para monitoramento de quadros inflamatórios em cães. A expressão foi controlada com a técnica do SDS-PAGE e espectrometria de massa onde foi observado uma proteína com peso de 25 kDa correspondente ao peso da PCR canina e a confirmação com caracterização estrutural respectivamente; o Western Blot verificou a reatividade contra a PCR canina. O ensaio ELISA piloto foi executado com 6 amostras de soro de cães, sendo duas amostras como controle (animais hígidos) e quatro como testes (animais enfermos). Para diluição e padronização da curva, foi utilizada a proteína recombinante PCR\_dog vetor pET 14b expressa em cepas de bactérias *Escherichia coli* - Rosetta™ (DE3) - plasmídeo pRARE. Também, para produção de IgGs, coelhos e camundongos foram imunizados com a PCR\_dog vetor PET 14b expressa, e para a verificação do reconhecimento dos anticorpos contra a proteína de fase aguda biológica, o Western Blot foi feito. Os resultados apresentados neste trabalho são promissores e para o futuro, a utilização das proteínas de fase aguda pode ser considerada uma das ferramentas laboratoriais mais promissoras na medicina veterinária, porém são necessárias melhorias no sistema de expressão e o aperfeiçoamento do ensaio ELISA para futura validação à campo.

Palavras-chave: Proteínas de fase aguda. Inflamação. *Escherichia coli*. Expressão gênica. Plamídeo.

## ABSTRACT

GIRARDI, Fabricia Modolo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November 2021. **Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of canine C-reactive protein using recombinant protein.** Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilorio.

In dogs, C-reactive protein (CRP) is the major acute-phase protein, with the ability to present decreased values in healthy animals and in comorbidities they may increase, reaching a peak within 24 to 48 hours after the insult, normalizing in 2 to 3 weeks after recovery. The term C-reactive protein was given by the ability to precipitate polysaccharide C from *S. pneumoniae* in 1930, whereas the isolation and characterization of canine CRP took place in 1984. Since, the study of canine CRP has been very prominent in several inflammatory diseases. The objective of this work was to express the recombinant protein (CRP\_dog vector PET 14b) through extracts of *Escherichia coli* - Rosetta (DE3) - plasmid pRARE and carry out the procedures for the development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich format for monitoring inflammatory conditions in dogs. The expression was controlled with the technique of SDS-PAGE and mass spectrometry, where a protein with a weight of 25 kDa corresponding to the weight of the canine CRP was observed and confirmation with structural characterization, respectively; Western Blotting verified reactivity against canine CRP. The pilot ELISA assay was performed with 6 samples of serum from dogs, two samples as controls (healthy animals) and four as tests (sick animals). For dilution and standardization of the curve, the recombinant protein CRP\_dog vector pET 14b expressed in bacterial strains *Escherichia coli* - Rosetta™ (DE3) - plasmid pRARE was used. Also, for the production of IgGs, rabbits and mice were immunized with the CRP\_dog vector PET 14b expressed, and to verify the recognition of antibodies against the biological acute phase protein, Western Blotting was performed. The results presented in this work are promising and for the future, the use of acute phase proteins can be considered one of the most promising laboratory tools in veterinary medicine, but it is necessary to improve the expression system and improve the ELISA assay for future validation of field.

Keywords: Acute phase proteins. Inflammation. *Escherichia coli*. gene expression. plasmid.

## LISTA DE ABREVIATURAS

C3	Complemento 3
C1	Complemento 1
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ICAM-1	Proteína de adesão intercelular 1
VCAM-1	Molécula de adesão de células vasculares 1
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
gp-130	Glicoproteína transdutora 130
STAT3	Signal transducers and activators of transcription
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
IFN- $\gamma$	Interferon gama
TGF-2	Fator de crescimento transformador tipo 2
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-1r	Receptor da interleucina 1
IL-1Ra	Antagonista do receptor da interleucina 1
IL-6r	Receptor da interleucina 6
IL-6Ra	Antagonista do receptor da interleucina 6
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alpha
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral beta
sTNF-R1	Antagonista do receptor do fator de necrose tumoral solúvel tipo 1
sTNF-R	Receptor do fator de necrose tumoral solúvel
SRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TLR4	Receptores <i>toll like</i> 4
kDa	Quilodáltons

LPS	Lipopolissacarídeos
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
°C	Graus Celsius
PCR	Proteína C Reativa
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamina contendo dodecil sulfato de sódio
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
FcγR	Receptores de Fc-gama de ligação a IgG
FcγR I/II	Receptores de Fc-gama de ligação a IgG tipo 1 e tipo 2
HNFs	Fatores nucleares de hepatócitos
C/EBPs	Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT
CCAAT	Citosina -cytosine- adenosina -adenosine- timidina
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Danos
PAMP	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema demonstrativo da resposta de fase aguda.....	17
Figura 2 - Infecção bacteriana, as células imunes expressam citocinas para estimular os hepatócitos a produzir proteínas. As citocinas ativam os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e STAT3. Junto com os fatores de transcrição HNFs e C/EBPs, para a produção de proteínas ativas e coadjuvantes da resposta imune inata. ....	18
Figura 3 - Cinética da resposta à inflamação.....	22
Figura 4 - Representação do tipo Ribbon da estrutura 3D da PCR.....	28
Figura 5 - Predição da estrutura 3D da PCR: (A) destaca as regiões Asp112, local de reconhecimento de C1q do sistema complemento; (B) demonstram os sítios de ligação, marcações azuis com carga positiva; vermelhas com carga negativa; (C) ligação da fosfocolina à proteína C reativa.....	28
Figura 6 - Esquema da ligação dupla da PCR com a camada bilipídica de microrganismos invasores e ativação do complemento.....	29
Figura 7 - Western Blotting específico de PCR canino - hérnia de disco, epilepsia, doença renal crônica, histiocitoma, dilatação gástrica-vólvulo, pneumonia (PCR destacada), anemia hemolítica imunomediada, sepse.....	38
Figura 8 - Mapa esquemático do plasmídeo pET.....	43
Figura 9 - Desenho esquemático do plasmídeo para expressão da proteína recombinante PCR canina.....	44
Figura 10 - Sequência de aminoácidos da PCR recombinante canina.....	44
Figura 11 - SDS-PAGE realizado para separar as proteínas de acordo com o peso molecular.....	46
Figura 12 - Equipamento de cromatografia líquida (FPLC) utilizado para purificação da proteína no experimento (ÄKTA pure, GE Healthcare).....	48
Figura 13 - Imunização dos coelhos no biotério.....	49
Figura 14 - Eletroforese de proteína para PCR canina. SDS-PAGE (15%), evidenciando a PCR a altura de 25 KDa.....	58

Figura 15 - Anticorpos de coelhos e camundongos demonstrando afinidade com as duas isoformas da PCR nos soros dos animais..... 58

Figura 16 - Produção da curva padrão com anticorpos policlonais anti-PCR. A linearidade da faixa da curva corresponde a concentração de proteína, garantindo a sensibilidade de mensuração constante. Análise de regressão  $R^2$ : 0,9934 indica que as absorbâncias são compatíveis com as concentrações proteicas..... 59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais proteínas dos animais domésticos e suas funções.....	24
Tabela 2 - Proteínas de fase aguda principais e moderadas que respondem a estímulos inflamatórios comumente em animais domésticos.....	25
Tabela 3 - Representação de enfermidades elevações significativas nas concentrações séricas de proteína C reativa (PCR).....	31
Tabela 4 - Enfermidades de cães responsivas às proteínas de fase aguda..	38
Tabela 5 - Resultado do ensaio piloto (ELISA) após a confecção da curva padrão.....	60

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Resposta imune inata e a relação com a resposta de fase aguda.....	16
2.2. Papel das citocinas na produção de proteínas de fase aguda.....	17
2.3. Resposta de fase aguda e Proteínas inflamatórias de fase aguda.....	20
2.4. Proteína C reativa em cães.....	26
2.4.1. Valores para algumas enfermidades.....	30
2.4.2. Enfermidades de curso crônico.....	31
2.4.3. Enfermidades de curso agudo.....	36
2.5. Métodos de diagnóstico e quantificação da proteína C reativa.....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo geral.....	41
3.1. Objetivos específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. Comitê de Ética.....	42
4.2. Obtenção do plasmídeo.....	42
4.3. Preparação de células competentes.....	45
4.4. Transformação de células competentes.....	45
4.5. Protocolo de indução e expressão proteica.....	45
4.6. SDS-PAGE.....	46
4.7. Protocolo Western Blotting e espectrometria de massa.....	46
4.8. Purificação pelo sistema de cromatografia líquida (FPLC) .....	47
4.9. Imunização de coelhos e camundongos para produção de anticorpos.....	48
4.10. Protocolo Western Blot.....	49
4.11. Etapas pré ELISA e Curva Padrão.....	50
4.12. ELISA Piloto.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. Expressão da proteína.....	52
5.2. SDS-PAGE e Western blot.....	57

5.3. Curva Padrão do ELISA e ensaio piloto – PCR Canina.....	59
6. CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

## 1. INTRODUÇÃO

A proteína C reativa (PCR) pertence a família das pentraxinas e foi descoberta em 1930 por Tillet e Francis, sendo a primeira proteína de fase aguda (PFA) descoberta e uma das proteínas mais pesquisadas (CERÓN et al., 2005). No homem, é um dos biomarcadores mais expressivos associados a diversos processos inflamatórios, possui uma multiplicidade de funções metabólicas, sendo sintetizada principalmente pelo fígado por indução da IL-6, TNF alfa e IL-1 (CRAY, 2012). Cães domésticos saudáveis apresentam valores de PCR inferiores a 5 mg/L (CASPI et al., 1984), podendo crescer em enfermos rapidamente de <1 mg/L para > 100 mg/L, sendo a principal proteína de fase aguda para a espécie e utilizada para fins de diagnóstico e principalmente prognóstico (ECKERSALL e BELL, 2010). Embora os mecanismos fisiopatológicos envolvendo estas proteínas sejam conhecidos, ainda há desafios, como a padronização de técnicas e desenvolvimento de testes acessíveis, tornando possível aplicá-las na rotina como biomarcadores de infecção, inflamação, neoplasias, entre outras enfermidades (CERÓN et al., 2005; CRAY et al., 2009; ECKERSALL e BELL, 2010). Nesse sentido, o emprego de vetores bacterianos de expressão, como os vetores pET para *Escherichia coli* para produção de proteínas heterólogas (a exemplo da PCR) asseguram menor custo, controle e segurança, garantindo quantidade e qualidade do produto, o que é de grande importância para fins de pesquisa e uso comercial (RIPATHI et al., 2019). Porém a aplicação desses sistemas normalmente requerem intenso aperfeiçoamento, principalmente para a expressão de proteínas novas (códon raros). Uma das finalidades desse processo é a obtenção da PCR canina para ensaios de monitoramento inflamatório, como o ELISA semi-quantitativo, que já é realidade principalmente para a proteína amiloide sérica A na medicina equina e para a PCR canina nos países desenvolvidos (ECKERSALL e BELL, 2010), diferente da realidade brasileira. Por fim, torna-se necessário desenvolver e validar uma metodologia própria para utilização da PCR canina na rotina clínica e que seja acessível. Assim, este trabalho teve como objetivo expressar a proteína recombinante PCR\_dog vetor PET 14b e produzir um imunógeno a partir dessa proteína recombinante purificada para produção de anticorpos anti-PCR canina. Estes anticorpos foram utilizados para desenvolver uma curva padrão e

futuramente padronizar o teste de ELISA para proteína C reativa canina, para uso no monitoramento de quadros inflamatórios.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Resposta imune inata e a relação com a resposta de fase aguda

A imunidade inata é um componente evolutivo inespecífico que envolve um conjunto de mecanismos de defesa do organismo capazes de impedir ou sinalizar para o sistema imune adaptativo sobre intercorrências na homeostase. É composto por estruturas anatômicas e fisiológicas (mucosas, cílios, pele, pH e temperatura), barreiras fagocíticas de tecido composto por células sentinelas (dendríticas e macrófagos), leucócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos) e demais mecanismos inflamatórios como fatores solúveis (citocinas e quimiocinas, receptores de reconhecimento padrão tipo *Toll-like* e *Nod-like*, interferons, sistema complemento e proteínas de fase aguda) (YOO e DESIDERIO, 2003). A imunidade adaptativa é referida às imunoglobulinas e linfócitos B e T (YOO e DESIDERIO, 2003, WON et al., 2020).

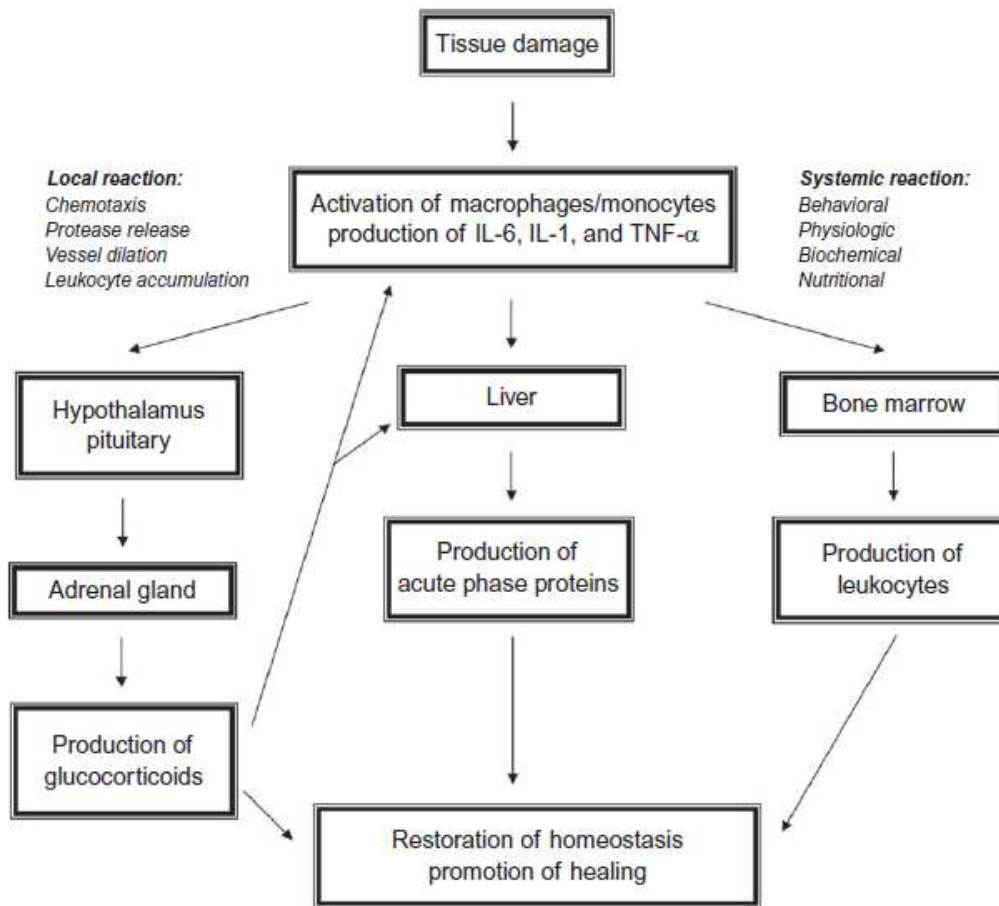
Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs), como os lipopolissacarídeos são reconhecidos pelos receptores de membrana tipo *Toll* mais especificamente o TLR-4, presentes nos monócitos, macrófagos e células dendríticas; estes expressam interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6), que induzem a expressão de genes de proteínas de fase aguda em hepatócitos (BARTON et al; 2002, DE BUCK et al., 2006). Os Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMP), que representam os debrís celulares também são reconhecidos, principalmente estruturas nucleares.

Histologicamente, os hepatócitos representam 80% das células hepáticas e possuem grande importância na mediação inflamatória, sintetizam uma grande quantidade de proteínas relacionadas à imunidade inata, participando ativamente do sistema imunológico do hospedeiro (KMIEC, 2001, ZHOU et al., 2016 ).

Já as células de Kupffer, constituem 80 a 90% dos macrófagos, totalizando 15% do total de células do parênquima hepático, distinguidos como macrófagos

ativados (fenótipo M1), pró-inflamatórios com grande capacidade de produção de citocinas e os chamados alternativamente ativados (fenótipo M2), com atividade anti-inflamatórias. Grande parte de sua população se encontra nas regiões estratégicas periportais, juntamente com os diferentes fenótipos de linfócitos e as células endoteliais dos sinusóides, trabalham mediando e amplificando a resposta de fase aguda de forma mais rápida (CAI et al., 2019). Também, o fluxo sanguíneo hepático é distinto dos demais órgãos, por receber o influxo vindo do baço e intestino, com grande quantidade de linfócitos e células apresentadoras de antígeno o que contribui para acelerar a produção de proteínas (MEHAL et al, 2001).

Figura 1 - Esquema demonstrativo da resposta de fase aguda.



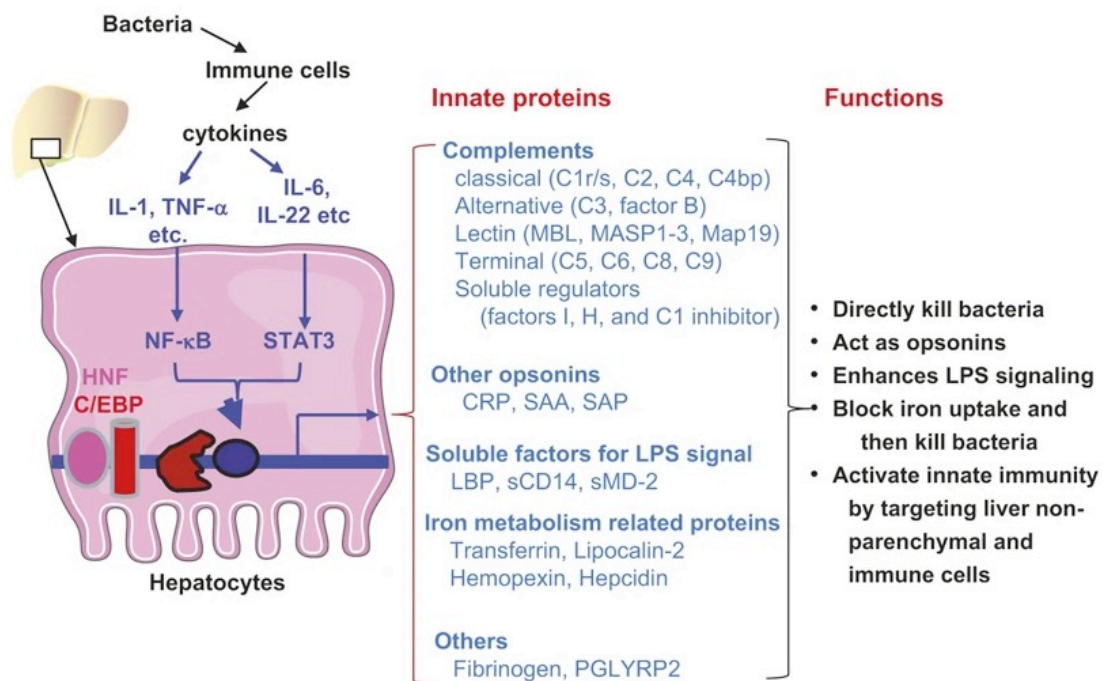
Fonte: Cray (2012).

## 2.2. Papel das citocinas na produção de proteínas de fase aguda

Genericamente, a resposta imune envolve a produção de fatores solúveis que

dão manutenção para o bom funcionamento da imunidade, sendo denominadas citocinas (FERREIRA et al., 2001). Essa manutenção é dada por uma retroalimentação positiva entre as citocinas, células inflamatórias, células estromais e as PFAs, que mantém a inflamação ativa principalmente em enfermidades de curso crônico (STEEL et al., 1994, DE BUCK et al., 2016).

Figura 2 - Infecção bacteriana, as células imunes expressam citocinas para estimular os hepatócitos a produzir proteínas. As citocinas ativam os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e STAT3. Junto com os fatores de transcrição - Fatores nucleares de hepatócitos (HNFs) e Proteínas de ligação ao intensificador de CCAAT (C/EBPs), para a produção de proteínas ativas e coadjuvantes da resposta imune inata.



Fonte: Zhou et al. (2016).

A IL-6 é reconhecida como a principal interleucina regulatória da indução de fase aguda, principalmente da proteína C reativa (PCR), onde sua ação é intensificada sinergicamente com a IL-1 $\beta$  por meio do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (MARNELL et al., 2005, ZHOU et al., 2016). A proteína STAT3 membro da família STAT (signal transducers and activators of transcription) participa e aumenta significativamente a ativação transcricional da PCR em resposta à IL-6, a ação solitária da IL-1 $\beta$  não tem efeito na expressão da PCR, já em conjunto com a IL-6 observa-se maior intensidade

de resposta (ZHANG et al, 1996, ZHOU et al., 2016, SPROSTON e ASHWORTH, 2018).

Nesse contexto, Jensen e Whitehead (1998), observaram que nem todas as proteínas respondem às mesmas citocinas, ressaltando que a transcrição do gene da amiloide sérica A (SAA) é dada principalmente pela IL-1 e TNF- $\alpha$ , já a IL-6 sozinha aparenta ser pouco efetiva. Jiang et al. (1995) demonstraram que a atuação conjunta das citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$  leva ao aumento de 23 vezes na transcrição da amiloide sérica A em hepatócitos humanos, chegando a valores superiores a 1000 vezes os valores basais em 72 horas. Além disso, a amiloide sérica A pode estimular a produção de IL-1 $\beta$  nos tecidos e ativação do inflamassoma NLRP3 (NIEMI et al, 2011, ZHOU et al., 2016), induz a secreção de IL-8 (HE et al, 2003), além de outros mecanismos inflamatórios que resultam na amiloidose reativa.

Ainda, a IL-6 estimula a produção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) hipofisário, que resulta na elevação da concentração de cortisol circulante (BETHIN et al, 2000). Esse hormônio é um fator promotor para a expressão das PFAs pelo fígado, por estimular os receptores nos hepatócitos para IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$ , e por ajudar a estabilizar mRNA de algumas PFAs (YEAGER et al, 2004, ZHOU et al., 2016). Porém, é inibidor da expressão dos receptores nos macrófagos (BAUMANN e GAULDIE, 1994).

Ainda, foi demonstrado que os glicocorticóides elevam a liberação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) que estimulam a produção da amiloide A sérica e a proteína de ligação ao lipossacarídeos por células epiteliais intestinais (VREUGDENHIL et al., 1999). Também, uma dose intraperitonal de dexametazona em camundongos aumentou em cinco vezes os receptores para IL-6 em hepatócitos, no intervalo de 12 horas, e a hidrocortisona pode auxiliar na proliferação dos hepatócitos, desde que, em dose anti-inflamatória (YEAGER et al, 2004). Além disso, é importante relatar que além dos glicocorticóides e antagonistas, existem mecanismos intracelulares de controle transcricionais que são complexos e não estão totalmente elucidados para diversas PFAs (JENSEN e WHITEHEAD, 1998, WON et al., 2020).

O receptor (IL-6r) da IL-6 é mais efetivo com a ação conjunta da glicoproteína transdutora (gp-130), o que permite maior transdução de sinal e o *feedback* negativo para expressão é dado pelo seu antagonista (IL-6Ra) (WON et al., 2020).

A IL-1 (IL-1a e IL-1b), principalmente a IL-1b é a isoforma mais significativa na indução das PFAs, sendo que ambas as formas ativam o mesmo receptor (IL-1R tipo I) (JENSEN e WHITEHEAD 1998). A regulação da resposta é dada pelos antagonistas do receptor (IL-1Ra) e a PCR parece induzir a citocina anti-inflamatória IL-10 em conjunto com o IL-1Ra, inibindo a quimiotaxia de neutrófilos (MARNELL et al., 2005). Em relação aos efeitos metabólicos, a IL-1 eleva o catabolismo proteico muscular redirecionando os aminoácidos para o fígado para intensificar a biossíntese das proteínas de fase aguda (JENSEN e WHITEHEAD, 1998, WON et al., 2020).

O fator de necrose tumoral possui as duas formas TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , entretanto TNF- $\alpha$  é citado como indutor das PFAs e possui seu receptor funcional TNF- $\alpha$  tipo I e da mesma forma o antagonista sTNF-R1 (ZHOU et al., 2016).

### **2.3. Resposta de fase aguda e Proteínas inflamatórias de fase aguda**

De maneira geral a resposta imune é referida como um conjunto de reações em resposta ao dano tecidual e na resposta inata frente à inflamação uma série de processos se desencadeia através de elementos intermediários que são capazes de gerar a comunicação intercelular, com destaque para as citocinas (DE BUCK et al., 2016). No decorrer do recrutamento celular, inúmeros elementos coadjuvantes com a resposta inflamatória leucocitária são desencadeados, como ativação das vias do complemento e da coagulação, metabolismo oxidativo, alterações catabólicas, endócrinas e eletrolíticas, entre outros recursos que auxiliam intensificando ou diminuindo a resposta imune, como as PFAs (WON et al., 2020).

Essas proteínas elevam ou diminuem sua concentração sérica em pelo menos 25% quando a homeostase é desafiada (ECKERSALL e BELL, 2010). Atuam na resposta inespecífica à diversas causas, abrangendo agentes infecciosos, reações autoimunes, neoplásicos ou traumáticos (CERÓN et al., 2005, SPROSTON e ASHWORTH, 2018). São produzidas em grande parte pelos hepatócitos frente aos estímulos das quimiocinas e interleucinas, mas também podem ser expressas de forma significativa por inúmeros tecidos, sendo biomarcadores passíveis de serem utilizados no diagnóstico e/ou prognóstico. Hoje em dia, opta-se por utilizar o termo biomarcador inflamatório ao se referir às proteínas envolvidas nessa resposta (NETO e CARVALHO, 2009).

A resposta de fase aguda é um mecanismo fisiopatológico de defesa associado às inflamações agudas e crônicas (DE BUCK et al., 2016). Caracteriza-se pela variação (aumento ou diminuição) da concentração sérica de determinadas proteínas em decorrência de algum estímulo que cause injúria tecidual, antecedendo em até 8 vezes a resposta neutrofílica (CERÓN et al., 2005, SPROSTON e ASHWORTH, 2018). Por vezes, as contagens totais de leucócitos podem diminuir na fase aguda da inflamação ou na inflamação grave (a exemplo da sepse), por esgotamento medular, dando a falsa impressão de melhora clínica (CRAY, 2012).

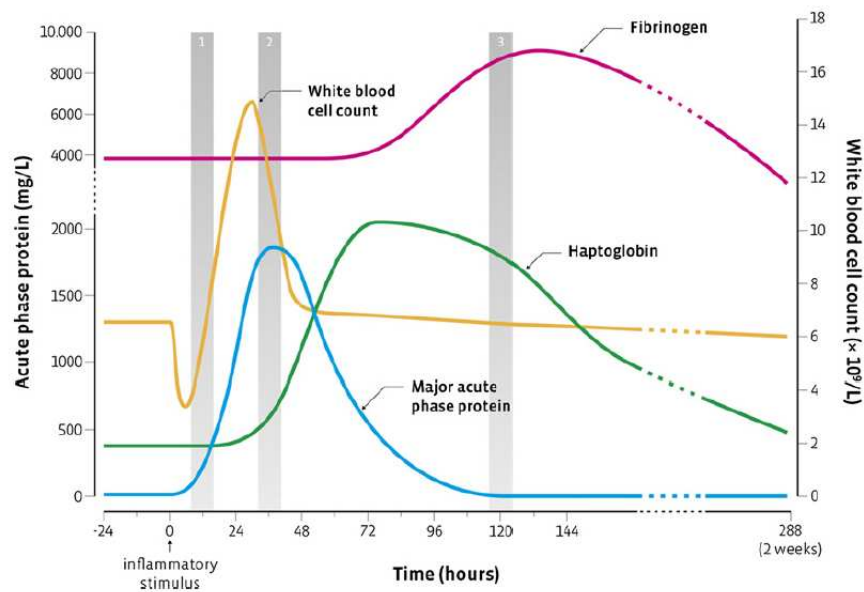
A resposta pode ainda resultar em variações de mais de 200 proteínas, que podem ser denominadas de proteínas de fase aguda positivas, quando há elevação das concentrações séricas, ou negativas, quando há diminuição (CRAY, ZAIAS e ALTMAN, 2009), na rotina da patologia clínica veterinária a albumina é de grande interesse por apresentar diminuição em processos inflamatórios, em função da diminuição da produção hepática (ECKERSALL e BELL, 2010), sendo a proteína plasmática em maior quantidade na circulação. A transferrina também faz parte das PFAs que podem apresentar diminuição nos quadros inflamatórios, a diminuição está relacionada ao sequestro de ferro (CRAY, 2012). Ambas proteínas citadas demonstram características diferentes nas aves (CRAY, 2012). Ainda de acordo com os autores, as PFAs podem apresentar funções pró ou anti inflamatórias e ainda, podem estimular ou inibir a produção de outras proteínas (JAIN, 1993, WON et al., 2020).

São classificadas como proteínas maiores ou principais por responderem de forma significativa na inflamação, como exemplo temos a proteína C reativa, amiloide sérica A, haptoglobina, glicoproteína ácida alfa-1, ceruloplasmina e fibrinogênio (KANEKO et al. 2008).

As proteínas com grande elevação (maiores ou principais) normalmente apresentam concentração sérica baixa (<1 µg/L) em homeostase, contrastando com a rápida elevação 10-1000 vezes pós injúria, com pico em 24 a 48 horas, apresentam-se estáveis em animais sadios, com rápida queda dos valores no decorrer do processo de resolução (CRAY, 2012). As proteínas moderadas elevam-se em torno de 5 a 10 vezes, possuem níveis basais superiores às maiores, com pico após 48 a 72 horas, e diminuem mais lentamente na resolução das inflamações (CRAY, 2012). As PFAs menores aumentam lentamente entre 50% e 100% de seu nível de repouso

(ECKERSALL e BELL, 2010), normalmente elevam-se com valores inferiores a 50% (CRAY, 2012). Deve-se sempre atentar que as PFAs variam de acordo com a técnica empregada para as análises e de acordo com a espécie, também sofrem constante alteração da sua função biológica na medida que são estudadas e passam pelo entendimento particular dos autores.

Figura 3 - Cinética da resposta à inflamação.



Fonte: Adaptação de Kjelgaard-Hansen e Jacobsen (2011).

Tempo -24: insulto tecidual.

Tempo 0:

Demarginação leucocitária (saída do pool circulante para o foco inflamatório);

Resposta inicial da proteína de fase aguda maior;

Ausência de resposta das proteínas moderadas e menores.

Tempo 24 a 48:

Pico da proteína maior e dos leucócitos.

Tempo 48 a 72:

Resolução do quadro com queda dos leucócitos e proteínas maiores;

Elevação da proteína moderada Haptoglobina;

Início discreto da proteína menor fibrinogênio.

Tempo 96:

Permanência das proteínas moderada e menor.

As barras cinzas 1, 2 e 3, representam as diferenças nas contagem de leucócitos.

Em felinos domésticos a amiloide sérica A e a  $\alpha$ 1 glicoproteína ácida são tida como proteínas maiores, haptoglobina como proteína moderada, essas proteínas são utilizadas para monitorar algumas enfermidades comuns dessa espécie; a exemplo disso, na peritonite infecciosa felina e no linfoma a  $\alpha$ 1 glicoproteína ácida pode ser utilizada como biomarcador, já gatos com ferimentos e pancreatite apresentam elevação da amiloide sérica A, na pancreatite é possível observar acréscimo de 160 vezes (CRAY, 2012).

Nos suínos, infecção experimental com *Streptococcus suis* levou a elevação da haptoglobina e da proteína C reativa também foi observado que suínos que sofrem estresse causado por um mau manejo higiênico, lesões e pneumonia apresentam elevação da haptoglobina (SKINNER, 2001), sendo de grande importância para o monitoramento do bem estar animal, relacionado ao manejo e condições das granjas. Além da haptoglobina, o suíno possui uma importante proteína própria, com capacidade de elevação superior a 15 vezes após o insulto, a  $\alpha$ 2-globulina pig-MAP (proteína de fase aguda principal dos suínos) sendo atualmente sua principal PFA, respondendo de forma eficiente à inflamação pós-cirúrgica, infecção viral ou bacteriana (SKINNER, 2001) e estresse (LOMBORG et al., 2008).

Nos bovinos, os ensaios com as PFAs são de grande importância, uma vez que, essa espécie possui resposta medular de reposição leucocitária tardia, o que mascara processos inflamatórios agudos e principalmente de curso crônico. A haptoglobina tem se destacado no monitoramento sorológico de doenças infecciosas nessa espécie, com atenção especial no diagnóstico e prognóstico da mastite clínica ou subclínica podendo ser dosada no leite, onde a haptoglobina e a proteína amiloide sérica A na isoforma (M-SAA3) são secretadas pela glândula mamária (SKINNER, 2001). Essa proteína pode ser uma importante ferramenta na avaliação dos efeitos dos fatores ambientais na saúde animal, já que a mastite também tem como causa principal as más condições de higiene dos estabelecimentos e equipamentos de ordenha. A proteína bovina homóloga ao pig-MAP é a b-MAP, mostrando resposta de até 10 vezes em novilhas com mastite induzida (SKINNER, 2001).

Ainda, são relatadas outras enfermidades que apresentam elevações da haptoglobina, como lipidose hepática, pneumonia, endometrite, endocardite, enterite e estresse, sendo de suma importância no monitoramento do bem-estar animal (CRAY, 2012). A amiloide sérica A, também é reconhecida em bovinos acometidos

com doenças respiratórias e reticuloperitonite (CRAY, 2012). Nos ovinos pode-se observar aumentos da haptoglobina e amiloide sérica A em condições experimentais infectados com linfadenite caseosa (ECKERSALL e BELL, 2010).

Nos equinos, a amiloide sérica A é fundamentada como a principal PFA sendo utilizada nos países desenvolvidos no cotidiano, principalmente para o monitoramento de rotina da saúde dessa espécie, onde a contagem de leucócitos não se mostra significativa. O maior destaque se dá nas enfermidades gastrointestinais, sendo empregada para diferenciar a etiologia das cólicas, animais com enterite severa, colite e peritonite podem apresentar elevação superior a 50 vezes nos seus valores basais. Enfermidades virais como o vírus da influenza equina Cray (2012) e inflamação não infecciosa articular em ensaio experimental, também apresentaram excelente resposta, onde a artrite mostrou elevação de até 200 vezes dessa proteína Hulten et al. (2002), tendo muitos trabalhos e kits comerciais disponíveis.

Tabela 1 - Principais proteínas dos animais domésticos e suas funções.

<b>Sigla</b>	<b>Proteína de fase aguda</b>	<b>Atividade</b>
AAT	$\alpha$ 1-antitripsina	Inibição de proteases
AGP	$\alpha$ 1-glicoproteína ácida	Ligação a fármacos e LPS
ALB	Albumina	Proteína de transporte
A2M	$\alpha$ 2-macroglobulina	Inibição de proteases
CP	Ceruloplasmina	Trasporte de cobre e proteger da lesão oxidativa mediada pelo ferro
PCR	Proteína C reativa	Melhorar o opsonização, ativar o complemento, induzir citocina e inibir quimiotaxia
FIB	Fibrinogênio	Substrato para fibrina e reparação tecidual
HP	Haptoglobina	Ligação à hemoglobina e atividade bacteriostática
MAP	PFA principal de suínos	Inibição de tripsina
SAA	Amiloide sérica A	Quimiotaxia e atividade anti inflamatória
SAP	Amiloide sérica P	Melhorar a opsonização e ativar o complemento
TN	Transferrina	Sequestrar ferro

Fonte: CRAY (2012).

No cão, a amiloide sérica A, a haptoglobina e a PCR são estabelecidas como

as proteínas de maior relevância por apresentar valores basais baixos em animais saudáveis. A PCR, por ser a proteína maior para a espécie, possui a capacidade de elevar-se alcançando pico em 24 horas após o insulto, normalizando rapidamente no decorrer da recuperação, grande número de doenças já foram estudadas e síndromes metainflamatórias (CRAY, 2012), são alvo atual de pesquisa, porém, necessita-se da maior aplicabilidade dessa proteína na rotina clínica e de testes que ofereçam praticidade e rapidez ao médico veterinário.

Tabela 2 - Proteínas de fase aguda de origem hepáticas principais e moderadas que respondem a estímulos inflamatórios comumente em animais domésticos.

<b>Espécies</b>	<b>PFA's principais</b>	<b>PFA's moderadas</b>
Felinos	SAA, AGP	FB, HP
Caninos	PCR, SAA	HP, AGP
Equinos	SAA	AGP, CP, FIB, HP
Bovinos	HP, SAA	AGP, CP, CRP, FIB
Suínos	Pig-MAP, SAA, HP	AGP, CP, CRP, FIB
Caprinos	HP, SAA	AGP, FIB
Ovinos	HP, SAA	AGP, CP, CRP, FIB

SAA: Amiloide sérica A; PCR: Proteína C reativa; HP: Haptoglobina; MAP: PFA principal de suínos; AGP:  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida; CP: Ceruloplasmina; FB: Fibrinogênio; Pig-MAP: Proteína de fase aguda principal dos suínos.

É importante também destacar que a continuidade da resposta de fase aguda de forma descontrolada pode contribuir para a ocorrência de enfermidades secundárias, a exemplo da amiloidose reativa, que é a produção ininterrupta de causa idiopática da proteína amiloide, com deposição em diversos tecidos (WON et al., 2020). Outras condições, como comorbidades que resultam em alterações metabólicas e desnutrição severa podem também levar às deficiências proteicas. Todavia, é observado que a resposta de fase aguda sobrepõe as condições de hipoaminoacidemia, conforme foi evidenciado pela elevação da PCR em condições de concentrações diminuídas de oito aminoácidos (alanina, arginina, citrulina, glicina, metionina, prolina e serina) em cães gravemente enfermos (CHAN et al., 2009).

## 2.4. Proteína C reativa em cães

A PCR pertence a família das pentraxinas, foi descoberta em 1930 por Tillet e Francis (1930) nomeada por sua capacidade de precipitar polissacarídeo C de *S. pneumoniae*, com a habilidade de ligar-se a fosfatidilcolina dependente de cálcio, sendo a primeira proteína de fase aguda descoberta e uma das proteínas mais pesquisadas (CERÓN et al., 2005). Cães saudáveis apresentam valores de PCR inferiores a 5 mg/L (CASPI et al., 1984), podendo crescer rapidamente de <1 mg/L para > 100 mg/L (ECKERSALL e BELL, 2010).

No homem, é um dos biomarcadores mais expressivos associados à diversos processos inflamatórios, possui uma multiplicidade de funções metabólicas, de eliminação e de defesa do hospedeiro, tendo ainda, sequência homóloga entre os mamíferos (ANSAR e GHOSH, 2013). Apesar da PCR canina indicar certa capacidade de reagir de forma cruzada com a PCR humana por semelhanças na estrutura proteica, foi evidenciado que as duas proteínas não possuem antigenicidade comum (YAMAMOTO, et al., 1992, YAMAMOTO et al., 1993).

A amiloide sérica A e a PCR são as principais proteínas de fase aguda para os cães domésticos. A concentração sérica média de CRP para cães machos é  $7,9 \pm 3,4$   $\mu\text{g} / \text{ml}$  e fêmeas  $8,3 \pm 4,0$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ , a prenhez pode elevar os valores para  $77,5 \pm 7,1$   $\mu\text{g} / \text{ml}$  (KURIBAYASHI et al., 2003). Kjelgaard-Hansen e Jacobsen (2011) notaram uma elevação significativa de 20 vezes da PCR em cães com diversas enfermidades, também ressaltou que outros parâmetros como relação albumina/globulina e fibrinogênio, não excediam em 2 vezes os seus valores basais, e a contagem de leucócitos totais não era superior ao valor de referência. De fato, essas observações são experiências particulares dos laboratórios com a suas determinadas populações, laboratórios que trabalham com animais em condição vulnerável, de certa forma contestam algumas informações, no entanto, em sua maioria não possuem demanda para dosar as PFAs, o que prejudica o conhecimento sobre o comportamento das proteínas com as enfermidades locais.

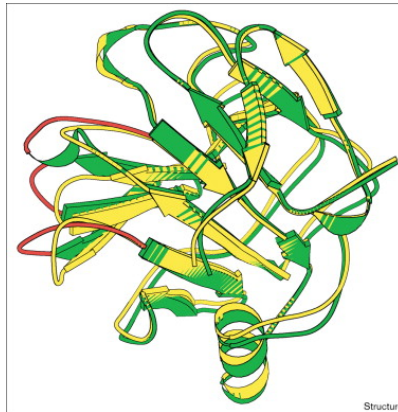
Também, anticorpos anti-PCR canina não foram capazes de reconhecer a PCR de espécies selvagens (JASENSKY et al., 2014). Tem peso molecular de 23.5 kDa, com duas isoformas de 22 e 25 kDa (JASENSKY et al., 2014), com 5 subunidades de 20 kD e difere da PCR humana onde 2 das 5 subunidades são glicosiladas (CERÓN et al., 2005). Possui 223 aminoácidos (JASENSKY et al., 2014), sendo uma proteína

de tamanho mediano, considerando que proteínas pequenas possuem valores inferiores a 100 aminoácidos (DORN, 2008). É majoritariamente sintetizada pelo fígado (WINDGASSEN et al., 2011), porém, células endoteliais, monócitos, macrófagos, células musculares lisas e células epiteliais tubulares renais também podem sintetizá-la (ANSAR e GHOSH, 2013). Leclere et al. (2015), sugerem o pulmão como mais uma fonte da PCR.

A indução da expressão do RNA mensageiro para síntese de PCR hepática se dá principalmente através da elevação da citocina IL-6, porém as citocinas como a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , também são indutores significativos, no homem sua expressão é elevada diretamente em proporção ao estímulo inflamatório, ao passo que esse processo cessa, sua concentração de circulante diminui rapidamente. Do mesmo modo que ocorre sua indução, a PCR atua diretamente estimulando os monócitos e macrófagos a induzirem a produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  por meio da estimulação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-kB), o que mantém ativa a retroalimentação (MAYER et al., 2010).

A PCR pode apresentar duas formas estruturais, a pentamérica como estrutura nativa plasmática e a forma monomérica nos tecidos, sendo esta, ativadora dos leucócitos por meio de citocinas (MOUTACHAKKIR et al., 2017). Ligações reversíveis com leucócitos da PCR na sua forma purificada, foram excluídas das suas possíveis funções (HUNDT et al., 2001). Como uma opsonina, a PCR fornece um local de reconhecimento para os macrófagos e neutrófilos identificarem os antígenos, sendo uma forma de ligação irreversível (ZHOU et al., 2016). Essa ligação permite a ativação de receptores específicos (Fc $\gamma$ R) presentes nas membranas de células de macrófagos e neutrófilos que reconhecem imunoglobulinas (ZHOU et al., 2016). De tal modo, esses receptores Fc $\gamma$ RI (CD34) e Fc $\gamma$ RII (CD32) seriam mediadores da ligação entre as respostas imunes humoral e celular (MARNELL et al., 2005).

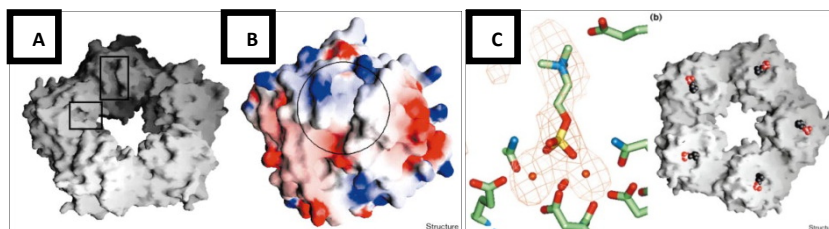
Figura 4 - Representação do tipo Ribbon da estrutura 3D da PCR.



Fonte: THOMPSON et al. (1999).

Além disso, a proteína C-reativa reconhece resíduos de fosfocolina e também possui a capacidade de se ligar ao C1q - via clássica (JIANG et al; 1992, SHRIVE et al; 1996), onde as lesões na membrana celular e exposição da camada bilipídica ativam a fosfolipase dando origem a lisolípídeos, esses resíduos permitem que a PCR se ligue, a partir desse ponto, ativando o complemento (THOMPSON et al., 1999). De modo contrário, a PCR inibe a via alternativa através do fator H que impede a atuação do C3b (ZHOU et al., 2016).

Figura 5 - Predição da estrutura 3D da PCR: **(A)** destaca as regiões Asp112, local de reconhecimento de C1q do sistema complemento; **(B)** demonstração dos sítios de ligação, marcações azuis com carga positiva; vermelhas com carga negativa; **(C)** ligação da fosfocolina à proteína C reativa.

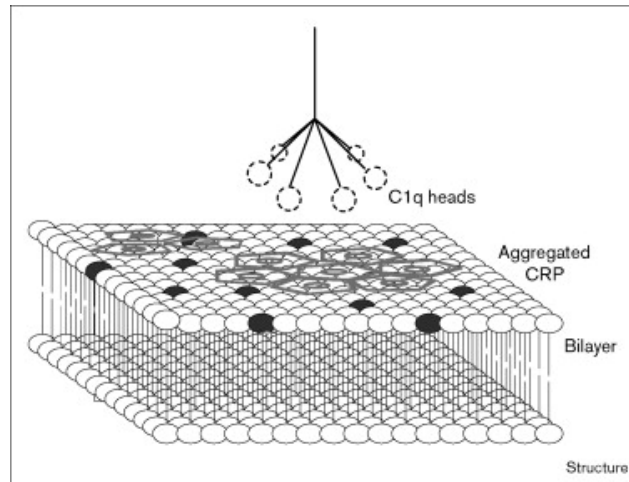


Fonte: THOMPSON et al. (1999).

É capaz de fazer ligações com imunoglobulinas, lipoproteínas, debris celulares como os de membranas celulares e resíduos nucleares (ribonucleoproteínas) (THOMPSON et al., 1999; PEPYS et al., 1994). A remoção de antígenos próprios nucleares em teoria evita reações autoimunes (THOMPSON et al., 1999). Também é indutora de citocinas e inibidora da quimiotaxia (CRAY, 2012), além disso, reconhece

outras estruturas celulares, como parede celular de plantas, demais componentes bacterianos, fúngicos e parasitários (PEPYS e HIRSCHFIELD 2003). Outra função anti-inflamatória é a redução da produção de superóxido (ZHOU et al., 2016).

Figura 6 - Esquema da ligação dupla da PCR com a camada bilipídica de micro-organismos invasores e ativação do complemento.



Fonte: THOMPSON et al. (1999).

No homem, a elevação ocorre cerca de 4 a 6 horas depois da inflamação com pico em 48 horas, voltando aos valores de normalidade rapidamente com a resolução do processo inflamatório (WINDGASSEN et al., 2011). A sua meia vida plasmática no homem gira em torno de 19 horas (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003), supostamente atuando na regulação plaquetária (MAYER et al., 2010), e com a capacidade de aglutinação e morte bacteriana (ANSAR e GHOSH, 2013).

A produção da PCR humana pode ser afetada diretamente por intercorrências que prejudiquem a função hepática, como insuficiência hepática. Poucos medicamentos reduzem os valores de PCR, ou enfermidades que afetem o estímulo da fase aguda (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003). Os níveis séricos de PCR de alta sensibilidade são elevados em pacientes (homem) com hepatite alcoólica, na cirrose há baixa produção das PFAs, na esteatose hepática não alcoólica, há elevação das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  e PFAs, porém má resposta as infecções (ZHOU et al., 2016). Em quadros graves como a fibrose hepática canina não há informações suficientes sobre o comportamento das PFAs.

A PCR no homem já foi amplamente estudada, e segundo Pepys e Hirschfield (2003), por ser uma resposta inespecífica nunca deve ser interpretada como único

parâmetro clínico laboratorial, e recentemente tem sido alvo de pesquisas em condições orgânicas específicas como obesidade, envelhecimento, sedentarismo e depressão (AZIZ et al., 2003). Na medicina veterinária, também tem demonstrado ser de grande importância para o monitoramento de inúmeras enfermidades nos cães, como na pancreatite (HOLM et al., 2004; SATO et al., 2017); pênfigo foliáceo (SEVERO et al., 2018); insuficiência cardíaca congestiva (REIMANN et al., 2016); doença valvular crônica (RUSH et al., 2006); pneumonia bacteriana (VIITANEN et al., 2014); doença intestinal inflamatória (JERGENS et al., 2003); e meningite responsiva a corticosteroides (LOWRIE et al., 2009).

Em experimento para indução aguda de nefrotoxicidade em camundongos, observou-se que o tratamento com PCR exógena levou ao atraso no desenvolvimento da proteinúria por indução da interleucina 10 (IL-10) em macrófagos, conseguindo reverter o quadro com posterior tratamento, destacando a função indireta indutora da IL-10 (anti-inflamatória) da PCR e de limpeza contra antígenos autoimunes (MARNELL et al., 2005). É importante ressaltar, que a PCR é uma proteína de baixa expressão nessa espécie (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003).

#### **2.4.1. Valores para algumas enfermidades:**

Os valores médios para PCR para cães saudáveis têm variado em torno 0 a 8,9 mg/L (PLICKERT et al., 2011), entretanto, valores de referência são estabelecidos por cada laboratório de acordo com a técnica empregada, sendo importante destacar a dificuldade de se estabelecer a reprodutividade desse analito nos ensaios até hoje empregados na espécie. E deve-se sempre notar que os parâmetros pré-analíticos podem interferir nas dosagens.

Lowrie et al. (2009) referiram o intervalo de 0,46–9,6 mg/L para PCR no soro de pacientes acometidos por meningite. Heilmann et al. (2018) afirmaram que a PCR de  $\geq 9,1$  mg/L sugere o tratamento da doença intestinal inflamatória com imunomodulador, distinguindo das alérgicas e responsivas a antibióticos. No estudo investigativo e comparativo sobre os valores da PCR em enfermidades dermatológicas, observou-se que cães com valor de PCR  $> 10,6$   $\mu\text{g/mL}$  (10,6 mg/L) apresentaram 5,5 vezes mais chances de apresentar pênfigo foliáceo do que pioderma superficial.

Tabela 3 - Representação de enfermidades elevações significativas nas concentrações séricas de proteína C reativa (PCR).

Enfermidade*	(n)	PCR (mg/dL)			Número de animais			
		Mediana**	Min.	Max.	$\geq 1$ mg/d L	(%)	$\geq 10$ mg/d L	(%)
Piometra	7	20	3,5	> 20	7	(100)	5	(71)
Paniculite nodular estéril	7	20	10,0	> 20	7	(100)	5	(100)
Pancreatite aguda	5	15	6,1	> 20	5	(100)	3	(60)
Poliartrite idiopática	31	13	1,7	> 20	31	(100)	21	(67)
Hemangiosarcoma	5	7,6	3,1	16	5	(100)	2	(40)
Adenocarcinoma nasal	5	6,7	0,1	9	4	(80)	0	(0)
AHIM <sup>1</sup>	35	6,5	0	> 20	30	(86)	9	(26)
Carcinoma colangiocelular	7	6,3	0,1	19	6	(86)	2	(29)
LLA <sup>2</sup>	6	4,5	0,1	> 20	5	(83)	1	(17)
Histiocitose maligna	16	4,3	0,3	> 20	11	(69)	4	(25)
Linfoma	12	3,5	0	> 20	9	(75)	3	(25)
	7							
Broncopneumonia	16	3,3	0,2	11	12	(75)	1	(6)
Mesotelioma maligno	7	2,7	0,7	15	5	(71)	1	(14)
Demodicose	7	2,6	0	7,1	5	(71)	0	(0)
Hepatite crônica	7	1,6	0	9,7	4	(57)	0	(0)
Tamponamento cardíaco	6	1,5	0,7	6,7	3	(50)	0	(0)
Síndrome mielodisplásica	5	1,3	0	14	3	(60)	1	(20)
Adenocarcinoma intestinal	13	1,0	0	14	8	(62)	3	(23)
Trombocit. imunomediada	7	1,0	0	12	4	(57)	1	(14)

\*Enfermidades ( $n \geq 5$ ) nas quais a mediana das concentrações de PCR excederam o intervalo de referência ( $\geq 1$  mg/dL); \*\*Valores de PCR maiores que o limite de mensuração ( $> 20$ mg/dL) foram analisados estatisticamente como 20mg/dL.; <sup>1</sup>Anemia Hemolítica Imunomediada; <sup>2</sup>Leucemia Linfobástica Aguda. Fonte: (Nakamura et al., 2008)

A elevação, estabilidade e queda das PFAs são dadas de maneira particular por cada proteína, espécie e enfermidade.

#### 2.4.2. Enfermidades de curso crônico:

- *Obesidade*

As adipocinas pró inflamatórias IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) se encontram elevadas na obesidade, com intensa expressão pelos adipócitos e macrófagos (M1), estes últimos chegam a constituir 40 % do estroma do tecido. No homem a PCR é a principal PFA correlacionada com a adipogênese e metainflamação (GERMAN et al., 2010).

A indução da expressão do RNA mensageiro para síntese de PCR hepática se dá principalmente através da elevação da citocina IL-6. Na obesidade o infiltrado inflamatório e os adipócitos lançam citocinas como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , estado inflamatório de baixo grau, que estimulam a síntese da PCR (MUHAMMAD et al., 2016). Cerca de um terço de toda a IL-6 circulante no plasma é produzida pelos adipócitos em condição de sobrepeso e esse quadro é chamado de metainflamação, onde não há patógenos ou processo inflamatório convencional, para direcionar os agentes imunes, o alvo é o próprio tecido, como é observado no tecido adiposo. (GERMAN et al; 2010).

Além disso, a PCR é quimiotática para as moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1) e a E-selectina, ainda estimula a expressão da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), modula a síntese de NO, todos relacionados a patogênese da aterosclerose (MOUTACHAKKIR et al., 2017). Ainda, atua estimulando os monócitos e macrófagos a induzirem a produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  por meio da estimulação do fator de transcrição nuclear *kappa*- $\beta$ , o que mantém ativa a retroalimentação (MAYER et al., 2010). A diminuição do índice massa corporal no homem diminui os valores de PCR, podendo estar associada a resistência à insulina, síndrome metabólica e diabetes mellitus (PEPYS e HIRSCHFIELD 2003), enfermidades cada vez mais atuais nos equinos e cães respectivamente. A proteína C reativa ultrasensível é um marcador importante na doença cardiovascular no homem (SALES, 2016).

Os cães com sobrepeso mostram-se igualmente vulneráveis a serem diagnosticados com inúmeras enfermidades semelhantes ao homem; como alterações renais, respiratórias, ortopédicas, endócrinas/metabólicas e oncológicas, além do risco aumentado de complicação anestésica e expectativa de vida diminuída em dois anos (KIPPERMAN e GERMAN, 2018). Lim et al. (2015) e Tvarijonaviciute et al. (2016), identificaram doze proteínas de fase aguda em cães

obesos, sugerindo alterações metabólicas que devem ser investigadas. A obesidade no homem pode causar elevação da PCR (MOUTACHAKKIR et al., 2017).

- *Artrite*

As interleucinas IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$ , estão presentes em altos níveis nas articulações com artrite e a elevação da concentração sanguínea estão correlacionadas com a piora do quadro da artrite reumatóide (BADOLATO et al., 1996)

A PCR nessa enfermidade é ainda alvo de pesquisa, normalmente encontra-se elevada, porém, pode flutuar em alguns casos clínicos. Nos cães, estudos evidenciam como um biomarcador válido se utilizada em conjunto com outras ferramentas diagnósticas, devendo-se aumentar o número de pesquisas na área para melhor verificar a sua utilidade (NAKAMURA et al., 2008; GROBMAN et al., 2017; BREMER et al., 2017)

Hillstrom et al. (2016) verificaram que a concentração de PCR conseguiu diferenciar cães com artrite supurativa de cães com artrite não supurativa, o que é importante para direcionar o tratamento correto.

- *Alterações oncológicas*

Apesar da produção hepática da PCR e da amiloide sérica A nos cães serem majoritária, outros tecidos podem expressar de forma abundante outras proteínas, como glicoproteína ácida, sendo expressa por linfócitos em quadros de linfoma em cães e gatos (CERÓN et al., 2005). Moutachakkir et al. (2017) destacaram que no homem o câncer colorretal e a PCR tiveram associação positiva. Linfoma, hemangiossarcoma e leucemia são referidos como neoplasias que elevam a PCR, principalmente se acometer vísceras (NAKAMURA et al., 2008). Planellas et al. (2009), Selting et al. (2016) e Szczubiał et al. (2018) observaram que a PCR é um biomarcador tumoral, porém necessita de mais estudos para prever o grau de malignidade de tumores mamários em cães. Ainda, elevações nas concentrações de PCR hepática em carcinomas mamário podem indicar que há intensa inflamação conjunta às células tumorais (PLANELLAS et al. 2009). Contudo, no linfoma multicêntrico, Nielsen et al. (2007), constataram que a PCR não foi eficiente se usada

como única alternativa para determinar a remissão tumoral, embora, cães com linfoma demonstraram níveis mais elevados da PCR, e aqueles com remissão tinham níveis normais de PCR, e muitos fatores individuais entre os animais.

- *Doença inflamatória intestinal*

A doença inflamatória intestinal humana e canina ainda hoje é de difícil diagnóstico, inúmeras vertentes circundam as etiologias dessa enfermidade, e a princípio acreditava-se que uma reação de intolerância à microbiota intestinal desencadearia uma resposta inflamatória descontrolada (GERMAN et al., 2003), hoje sabe-se que diversos fatores podem estar associados, como reação a certos alimentos ou responsiva à terapia antibiótica ou imunossupressora.

A severidade da doença inflamatória é classificada com escore de 0 (normal) a 3 (severo) para cada categoria; atividade, prurido, valor de albumina, ascite, vômito, diarreia, frequência e consistência das fezes, perda de peso, apetite (COLLINS, 2013), grau de inflamação (difusa ou segmentar), e posteriormente o índice de atividade da doença é classificado de forma geral (JERGENS, 2004).

A celularidade inflamatória intersticial de fato promove a liberação de citocinas (ARMSTRONG et al., 1997), e as alterações nas populações de células imunes de linfócitos B e T (JERGENS, 2004), macrófagos e neutrófilos (GERMAN et al., 2001), adentrados na mucosa já foram citadas como sugestivo de severidade inflamatória. Jergens et al. (2009), em estudo com metanálise observaram que cães saudáveis e doentes não diferiram nas concentrações de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IFN-2, TNF- $\alpha$  e TGF-2 no trato gastrointestinal, contrapondo achados de outros autores que verificaram a significativa presença do TNF- $\alpha$  por biópsia de tecidos e nas fezes de humanos com doença inflamatória intestinal (MCCANN et al., 2007).

Uma grande variedade de ferramentas laboratoriais ainda são estudadas com o intuito de auxiliar no diagnóstico etiológico da doença e foram agrupados de acordo com seus propósitos investigativos; biomarcadores celulares, microbiômicos, genéticos, metabólicos, de função e bioquímicos a exemplo da PCR (HEILMANN e STEINER, 2018). Apesar da inespecificidade das proteínas de fase aguda e da incerteza sobre a elevação das citocinas intestinais no paciente doente, o uso das proteínas, tornou-se uma alternativa útil para vigilância e prognóstico da inflamação

nas enteropatias. A PCR destaca-se como uma alternativa de monitoramento principalmente em pacientes humanos com doença grave, como a doença de Crohn e associada positivamente com inflamação evidenciada na endoscopia e histologia (COLLINS, 2013), no entanto, diversas enfermidades gastroentéricas podem gerar a sua elevação, como tumores, pancreatite e traumáticas (JERGENS, 2004). Em particular, na parvovirose a PCR correlacionou-se positivamente com a taxa de sobrevivência 86,7% e não sobreviventes 78,7% (MCCLURE et al., 2013); podendo sofrer elevação de 20 vezes (YAMAMOTO et al.; 1993).

Jergens et al. (2003), observaram que a PCR apresentou boa correlação com a atividade da doença intestinal inflamatória (com exclusão de cães que receberam imunomoduladores no prazo de 7 dias), com significativo decréscimo de 10,4 para 0,6 mg/mL em um intervalo de 14 a 21 de tratamento. Já Mccann et al. (2007) e Allenspach et al. (2007), em estudos com animais recém diagnosticados e sem tratamento prévio com corticóides não observaram correlação consistente com a severidade da doença inflamatória intestinal. Otoni et al. (2018), ponderaram sobre o uso dessa proteína como biomarcador diagnóstico, em função da alta variabilidade de resultados, mas destacaram sua qualidade no controle da progressão inflamatória. Heilmann e Steiner (2018) recomendaram que só deve ser utilizada se houver elevação ou a diminuição no mínimo em 2,7 vezes. Heilmann et al. (2018) destacaram que a PCR de  $\geq 9,1$  mg/L apresentou sensibilidade de 72% e especificidade de 100%, podendo ser usada para distinguir com clareza animais que devem receber tratamento imunomodulador daqueles com doença responsiva a dieta ou antibióticos.

Vreugdenhil et al. (1999), observaram que o epitélio intestinal humano é capaz de secretar as proteínas de fase aguda bioativas na presença de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , a secreção das citocinas é ainda intensamente elevada com o uso de glicocorticóides. Foi observado a liberação da proteína de ligação ao lipolissacarídeo, que é uma proteína especificamente responsiva à endotoxinas e auxiliar dos leucócitos no reconhecimento da membrana externa bacteriana de Gram-negativas, e também possui ação neutralizante de toxinas evitando o choque séptico e da amiloide sérica A, reconhecida diversas funções imunológicas Vreugdenhil et al. (1999), principalmente em resposta às endotoxemias com envolvimento intestinal nos equinos, porém, com origem hepática.

Concentrações elevadas de glicocorticóides endógenos relacionadas às enfermidades inflamatórias diversas, hiperadrenocorticismo adrenal-dependente, hipófise-dependente ou principalmente resultante da administração de glicocorticóides de forma exógena/iatrogênica, também resultam na elevação da haptoglobina, possivelmente pelos mesmos mecanismos de elevação da fosfatase alcalina, tornando-a uma proteína de fase aguda intermediária para cães (CRAY, 2012).

#### **2.4.3. Enfermidades de curso agudo:**

- *Afecções pós cirúrgicas*

Christensen et al. (2015), em revisão sistemática, observaram que a PCR pode ser útil como marcador de inflamação sistêmica após cirurgia em cães na identificação precoce de alterações e complicações, entretanto, o estudo demonstrou que são necessários mais estudos para fundamentar a questão. Dabrowski et al. (2009), enfatizaram que a PCR é um marcador biológico importante no monitoramento inflamatório pós-operatório, com aumento de 200 vezes em casos de complicações pós ovariectomia. Já no homem, a elevação excedendo 7 a 10 dias de pós operatório pode sugerir uma complicação infecciosa (MOUTACHAKKIR et al., 2017).

- *Endoparasitoses*

A PCR demonstrou significativa elevação para infecções com *Dirofilaria immitis*, sendo a única PFA com diferença estatística (MÉNDEZ et al., 2014). Venco et al. (2014) também observaram elevação significativa para *Dirofilaria immitis*, assim como em certas cardiomiopatias. Ainda, cães acometidos por leishmaniose apresentaram elevação da mesma (SILVESTRINI et al., 2014).

Em cães acometidos com hemoparasitas como a *Ehrlichia canis*, a PCR demonstrou ser uma ferramenta para avaliação da severidade do dano inflamatório, já que RIKIHISA et al., (1994) observaram elevação significativa dessa proteína, Shimada et al., (2002), também confirmaram a elevação abrupta da PCR em um modelo experimental de infecção com *Ehrlichia canis*. A infecção por *Babesia canis*

também gerou elevação da PCR e o grau de elevação foi condizente com a gravidade da doença (ULUTAS et al; 2005).

- *Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS)*

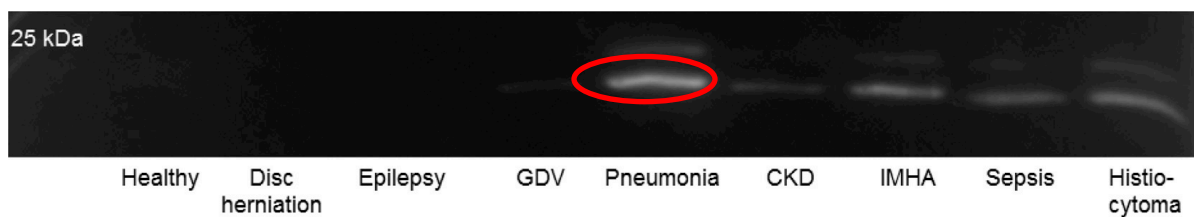
A síndrome da resposta inflamatória sistêmica em cães muitas vezes desenvolve-se de forma subclínica sendo uma reação inflamatória que o organismo desenvolve contra agentes infecciosos ou não-infecciosos, para exemplificar melhor, em pós cirurgias gastrointestinais ou mesmo com a grande demanda de histerectomia por piometra na rotina clínica, exames de rotina podem camuflar o quadro bacteriano endotoxêmico, implicando no diagnóstico e tratamento tardio que diminui abruptamente as chances de recuperação. Nesses casos a utilização de recursos diagnósticos é de grande valia, o estabelecimento de valores de referência para PCR nessa enfermidade, podem auxiliar na detecção precoce da inflamação sistêmica, otimizando o tratamento, Galezowski et al. (2010) notaram que na síndrome do abdomen agudo podem resultar em aumentos de até 200 vezes na PCR.

Valores significativamente mais elevados para PCR foram constatados por vários autores (CHRISTENSEN et al., 2014), que verificaram a amiloíde sérica A como ainda mais expressiva que a PCR, onde ambas proteínas demonstraram resultados interessantes. Gebhardt et al. (2009), Torrente et al. (2015) e Gommeren et al. (2018) observaram que a concentração sérica de PCR está aumentada em cães doentes e atenua durante o tratamento. Ishida et al. (2011), verificaram que a PCR sofreu rápida elevação com pico em 24 horas em cães com SRIS.

O processo inflamatório que envolve a piometra é extenso e agudo, levando à sepse com elevada mortalidade em questão de horas. As elevações da PCR variam de acordo com a etiologia da piometra e severidade da mesma. Dąbrowski et al. (2013), Karlsson et al. (2013) e Jitpean et al. (2014) observaram correlação positiva da PCR e o grau de inflamação. Enginler et al. (2014), verificaram que a PCR é útil para diferenciar hiperplasia endometrial cística de piometra. A concentração média de PCR entre os cães com piometra ficou em torno de 100 mg/L, estando de acordo com a intensa inflamação presente nesses casos (FRANSSON et al., 2007). Um estudo também destacou a importância da alfa-1 glicoproteína ácida no monitorado da piometra, valores superiores a quatro vezes condisseram com a hospitalização prolongada (HAGMAN, 2011).

Na sepse do homem, a PCR pode variar a sensibilidade de 71 a 100% e a especificidade de 66 a 85%. Em recém nascidos, a dosagem 24 e 48 horas após o início da antibioticoterapia foi 99% de precisão para confirmar não infectados (MOUTACHAKKIR et al., 2017).

Figura 7 - Western Blotting específico de PCR canino - hérnia de disco, epilepsia, doença renal crônica, histiocitoma, dilatação vólculo-gástrica, pneumonia (PCR destacada), anemia hemolítica imunomediada, sepse.



Fonte: Jasensky et al. (2014)

Tabela 4 - Enfermidades de cães responsivas às proteínas de fase aguda.

PFA	Enfermidade ou Condição
	Trauma cirúrgico
	Artrite reumatóide
	Poliartrite
	Obstrução intestinal
	Doença inflamatória intestinal
	Linfoma
	Pancreatite aguda
	Piometra
	Pneumonia
PCR	Endotoxemia ( <i>E.coli</i> )
	Babesiose
	Infecção por <i>Bordetella bronchiseptica</i>
	Infecção por <i>Ehrlichia canis</i>
	Leishmaniose
	Leptospirose
	Parvovirose
	Tripanossomíase
	Enterite bacteriana
	Trauma cirúrgico
	Leishmaniose
HP	Tripanossomíase
	Síndrome de Cushing
	Tratamento com corticóide

---

SAA	Parvovirose Leishmaniose Infecção por <i>Bordetella bronchiseptica</i>
AGP	Parvovirose Babesiose Infecção por <i>Ehrlichia canis</i> Linfoma Carcinoma

---

Fonte: Eckersall e Bell (2010).

## 2.5. Métodos de diagnóstico e quantificação da proteína C reativa

A avaliação da concentração de PCR no homem teve grande avanço nas últimas décadas, principalmente como uma ferramenta preditiva para avaliação de risco de eventos inflamatórios agudos, disponibilizando inúmeras metodologias de dosagem (PEPYS e HIRSCHFIELD, 2003), na rotina da medicina humana, a PCR está incluída em todos perfis de rotina para detecção de quadros inflamatórios (KJELGAARD-HANSEN e JACOBSEN 2011).

A utilização de kits comerciais humanos para quantificação da PCR em cães podem até ser uma alternativa, entretanto, baixa reação cruzada tem sido encontrada, possivelmente por diferença de glicosilação (CERÓN et al., 2005), o que foi confirmado posteriormente em análise de glicosilação, citando que no homem diferentes padrões de glicosilação podem indicar enfermidades específicas, entretanto, essa informação precisa ser aprofundada para doenças em cães (JASENSKY et al., 2014). O que se observa é a inconstância nas concentrações da PCR canina ao usar ensaios para PCR humana; é relatado que os kits com anticorpos policlonais apresentam reatividade cruzada significativa, porém, uma variação nas concentrações entre lotes é esperada, para evitar tais discrepâncias os lotes devem sempre passar por validação, para diminuir o coeficiente de variação (KJELGAARD-HANSEN, 2010).

A disponibilidade comercial de técnicas espécie-específicas para PCR canina nas últimas duas décadas resultou em um efeito positivo no número de pesquisas envolvendo medições deste marcador em cães (KJELGAARD-HANSEN e JACOBSEN, 2011). As metodologias que permitem a automação sempre são as técnicas de preferência laboratorial, como a imunonefelometria que mensura a

difração da luz no complexo antígeno anticorpo e o imunoturbidimétricos que mensura a capacidade de absorção da luz no complexo, onde a mudança na turbidez é medida espectrofotometricamente. Aglutinação de látex, o Time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) também tem sido citado por possibilitar o uso de saliva, efusões e sangue total (CERÓN et al., 2005). Kjelgaard-Hansen et al. (2003), utilizaram o um ensaio de imunodifusão radial dupla disponível comercialmente para PCR humana, empregando anticorpos policlonais de cabra anti-PCR humana e observaram reação cruzada com a PCR canina.

A eletroforese consiste no método mais importante para identificar proteínas presentes no sangue (KANEKO, 2008). A eletroforese em acetato de celulose e em gel de agarose foram utilizadas para analisar as concentrações de proteínas séricas, mas essas técnicas são limitadas, porque podem identificar poucos grupos de proteínas (EDINGER et al., 1992). Em contrapartida, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), permite identificar uma maior quantidade de 20 frações proteicas, podendo separá-las claramente mesmo em quantidades pequenas (GORDON, 1975), entretanto, por se tratar de uma técnica manual e trabalhosa, apresenta algumas limitações inerentes a isso.

Os testes imunocromatográficos de fluxo lateral ou *dipstick* são uma junção de várias técnicas imunológicas, os primeiros testes são datados desde a década de 1950 (PLOTZ e SINGER, 1956). Os testes rápidos tem como princípio a conjugação de antígenos ou anticorpos adequadamente marcados de forma que se permita a visualização durante o fluxo contínuo através das zona de capturas definidas em uma membrana (JAPOLLA et al., 2015).

No Brasil, o mercado de teste rápido (imunocromatográfico) encontra-se em expansão, e a fabricação dos kits para este fim ainda não é uma prática comum realizada pelas empresas nacionais. Os testes rápidos desenvolvidos através do método de imunocromatografia apresentam uma boa sensibilidade e especificidade como ferramenta diagnóstica em resposta a uma variedade de eventos, como patógenos, hormônios, medicamentos e metabólitos. Além disso, apresentam custos relativamente baixos, maior tempo de prateleira, produção em grande escala, praticidade e rapidez na obtenção dos resultados, sendo dispensável o envio de amostras para os laboratórios (JAPOLLA et al., 2015).

Um teste rápido semiquantitativo para triagem obteve amostras positivas > 24,1 µg/mL, positivos fracos entre 6,0 e 40,2 µg/mL e negativas, utilizando apenas 5 µL com tempo de leitura de 10 minutos (WARITANI et al., 2020). Outro teste também conseguiu discriminar amostras como positivas, fracas positivas e negativas, porém, necessitava de uma população de amostra para estabelecer resultados precisos (MCGROTTY et al., 2013). A PCR também foi aplicada no monitoramento da progressão da cicatrização de feridas crônicas, níveis elevados são observados no exsudato nas etapas de inflamação e proliferação com valores médios de 90 e 89 mg/L, respectivamente, para isso testes rápidos de fluxo lateral utilizando o exudato são uma opção de dosagem que pode ser aplicada (DOWNS et al., 2020)

Para a utilização emergencial, esse formato é o mais rápido e de fácil manuseio e não necessita de pessoal tecnicamente qualificado, sendo a disponibilidade comercial completa do material necessário para execução, por exemplo, não necessita de estocagem de material controle. Contudo, possui uma complexa e longa metodologia de produção. Para ser aplicável na rotina clínica, o teste rápido deve principalmente oferecer a característica semiquantitativa de resposta, passando por uma avaliação minuciosa de muitos critérios para um bom desempenho clínico, o que obviamente também são esperados para outras metodologias.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolver o teste imunoenzimático (ELISA) para proteína C reativa canina a partir de proteína recombinante para o acompanhamento de quadros inflamatórios em cães.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Expressar a proteína recombinante PCR\_dog vetor PET 14b através de cepas de *Escherichia coli* - Rosetta (DE3) - plasmídeo pRARE.
- Produzir imunógeno a partir da proteína recombinante purificada para imunizar coelhos e camundongos para produção de anticorpos anti-PCR canina.

- Executar a técnica Western Blotting para verificar a afinidade imunológica entre os anticorpos e a proteína C reativa nativa.
- Utilizar os anticorpos para desenvolver e futuramente padronizar o teste de ELISA para proteína C reativa canina, para uso no monitoramento de quadros inflamatórios.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Comitê de Ética

As normas de conduta para uso de animais em atividades de pesquisa científica foram adotadas de acordo com o Protocolo 37/2019, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa.

### 4.2. Obtenção do plasmídeo

Os vetores de expressão pET-14b (Gene Synthesis BIOMATIK), com as sequências da proteína C reativa canina foram adquiridos pelo Programa de Pós Graduação do Departamento de Veterinária e o desenho da sequência de aminoácidos foi gentilmente feito pelo professor Leandro Licursi do Departamento de Biologia.

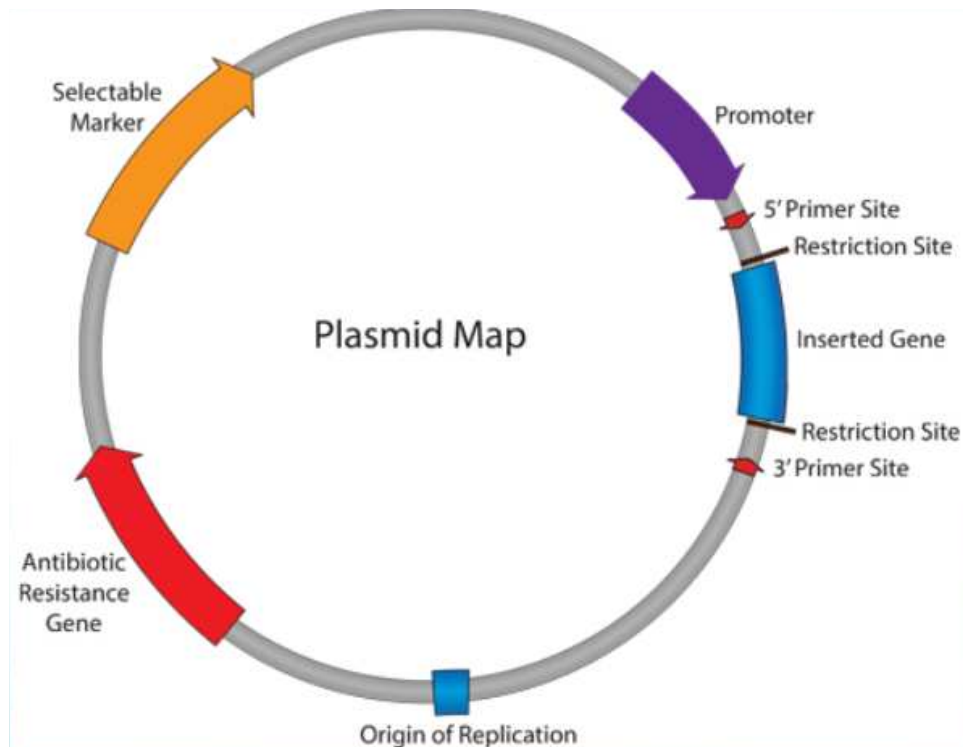
- *Vetor de expressão pET*

O sistema pET (plasmídeo de expressão para polimerase T7) é amplamente utilizado como sistema de expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, sendo descrito pela primeira vez por Rosenberg et al., (1987), possuindo as mesmas características básicas, como a enzima RNA polimerase T7, região promotora T7 (promotor T7) e região de terminação da transcrição (T7 terminador) (ROSENBERG et al., 1987). Existem hoje mais de 100 formatos de vetores pET disponíveis no mercado.

A utilização da RNA polimerase T7, originária do bacteriófago T7 (fago T7) reconhece as regiões específicas, sendo capaz de iniciar a transcrição após a indução com IPTG (STUDIER, 1990). Ainda, a RNA polimerase T7 possui resistência a

antibióticos, como a rifampicina, que inibe a polimerase nativa da *Escherichia coli*, e possui a qualidade de ser extremamente mais ativa (TABOR, 1990; STUDIER, 1990).

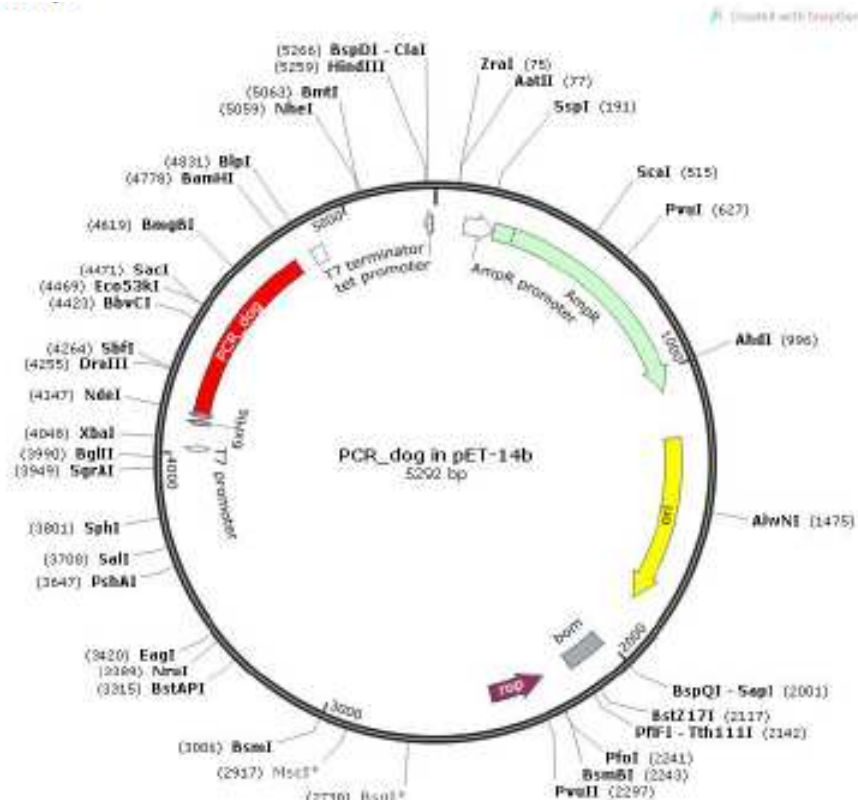
Figura 8 - Mapa esquemático do plasmídeo pET - Novagen



Fonte: EMD Millipore (2021).

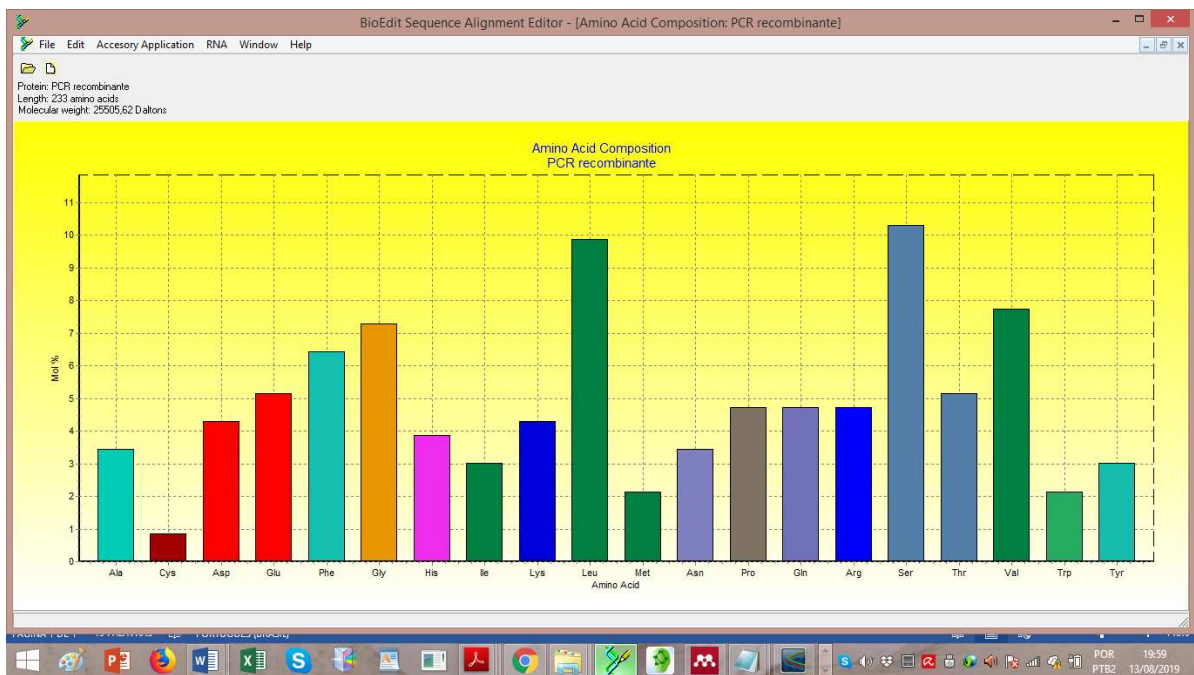
O plasmídeo utilizado possui a região promotora AmpR, tet e T7 e de terminação T7, enzimas de restrição HindIII e BglII, gene de resistência *amp*, que oferece resistência às células ao antibiótico ampicilina, evitando crescimento de bactérias contaminantes, há também os sítios de clonagem NdeI(CATATG) e BamHI(GGATCC), constituição do DNA fita dupla, circular e fechado, ainda fornece a proteína final expressa aderida a 6 resíduos de histidina (*tag*-His), na extremidade amino (N-terminal) ou carboxi-terminal (C-terminal), que auxilia na filtração para purificação por cromatografia de afinidade na coluna de sepharose e níquel (Ni<sup>2+</sup>).

Figura 9 - Mapa do vetor de expressão utilizado para a expressão da proteína recombinante PCR canina pET-14b



Fonte: BIOMATIK (2021).

Figura 10 - Sequência de aminoácidos da PCR recombinante canina



Fonte: BIOMATIK (2021).

### **4.3. Preparação de células competentes**

Inicialmente as bactérias - Rosetta™ (DE3) - plasmídeo pRARE (Agilent) do pré-inóculo 1 ml foram incubadas em 5 ml de meio TB/LB, overnight a 37 °C/250 rpm. Após o crescimento, 1 ml foi transferido para 100 mL de meio TB/LB pré-aquecido a 37 °C, 250 rpm e o crescimento foi monitorado espectrofotometricamente até alcançar a densidade óptica de (D.O.<sub>600</sub>) ~0,37. Alcançado o crescimento esperado, os conteúdos foram transferidos para 2 tubos falcons de 50 ml e mantidos em gelo e em repouso por 10 minutos; a solução foi então centrifugada a 1100 g/ 5'/4°C, descartou-se o sobrenadante e foi ressuspensionado lentamente o precipitado em 10 ml de solução de cloreto de cálcio A gelada, e novamente foi centrifugado a suspensão a 1100 g/5'/4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se delicadamente o precipitado em 10 mL de solução de cloreto de cálcio A gelada e incubada a suspensão em gelo por 30 minutos. A solução foi então centrifugada a 1100 g/5'/4°C, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi dissolvido lentamente em 2 mL de solução de cloreto de cálcio A gelada. Foram feitas alíquotas em volumes de 100 µl e armazenadas (-80 °C).

### **4.4. Transformação de células competentes**

Foram descongeladas 2 alíquotas de 100 µL das bactérias competentes em gelo e acrescentados 1 µL (200 ng) do plasmídeo (devidamente diluído) em uma alíquota sob homogeneização lenta, procedeu-se as incubações no gelo por 30 minutos; banho maria a 42 °C/30" e gelo por 2 minutos novamente. Foram então adicionados 300 µL do meio de cultura LB/TB e incubados a 37 °C/1 hora/225 rpm. Foram feitas culturas com 200 µL de meio LB-ágar com antibiótico de seleção 37 °C/16 horas. Todas as culturas seguiram com seus devidos controles.

### **4.5. Protocolo de indução e expressão proteica**

Inicialmente foi preparado o pré-inóculo (também controle) com 20 mL de meio TB com 1 mL do pré-inóculo, acrescidos dos antibióticos ampicilina e clorofenicol, incubados overnight, 37 °C, 160 rpm. Uma alíquota de 5 mL do pré-inóculo foi transferida para 50 mL de meio acrescido de 50 µL de ampicilina / 50 µL de clorofenicol, crescimento 37 °C, 160 rpm; onde alcançou a densidade óptica de

(D.O.<sub>600</sub>) ~0,37. Foi adicionado o indutor isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 800 µL e incubado 37 °C, 160 rpm, 4 horas, o conteúdo foi então centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, separados o sobrenadante (conservado 4°C) e o pelete (mantido no gelo) diluído em 3 mL de tampão de lise, passando pela etapa de sonicação e posterior centrifugação 10000 rpm por 10 minutos.

A expressão proteica foi obtida através da fração insolúvel e para separação foi acrescentado tampão lise com ureia ao pélete e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos.

#### 4.6. SDS-PAGE

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), com gel de empilhamento a 4% e gel de separação 15%, conforme Laemli (1970) com a finalidade de separar as proteínas de acordo com seu peso molecular, onde foi observado uma proteína com peso de 25 kDa correspondente ao peso da PCR canina.

Figura 11 - SDS-PAGE realizado para separar as proteínas de acordo com o peso molecular.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

#### 4.7. Protocolo Western Blotting e espectrometria de massa

Para confirmar o peso e quantidade de proteína na banda esperada foi realizado o protocolo de Western-blotting (TOWBIN et al.,1979). As proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para a membrana de nitrocelulose 0,45µm de poros sob corrente elétrica de 250 mA e tensão de 100 V por 60 minutos, com tampão de transferência gelado (sistema Bio-Rad laboratories, Mini Trans-Blot Cell Module).

A membrana foi corada com solução de Ponceau-S (0,1% Ponceau-S e 10% ácido acético) foi incubada em TBS-Tween (10mM Tris-HCl pH7,5; 150mM NaCl, 0,05% Tween-20) acrescido de 5% de leite em pó desnatado 12 horas, baixa agitação. Posterior incubação ocorreu por 60 minutos com anticorpo diluído 1:3.000 anti-histidina com TBS-Tween e 5% de leite em pó desnatado 60 minutos (Sigma Chemical Co) e após bloqueio, o anticorpo secundário foi adicionado e novamente incubado, 60 minutos, baixa agitação. Todas as etapas passaram por lavagens de 5 minutos com solução TBS-Tween e ao final foi feita a revelação (solução reveladora DAB).

E para a confirmação da PCR canina foi realizada a espectrometria de massa (MALDI-TOF, model Ultraflex III, Bruker Daltonics, Germany), realizada pelo Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL) da Universidade Federal de Viçosa.

#### **4.8. Purificação (diálise) pelo sistema de cromatografia líquida (FPLC)**

Esse sistema permite a purificação pela ligação das proteínas recombinantes fusionadas a poli-histidina que tem afinidade pelo níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) (ÄKTA pure, GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão de eluição fosfato 0,02M pH 7,4, (5mL) foi adicionado, o restante 50 mL de amostra diluída em fluxo constante 800 $\mu\text{L}$  por minuto. As ligações fortes são retidas, as fracas são lavadas com tampão. As frações correspondentes a PCR foram reunidas e congeladas a - 80 °C.

Figura 12 - Equipamento de cromatografia líquida (FPLC) utilizado para purificação da proteína no experimento



Fonte: ÄKTA pure, GE Healthcare (2021).

#### 4.9. Imunização de coelhos e camundongos para produção de anticorpos

Os coelhos e camundongos foram imunizados utilizando adjuvante completo de Freund, seguindo o protocolo descrito por Dunbar e Schwoebel (1990). Dois coelhos adultos jovens de linhagem albina, pesando cerca de 2 kg cada, e 20 camundongos Black-C57 (C57/BL6) pesando cerca de 30g, foram imunizados (inoculação subcutânea) com 100 $\mu$ g e 50  $\mu$ g respectivamente de antígenos (proteína C reativa purificada), emulsionados em adjuvante incompleto de Freund (Sigma) na proporção (1:1) 1 mL de proteína e 1 mL de adjuvante. O mesmo procedimento utilizando o adjuvante incompleto foi aplicado transcorridos 15 dias após a primeira inoculação; a terceira imunização subsequente foi realizada seguindo o mesmo protocolo. Ao término do protocolo de imunização no 45º dia, para obtenção do soro hiperimune, os camundongos foram anestesiados com éter e por punção cardíaca obteve-se 1 ml de sangue, os coelhos foram anestesiados com o seguinte protocolo: injeção intramuscular de uma combinação de anestésico e relaxante muscular: Xilazina 2%, 0,25ml/Kg, e Cetamina 10% 0,35ml/Kg. Sob efeito anestésico e de relaxante muscular, o sangue dos coelhos foi coletado por punção jugular, um total de 100 mL.

O sangue foi incubado a 37°C por 1 hora e então centrifugado a 2.500 rpm durante 15 minutos para obtenção do soro, em seguida, foi efetuado a inativação do sistema complemento a 56°C durante 30 minutos. O soro para purificação de IgG foi mantido a -20°C até o momento do uso.

Figura 13 - Imunização dos coelhos no biotério



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

#### 4.10. Protocolo Western Blot

Dois géis (SDS-PAGE) foram preparados e o sanduíche foi montado e transferido para a cuba (sistema Bio-Rad laboratories, Mini Trans-Blot Cell Module) sob corrente elétrica de 250 mA e tensão de 100 V a 2 °C durante duas horas. As membranas de nitrocelulose 0,45µm (Bio-Rad) foram corada com solução de Ponceau por 1 minuto, a membrana então foi descorada e bloqueada com leite desnatado 1%, tampão PBS 6% e Tween 0,05% por 60 minutos à temperatura ambiente. Os anticorpos (coelhos e camundongos) foram diluídos 1/50 com a solução de leite desnatado 1%, tampão PBS 6% e Tween 0,05% e incubados com a membrana a 37 °C por 60 minutos, passado esse processo, foi executada a lavagem com tampão PBS 6% e Tween 0,05% cinco vezes durante 5 minutos. O mesmo procedimento descrito acima foi feito com os anticorpos secundários - conjugados com peroxidase (Linked whole antibody Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA), e foi realizada a revelação com solução reveladora por 2 minutos, e para cessar a reação foi usado água deionizada q.s.p.

#### **4.11. Etapas pré ELISA e Curva Padrão:**

##### **a) Precipitação de anticorpos**

O soro total de coelhos 60ml e camundongos 9 ml foram alicotados no volume de 1 ml, uma alíquota de cada espécie foi filtrada (filtro 0,25) e diluída em 4 ml de H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p., posteriormente para precipitação das globulinas utilizou-se a solução de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 6,0 a 45%, adicionada cautelosamente gota a gota em constante homogeneização. Após esse procedimento, as soluções foram incubadas em gelo durante 30 minutos e posteriormente foram centrifugadas 3.000g por 15 minutos e descartado o sobrenadante. A ressuspensão foi feita com 10 ml de PBS 6 % homogeneizando lentamente até a dissolução do pélete. As soluções foram alíquotadas e armazenadas a 6 °C para dosagem proteica.

##### **b) Solubilização da proteína recombinante**

As proteínas (PCR) foram solubilizadas em solução de TRIS pH 12,5 e uma fração de 2 µg foi diluída em 2 ml de solução de (TRIS 7,3%, NaCL 0,5 molar) totalizando 1mg/ml. Em seguida, diluiu-se novamente em água (diálise) para soltar qualquer sal aderido às proteínas. A PCR na concentração de 20 µg/ml solubilizada foi diluída em tampão PBS 6%, alicotada e congelada a -20 °C.

Após essa etapa foi realizada a dosagem da concentração proteica dos anticorpos de coelho e camundongo e da PCR solubilizada pela técnica de Bradford (1976). PCR (20 µg/ml) - camundongos (850 µg/ml) - coelhos (630 µg/ml).

##### **C) Curva Padrão**

Para a curva, 190 µl de tampão PBS 6% foram adicionados aos poços da primeira fileira, então 190 µl da PCR foi pipetada de forma seriada, posteriormente 100µl de anticorpos de coelho foram dispensados nos poços e incubados por 2 horas a 37 °C, após a incubação, 100 µl de anticorpos de camundongos foram dispensados e novamente incubados por 2 horas a 37 °C, para a leitura foi posto o anticorpo conjugado com a peroxidase e substrato OPD para revelação. Por fim, efetuou-se a leitura e confeccionou-se a curva.

#### **4.12. ELISA Piloto:**

Para avaliar a eficiência da imunização realizada nos coelhos e camundongos e especificidade dos anticorpos produzidos contra a PCR nativa foi realizada o ELISA direto - sanduíche.

##### **a) Adição dos anticorpos de coelho (captura) e amostras de soro**

Os anticorpos precipitados de coelho (630 µg/ml) foram adicionados em tampão carbonato-bicarbonato 0,5 M pH 6,8, dispendo 50 µl da solução em todos os poços da placa (Corning Incorporated Costar REF3590), e incubados por 24 horas a 6 °C. Posteriormente, foi descartado o conteúdo dos poços e bloqueado com solução PBS 6% mais leite em pó e incubado por 1 hora a 37 °C, a placa foi lavada 5 vezes com solução de (TRIS 7,3% e BSA 3%). As amostras de soro (50 µl) dos animais controle e doentes contendo a PCR nativa foram adicionados em duplicata, conjuntamente com a curva padrão, então a placa foi novamente incubada por 2 horas a 37 °C e após essa etapa, a placa foi lavada 3 vezes com solução (TRIS 7,3% e BSA 3%).

##### **b) Adição dos anticorpos de camundongo (anticorpo primário), peroxidase (anticorpo secundário) e solução reveladora**

Após a última lavagem descrita acima, 50 µl anticorpos de camundongos (850 µg/ml) foram adicionados a solução tampão (PBS 6% mais leite em pó desnatado 0,1%) e dispendo em todos os poços, seguida a incubação de 2 horas e lavagem 3 vezes (TRIS 7,3% e BSA 3%). Por seguinte, para detecção foi realizada a adição de 50 µl do anticorpo secundário anti-mouse marcado com peroxidase (1/10000) - (Linked whole antibody Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA) em solução tampão (PBS 6% e leite desnatado 0,1%), adicionado à placa e incubado por 1 hora e lavados 5 vezes. Para a revelação foi utilizado a solução reveladora 100 µl o-Phenylenediamine flaked 99.5% (OPD pH 5) - (0,18 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,09 g de ácido cítrico; H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 20 mL) com incubação a 37°C por 30 minutos em ambiente escuro e para cessar a reação foi usado 50 µl de ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 ml diluído em H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 40 ml. A leitura das densidades ópticas de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Expressão da proteína

A produção de proteína recombinantes em bactérias é uma das principais alternativas para medicina moderna, e a *Escherichia coli* possui a sua maquinaria genética e bioquímica bem conhecida, crescimento rápido, boa produtividade e baixo custo (OWCZAREK et al., 2019). O sistema (vetor + bactéria) apresentam as características de controle, qualidade e volume do produto desejados (GUPTA ET AL., 2019). No aspecto ambiental há o menor uso da indústria química e na questão do bem-estar animal, há cada vez menos a necessidade da utilização de animais para obtenção de amostras biológicas.

A PCR é uma proteína útil para monitoramento inflamatório, porém inespecífica. Um dos objetivos do presente trabalho foi utilizar a proteína recombinante para a produção em larga escala sem a necessidade de aquisição de soro para purificação da proteína, diferente dos trabalhos que utilizam amostras biológicas (CASPI et al., 1984; YAMAMOTO et al., 1992; SOLER et al., 2016). A expressão da PCR canina através da proteína recombinante necessita de tempo para ajustes, porém, não requer anticorpos para sua purificação e pode ser mantida em estoque.

O vetor pET é amplamente usado para produzir proteína recombinante em *Escherichia coli*, é composto por um plasmídeo que é inserido em bactérias contendo o gene de interesse, que através de um promotor (IPTG) é capaz de iniciar a transcrição. O vetor pET 14b através de cepas de bactérias *Escherichia coli* - Rosetta™ (DE3) pRARE permitiu a obtenção da proteína C reativa canina presente na fração insolúvel, desdobrada.

A bactéria *Escherichia coli* é utilizada por apresentar rápido crescimento, boa capacidade de expressão, baixo custo e facilidade de cultivo, além disso, as bactérias atuais são as derivadas da progenitora BL21 (DE3), com muitos anos de seleção para desenvolvimento das melhores linhagens (ROSANO et al., 2019).

Inicialmente, a expressão proteica seguiu o protocolo para expressão da proteína recombinante em bactérias BL 21 (DE3) (promotor T7/deficiente de protease), em conjunto com o Laboratório de Imunobiológicos no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Porém, mesmo seguindo todos os

protocolos e utilizando de recursos de otimização, como, mudanças de temperatura, tempo de crescimento e concentração de IPTG, não foi observada a expressão da proteína. Alguns fatores são citados como impeditivos da expressão, como toxicidade da proteína recombinante e genes que expressam produtos tóxicos. Se houver toxicidade poderá ocorrer a perda cepa e/ou perda do plasmídeo o que pode levar ao baixo crescimento da cultura (GROSSMAN et al., 1998).

A expressão proteica pela Rosetta™ (DE3) pLysS (pRARE) também apresentou-se instável com longo tempo para otimização. Os genes que possuem códons raros, ou seja, sequências "estranhas" para a *Escherichia coli* (BL21 de expressão em proteínas de rotina), podem não ser expressos de forma eficiente, interrompendo precocemente a síntese de proteínas ou transcrevendo de forma incorreta os aminoácidos, resultando na degradação proteica. Esses códons normalmente são: arginina (AGA e AGG), isoleucina (AUA), leucina (CUA) e prolina (CCC) (FERRER-MIRALLES et al., 2009; GILEADI, 2017). Para contornar esse problema pode-se otimizar os códons de sequência de genes estranhos, optar por cepas que possuem os tRNAs de alta eficiência para códons raros, para executar a sequência específica, ou usar o promotor Lac que é um forte indutor indireto da polimerase T7, intensificando a expressão (FERRER-MIRALLES et al., 2009, GILEADI, 2017).

Exemplos de duas estirpes mutantes de *Escherichia coli* para códons raros são: BL21-CodonPlus (DE3)-RI(P)L e Rosetta (DE3) e derivados, para corrigir a polarização (rearranjo) de códon e fornecer cópias extras de genes raros de tRNAs (ROSANO et al., 2009). Ter cópias extras de um gene, permite que se produza maior quantidade de proteína.

Todavia, ao se alterar a cepa é importante observar a presença dos plasmídeos de resistência e suas intercorrências. A presença dos plasmídeos pLysS e pACYC conferem resistência ao cloranfenicol, o pLysS fornece uma pequena quantidade de T7 lisozima, que é o inibidor natural da polimerase T7 e resulta na redução da expressão. Esse plasmídeo é utilizado para a redução da expressão basal (ROSANO et al., 2009). Para impedir a ação da lisozima, é possível a introdução de genes regulatórios ou a adição de 0,5-1% de glicose ao meio de cultura, prevenindo a elevação dessa enzima (Novagen® pET System Manual 11th Edition).

A adição de glicose ao meio é controversa, podendo ou não atuar como um adjuvante nas condições de crescimento bacteriano (Novagen® pET System Manual 11th Edition). De fato, a *Escherichia coli* utiliza preferencialmente a glicose como fonte energética, demonstrando excelente desempenho. Na ausência desse carboidrato ela é capaz de utilizar outras fontes alternativas, nessa situação, há ativação de genes repressores que são capazes de modificar e aumentar enzimas específicas para a utilização do nutriente presente (LEWIS, 2005).

A introdução do antibiótico ampicilina no meio também pode ser um fator impeditivo para o crescimento bacteriano, a presença de  $\beta$ -lactamase e a acidificação do meio pelo crescimento bacteriano podem degradar o antibiótico, permitindo o crescimento de bactérias contaminantes (Novagen® pET System Manual 11th Edition). Colônias "velhas" ou múltiplos cultivos podem apresentar bactérias sem o plasmídeo para resistência à ampicilina, o que eleva o risco de contaminação. Para diminuir os danos pode-se fazer a troca de antibiótico e evitar ultrapassar 16 horas de cultivo (Novagen® pET System Manual 11th Edition). O crescimento abundante pode levar a sobreposição de células e essa alta densidade celular pode impedir o contato com o indutor (LEWIS, 2005).

Outra questão é a expressão basal, linhagens BL 21/RNA T7 (RNA polimerase T7), podem apresentar expressão sem a indução, cujo mecanismo é desconhecido. Se essa condição for indesejada, pode-se fornecer pequenas quantidades de T7 lisozima, que culmina em impedir a transcrição pela ligação à enzima polimerase T7 (STUDIER, 2014). Uma outra alternativa para bloquear a polimerase T7 é utilizar o repressor Lac (DUBENDORFF et al., 1991). A perda da viabilidade da polimerase T7 pode estar correlacionado com a diminuição da expressão e é relatado que após 3 a 5 gerações essa enzima diminui eficiência (RIPATHI et al., 2019).

Muitas melhorias na seleção de novas linhagens já podem ser observadas, onde determinadas linhagens da *Escherichia coli* B perderam a capacidade de biossíntese de flagelo, que oferece mobilidade para a bactéria, redirecionando a utilização energética do meio de cultura para o crescimento (ROSANO et al., 2019). Outra melhoria observada é elevação do pH do cultivo, em torno de 7,5 a 8,5, o que diminui a absorção de ácido acético e impede a acidificação do substrato (ROSANO et al., 2019). Ao mesmo tempo, pode-se enriquecer o meio com glicose, como já foi

explicado. A *Escherichia coli* têm preferência por esse açúcar que é benéfico para diminuir a produção de acetato pela bactéria (ROSANO et al., 2019).

As cepas modernas de *Escherichia coli* são modificadas para diminuir a eliminação de proteases. Duas modificações principais foram feitas, uma inserção IS186 no promotor do gene *lon* de protease de citoplasma e uma deleção no gene de protease de membrana *ompT* que clivava a polimerase T7 (ROSANO et al., 2019). Essas enzimas podem causar grande prejuízo por degradação da proteína expressa, principalmente no processo de lise bacteriana, onde uma grande quantidade de enzimas citoplasmáticas e de membrana são lançadas (ROSANO et al., 2019).

Outras características têm sido estudadas, como as cepas com a capacidade adequada de formação de ligação dissulfeto (maiores concentrações de oxidoreductase periplásmica) (BURDETTE et al., 2018), essa característica é muito importante para dar funcionalidade biológica para a proteína. Também, novas linhagens para códons raros para proteínas que apresentem dificuldade de serem expressas (ROSANO et al., 2019).

Uma outra dificuldade na obtenção da proteína desejada é a presença de proteínas inativas agregadas intracelulares denominados corpos de inclusão. A formação de corpos de inclusão, normalmente são resultado da sobrecarga metabólica (LI e RINAS, 2020). Eles apresentam as proteínas na forma insolúvel, necessitando de redobramento da proteína e solubilização, em determinados casos a proteína perde sua função biológica (LILIE et al., 1998). Khreiss et al., (2002), observaram uma forma recombinante de PCR monomérica (humana) expressa em *Escherichia coli* e isolada a partir de corpos de inclusão com pureza > 95%.

Uma vantagem dos corpos de inclusão, é a grande quantidade de proteína expressa, além de pureza superior, proteção contra proteases e menor toxicidade para a cultura (LILIE et al., 1998). Porém, as proteínas também podem sofrer proteólise por proteases endógenas localizadas no citoplasma na membrana ou no espaço periplasmático (WAGNER et al., 2007).

A dificuldade de secreção proteica pela *Escherichia coli* ainda é um mistério para a produção de muitas proteínas. Em escala comercial, encarece o custo de produção, onde os processos de purificação representam entre 45 e 92% dos custos totais, necessitando do desdobramento de proteínas agregadas (OWCZAREK et al.,

2019). Essa deficiência de translocação proteica está relacionada com as características das proteínas e a incompatibilidade com a bactéria hospedeira (ROSANO et al., 2019).

Para diminuir a formação de corpos de inclusão e melhorar a secreção de proteínas, existem alguns ajustes, tais como:

- Adição de repressores de promotores mutantes: mutações em promotores indiretos da polimerase T7 podem levar a superexpressão, desequilibrando o metabolismo energético da célula, levando a saturação da transcrição e tradução, resultando em corpos de inclusão que impedem a secreção de proteínas (WAGNER et al., 2007). Esse problema é observado em estudo para expressão de proteínas de membrana e a adição de repressores de promotores mutantes podem diminuir o dano (WAGNER et al., 2007).

- Temperatura de cultivo: utilizar a temperatura entre 15 a 20 °C, permitindo que o processo de transcrição e tradução seja efetuado de forma mais lenta, o que auxilia o dobramento correto das proteínas (BURDETTE et al., 2018).

- Complexidade do dobramento: pode-se aumentar o tempo de crescimento do cultivo. Alguns trabalhos mostram que o dobramento lento permitiu a passagem de proteínas ao contrário das proteínas de bactérias que cresceram rapidamente (BURDETTE et al., 2018). Por outro lado, ao se elevar o tempo e diminuir a temperatura de cultivo, alguns promotores de expressão podem ser inibidos por serem mais ativos em fases de rápido crescimento e temperaturas superiores, o que pode impedir a expressão adequada, assim como a ação das chaperonas pode ser diminuída (BURDETTE et al., 2018).

- Tamanho da proteína: também é descrito que proteínas grandes podem obstruir a passagem transmembrana (BURDETTE et al., 2018). Translocação em conjunto com proteínas de fácil secreção podem ajudar nesse processo (GILEADI, 2017).

- Concentração de chaperonas: outra característica negativa da *Escherichia coli*, é a baixa concentração de algumas enzimas. Cepas modificadas com concentrações maiores de enzimas de dobramento podem auxiliar (RIPATHI et al; 2019). As chaperonas e proteases trabalham de forma sinérgica, as chaperonas controlam a qualidade das proteínas com a capacidade de enovelamento e

apresentam às proteases as proteínas mal dobradas para serem degradadas (TOMOYASU et al., 2001).

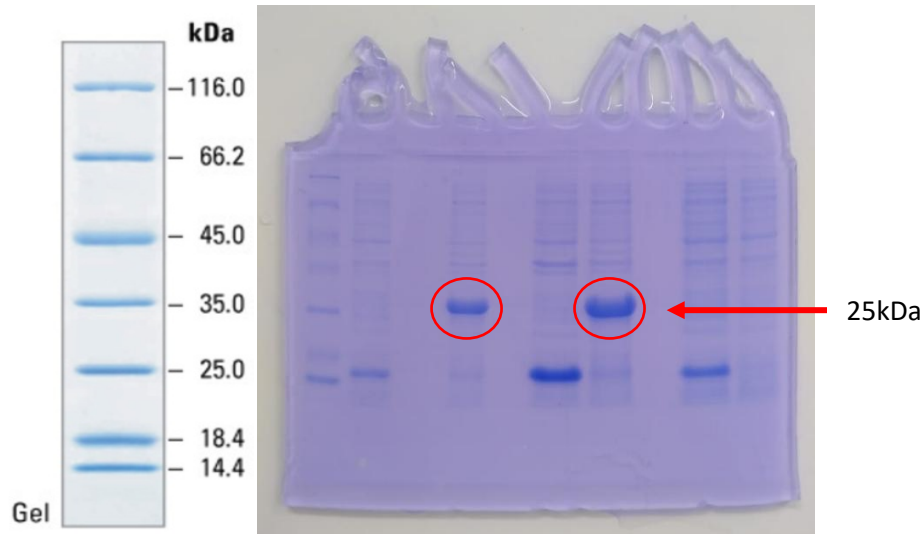
Há ainda muitos estudos, como o do sistema com a proteína YebF, que permite observar processo de secreção em *Escherichia coli*, do mesmo modo, o conhecimento dos mecanismos de excreção basal em gram-negativas pode melhorar a expressão de proteínas recombinantes induzidas. Também são pesquisados os mecanismos utilizados por proteínas heterólogas periplasmáticas para conseguirem atravessar o periplasma bacteriano. O intuito, é aprimorar a passagem das proteínas com auxílio de transportadores e poros, porém, sem causar a lise completa da membrana e perda da cepa (BURDETTE et al., 2018).

Por fim, acredita-se que a dificuldade de expressão é resultado de falhas referidas à cepa ou ao sistema utilizado para cultura. Entretanto, Shilling et al. (2020) demonstraram que mesmo utilizando os melhores de vetores de expressão, estes podem apresentar falhas no design. Um defeito em algum módulo do sistema pode resultar em um efeito cascata, prejudicando desde a transcrição até o processo de purificação da proteína desejada, os autores ainda destacaram que as melhorias apresentadas no vetor pET28a, podem ser facilmente transferidas para outros plasmídeos de expressão de pET (SHILLING et al., 2020).

## **5.2. SDS-PAGE e Western Blot**

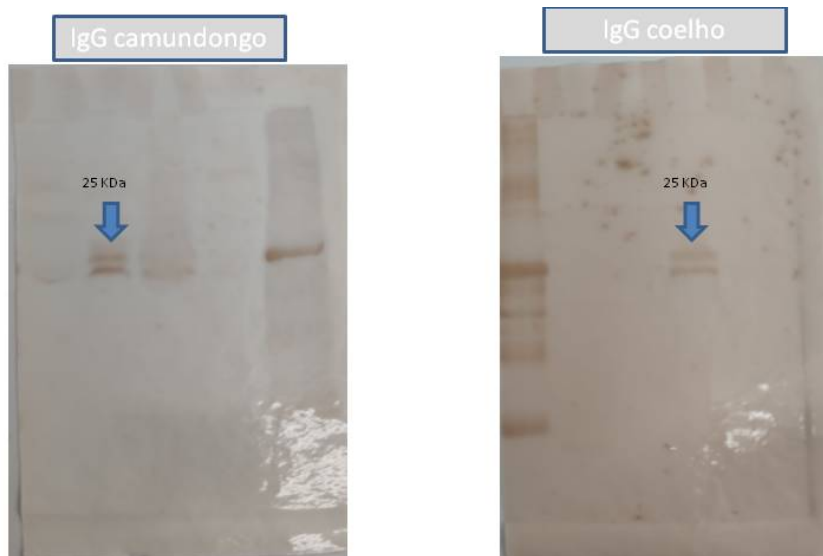
A proteína C reativa expressada foi visualizada e confirmada por SDS-PAGE e Western blot, respectivamente, conforme as figuras 14 e 15.

Figura 14 - Eletroforese de proteína para PCR canina. SDS-PAGE (15%), evidenciando a PCR a altura de 25 KDa.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Figura 15 - Anticorpos de coelhos e camundongos demonstrando afinidade com as duas isoformas da PCR nos soros dos animais.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

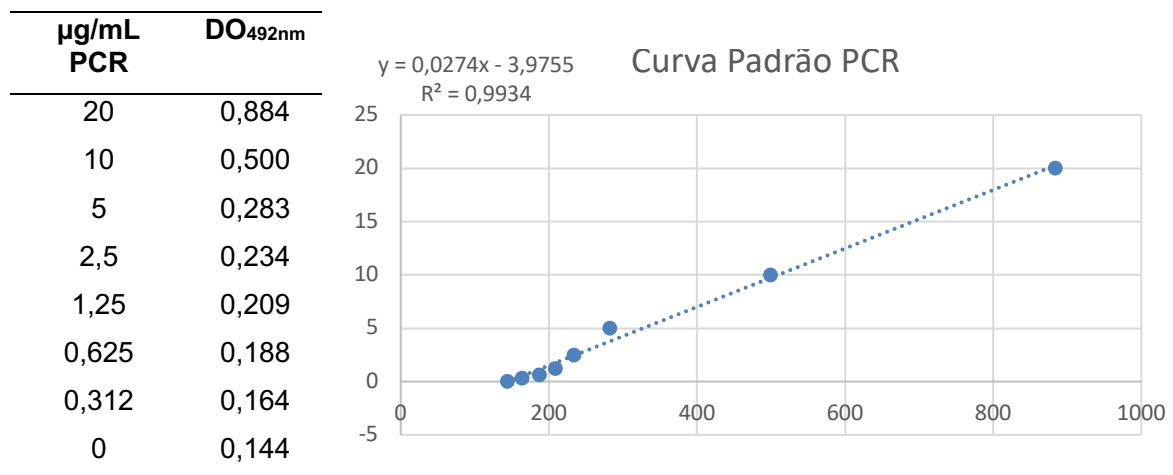
Segundo Jasensky et al. (2014) o peso molecular médio da PCR canina é de 23,5 kDa, apresentando duas isoformas de 22 e 24 KDa, em função da glicosilação em duas das cinco subunidades.

A produção de anticorpos policlonais de coelhos e camundongos apresentaram afinidade com as isoformas da proteína PCR nos soros dos animais, confirmando a banda na posição próxima a 25 kDA no Western blot. Assim como observado por Soler et al. (2016), os anticorpos policlonais foram obtidos de coelhos, também apresentando sensibilidade imunológica à proteína. Outros ensaios comerciais também utilizaram anticorpos policlonais, como o LifeAssays POCT com micro e nanopartículas magnéticas, o TECOmedical AG ELISA e o TECOmedical AG de fluxo lateral.

### 5.3. Curva Padrão do ELISA e ensaio piloto – PCR Canina

A partir dos anticorpos obtidos dos animais (coelhos e camundongos), foi produzida uma curva padrão com anticorpos policlonais anti-PCR (Figura 16).

Figura 16 - Produção da curva padrão com anticorpos policlonais anti-PCR. A linearidade da faixa corresponde a concentração de proteína em relação a absorbância, regressão linear, garantindo a sensibilidade de mensuração constante. Os pontos são os valores de absorbância. Análise de regressão  $R^2$  : 0,9934 indica que as absorbâncias são compatíveis com as concentrações proteicas.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Para o ELISA piloto foram utilizadas seis amostras de soro canino, sendo duas amostras controle (animais hígidos) e quatro provenientes de animais doentes (Tabela 5). Esse formato de ELISA necessita de dois anticorpos para a detecção de epítomos diferentes e um anticorpo marcado, o que ajuda na apreensão do antígeno. As imunoglobulinas de coelho foram utilizadas como fase sólida, as imunoglobulinas de camundongo como anticorpos primários e os anticorpos secundários anti-IgG

camundongo conjugados com peroxidase. A proteína solubilizada sofreu diluição seriada para a curva padrão e os soros dos animais foram adicionados sem diluição, visto que, em diluições anteriores não foi possível quantificar a PCR, optando-se por utilizar as amostras íntegras.

Tabela 5 - Resultado do ensaio piloto (ELISA) após a confecção da curva padrão.

<b>ANIMAL</b>	<b>ID</b>	<b>Condição/Enfermidade</b>	<b>PCR µg/mL</b>
1	94	Hígido	-1,3999
2	104	Hígido	-1,1259
3	109	DRC	-0,9889
4	185	Pancreatite	1,0935
5	108	Fratura	-1,0163
6	204	Parvovirose	1,6141

\*DRC: Doença renal crônica

Fonte: Arquivo pessoal (2021).

As avaliações de desempenho do ELISA, tais como, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia, serão realizadas posteriormente e com maior número amostral.

O ELISA para detecção da PCR canina está disponível no mercado, porém, mediante importação, uma vez que ainda não foi disponibilizado no mercado brasileiro um kit espécie específico de origem nacional. Quando necessário, muitos veterinários ainda utilizam testes comerciais para PCR humana, o que resulta em uma baixa reação cruzada diminuindo consideravelmente o valor diagnóstico da PCR como biomarcador inflamatório. Kjelgaard-Hansen (2010) relatou que ao usar ensaios para PCR humana deve-se atentar que os anticorpos apresentam maior afinidade e saturam rapidamente essas proteínas, já que a proteína canina apresenta baixa reatividade e em concentrações altas podem gerar resultado inferior ao valor real da PCR canina. As diferenças no genoma que fornecem conformação proteica distinta

entre as espécies, alteram também as suas funções, da mesma forma, há diferença de anticorpos obtidos de diferentes fontes (ECKERSALL, 2019).

É importante destacar que as técnicas que utilizam soro, como a imunoturbidimetria e o ELISA, são majoritariamente utilizadas para a mensuração das PFAs, estando presentes na maioria dos trabalhos. Jasensky et al. (2015), observaram que é possível a mensuração da PCR desde que, as sucessivas medições sigam a mesma técnica, pois precisão, exatidão e coeficiente de variação foram discrepantes em três técnicas: fluxo lateral, imunomagnético e imunoturbidimétrico quando comparadas ao ELISA. É fundamental também ressaltar que a especificidade do teste tem como objetivo evitar reações cruzadas com outras proteínas, garantindo a eficiência do anticorpo policlonal.

Um dos primeiros imunoenaios espécie-específico policlonal para padronização da dosagem de PCR canina demonstrou os primeiros resultados (KJELGAARD-HANSEN et al., 2003, FRANSSON et al., 2007). Outro ELISA que utilizou anticorpos monoclonais, conseguiu um limite de detecção de 0,5 ng/mL com limite linear de 1,6-100 ng/mL demonstrando alta sensibilidade (WARITANI et al., 2020). Os testes para diagnóstico da PCR na saliva podem ser uma forma de diagnóstico rápido e não invasivo, a dosagem salivar pelo mesmo ELISA necessitou de uma diluição 1/10, sendo correlacionada positivamente com a PCR sanguínea canina (WARITANI et al., 2020).

Para evitar alguns erros analíticos diminuindo a imprecisão devido à pipetagem manual, pode-se optar pelo ELISA para a bioquímica automatizada. Hillström et al. (2014) apresentaram o ensaio (Gentian cCRP) automatizado com anticorpos policlonais de galinha anti-PCR canina, resultando em turbidez aumentada na reação, as amostras com PCR superiores a 300 mg/L devem ser diluídas diluídas 1: 5, e o limite mínimo de detecção foi de 6,8 mg/L.

Porém, ainda hoje, não há um teste padrão ouro para dosagem da PCR canina, o que dificulta as análises comparativas. Um dos nossos objetivos futuros após a padronização do ELISA é a confecção de um teste rápido semi-quantitativo, esta etapa vai exigir grandes avanços na pesquisa. A exemplo disso, o ensaio imunocromatográfico para "*point of care*", que quantifica utilizando também anticorpos policlonais de coelho anti-PCR canino, demonstrou linearidade na detecção da PCR, de  $\leq 11,9$  mg/L até 130 mg/L, com boa correlação. Ainda, foi

destacado que esse resultado só é possível com amostras de qualidade (HINDENBERG et al., 2018). A impregnação das membranas de nitrocelulose com elementos que mascaram a leitura são fatores negativos que devem ser evitados. Os ensaios utilizados na medicina veterinária sofrem demasiadamente com alterações pré-analíticas, esses interferentes encontrados na rotina clínica, em moderada concentração, não alteraram as medições (HINDENBERG et al., 2018). Dentre os interferentes, podemos destacar, icterícia, hemólise e lipemia e os veterinários não conseguem eliminá-las totalmente, devendo as técnicas serem aprimoradas para superar essas adversidades. Outros problemas desses dispositivos são relacionados ao funcionamento do próprio analisador (HINDENBERG et al., 2018), como qualidade das membranas e os aparatos de suporte.

Outra dificuldade encontrada, é o desenvolvimento de ensaios sem o estabelecimento de um padrão de calibração comum entre os laboratórios, como intervalos de referência adequados para as enfermidades e um calibrador de padrão ouro de uma amostra purificada do biomarcador. A utilização um padrão de calibração internacional também poderia estreitar as variações dos valores encontrados em pesquisas que utilizam a mesma enfermidade (ECKERSALL, 2019). O que se nota, são trabalhos que estabelecem seus próprios valores de corte para a mesma doença, dificultando a interpretação dos valores na rotina clínica. Valores de referência para calibração de proteína de fase aguda em soro bovino e suíno estão disponíveis na Universidade de Copenhague e na Universidade de Zaragoza, respectivamente, porém são necessários esforços para o estabelecimento para cães e gatos (ECKERSALL, 2019).

A proteína recombinante é usada da mesma forma que a proteína nativa para a produção do padrão de calibração e também para produção dos anticorpos policlonais ou monoclonais. Porém, estes podem não reagir como proteína nativa, normalmente as proteínas desdobradas apresentam esse problema, podendo não expor os epítomos necessários para a interação com o anticorpo, diferente da conformação nativa. A glicosilação também pode estar ausente na proteína sintetizada, dificuldades pós traducionais são referidas as cepas de *Escherichia coli* (ECKERSALL, 2019). Em nosso estudo, apesar dos corpos de inclusão, as interações antígeno anticorpo foram observadas, o que garantiu a desempenho do ELISA, e deverá ser melhorado para o desenvolvimento futuro do teste imunocromatográfico.

## 6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento e o uso na medicina veterinária de biomarcadores inflamatórios vem aumentando e nos cães a utilidade da PCR se destaca. Com a finalidade de melhorar a utilização dessa proteína expressamos a proteína recombinante PCR\_dog vetor PET 14b através de cepas de *Escherichia coli* - Rosetta (DE3) - plasmídeo pRARE, com relativo sucesso e a confirmação foi realizada pelos técnicas de SDS-PAGE, MALDI-TOF e Westen Blotting.

Produzimos também, o imunógeno a partir da proteína recombinante purificada e imunizamos coelhos e camundongos para a produção de anticorpos anti-PCR canina, os anticorpos foram obtidos e para confirmação da reatividade com a proteína executamos a técnica Westen Blotting, e verificamos a afinidade imunológica entre os anticorpos e a proteína C reativa nativa.

Por fim, conseguimos produzir uma curva padrão e realizamos o ELISA piloto para PCR canina. A partir dos resultado obtidos em nosso estudo, poderemos desenvolver e futuramente padronizar o teste de ELISA para proteína C reativa canina, genuinamente nacional, para uso no monitoramento de quadros inflamatórios.

## REFERÊNCIAS

- ALLENSPACH, K., WIELAND, B., GRÖNE, A., GASCHEN, F. Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 21, n. 4, p. 700-708, 2007.
- ARMSTRONG, A. M., GARDINER, K. R., KIRK, S. J., HALLIDAY, M. I., ROWLANDS, B. J. Tumour necrosis factor and inflammatory bowel disease. *British journal of surgery*, v. 84, n. 8, p. 1051-1058, 1997.
- AZIZ, N., FAHEY, J.L, DETELS, R., BUTCH, A.W. Desempenho analítico de um imunoenensaio à base de proteína C-reativa altamente sensível e os efeitos de variáveis laboratoriais nos níveis de proteína no sangue. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* , v. 10, n. 4, p. 652-657, 2003.
- BADOLATO, R; OPPENHEIM, J. J. Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. In: *Seminars in arthritis and rheumatism*. WB Saunders,. p. 526-538. 1996.
- BARTON, GREGORY M .; MEDZHITOV, RUSLAN. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, v. 14, n. 3, pág. 380-383, 2002.
- BAUMANN, H; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunology today*, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.
- BETHIN, KATHLEEN E.; VOGT, SHERRI K.; MUGLIA, LOUIS J. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 16, p. 9317-9322, 2000.
- BREMER, H. D., HILLSTRÖM, A., KÅNÅHOLS, M., HAGMAN, R., HANSSON-HAMLIN, H. Serum C-reactive protein concentrations in Nova Scotia Duck Tolling Retrievers with immune-mediated rheumatic disease. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 59, n. 1, p. 21, 2017.

BURDETTE, L.A., LEACH, S.A., WONG, H.T. TULLMAN-ERCEK, D. Developing Gram-negative bacteria for the secretion of heterologous proteins. *Microbial cell factories*, 17(1), pp.1-16, 2018.

CAI, JINGJING; ZHANG, XIAO-JING; LI, HONGLIANG. The role of innate immune cells in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, v. 70, n. 3, p. 1026-1037, 2019.

CASPI D, BALTZ ML, SNEL F, GRUYS E, NIV D, BATT RM, MUNN EA, BUTTRESS N, PEPYS MB. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*. p. 307-13, 1984.

CERÓN, José Joaquín; ECKERSALL, Peter David; MARTÍNEZ-SUBIELA, Silvia. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

CHAN, D. L.; ROZANSKI, E. A.; FREEMAN, L. M. Relationship among plasma amino acids, C-reactive protein, illness severity, and outcome in critically ill dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 23, n. 3, p. 559-563, 2009.

CHRISTENSEN, M. B., ERIKSEN, T., KJELGAARD-HANSEN, M. C-reactive protein: quantitative marker of surgical trauma and post-surgical complications in dogs: a systematic review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 57, n. 1, p. 71, 2015.

CHRISTENSEN, M. B., LANGHORN, R., GODDARD, A., ANDREASEN, E. B., MOLDAL, E., TVARIJONAVICIUTE, A., KJELGAARD-HANSEN, M. Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 55, n. 2, p. 161, 2014.

COLLINS, M. T. Canine inflammatory bowel disease: current and prospective biomarkers for diagnosis and management. *Compend Contin Educ Vet*, v. 35, n. 3, p. E5, 2013.

CRAY, CAROLYN. Acute phase proteins in animals. *Progress in molecular biology and translational science*, v. 105, p. 113-150, 2012.

DAŁBROWSKI, R., KOSTRO, K., & SZCZUBIAŁ, M. Concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in uterine arterial and peripheral blood in bitches with pyometra. *Theriogenology*, v. 80, n. 5, p. 494-497, 2013.

DE BUCK, M., GOUWY, M., MING WANG, J., VAN SNICK, J., OPDENAKKER, G., STRUYF, S., VAN DAMME, J. Structure and expression of different serum amyloid A (SAA) variants and their concentration-dependent functions during host insults. *Current medicinal chemistry*, v. 23, n. 17, p. 1725-1755, 2016.

DORN, M. Uma proposta para a predição computacional da estrutura 3D aproximada de polipeptídeos com redução do espaço conformacional utilizando análise de intervalos. 2008.

DOWNS, COREY; MILOVANCEV, MILÃO; FU, ELAIN. Desenho racional e caracterização de um ensaio de fluxo lateral para proteína C reativa canina em exsudato de feridas. *Talanta*, v. 220, p. 121319, 2020.

DUBENDORFF, J. W. STUĐIER, F. W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219, 45–59, 1991.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The veterinary journal*, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2010.

ECKERSALL, Peter David. Calibration of Novel Protein Biomarkers for Veterinary Clinical Pathology: A Call for International Action. **Frontiers in veterinary science**, v. 6, p. 210, 2019.

EDINGER, V.H. et al. Electrophoretic serum protein patterns in laminitis horses. *Dtsch. Tierarztl Wochenschr*, v.99, p.426, 1992.

ENGINLER, S. O., ATEŞ, A., DIREN SIĞIRCI, B., SONTAŞ, B. H., SÖNMEZ, K., KARACAM, E., GÜREL, A. Measurement of C-reactive protein and Prostaglandin F2 $\alpha$  Metabolite Concentrations in Differentiation of Canine Pyometra and Cystic Endometrial Hyperplasia/Mucometra. *Reproduction in domestic animals*, v. 49, n. 4, p. 641-647, 2014.

FERREIRA, A. W., ÁVILA, S. D. L. M. D., ROCHA, A., DREYER, G., VAZ, A. J., ATTA, A. M., PANNUTI, C. S. Diagnóstico laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e autoimunes. In: Diagnóstico Laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e parasitárias e autoimunes. p. 443-443, 2001.

FERRER-MIRALLES, N., DOMINGO-ESPÍN, J., CORCHERO, J. L., VÁZQUEZ, E., VILLAVERDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial cell factories*, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2009.

FRANSSON, B. A., BERGSTRÖM, A., WARDROP, K. J., HAGMAN, R. Assessment of three automated assays for C-reactive protein determination in dogs. *American journal of veterinary research*, v. 68, n. 12, p. 1281-1286, 2007.

GALEZOWSKI, A. M., SNEAD, E. C., KIDNEY, B. A., JACKSON, M. L. C-reactive protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, v. 22, n. 3, p. 395-401, 2010.

GEBHARDT, C., HIRSCHBERGER, J., RAU, S., ARNDT, G., KRÄINER, K., SCHWEIGERT, F. J., KOHN, B. Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 19, n. 5, p. 450-458, 2009.

GERMAN, A. J., HALL, E. J., DAY, M. J. Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* v. 15, p. 14-25, 2001.

GERMAN, A. J., HALL, E. J., DAY, M. J. Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 17, n. 1, p. 8-20, 2003.

GERMAN, A. J., RYAN, V. H., GERMAN, A. C., WOOD, I. S., & TRAYHURN, P. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *The Veterinary Journal*, v. 185, n. 1, p. 4-9, 2010.

GILEADI, Opher. Recombinant protein expression in *E. coli*: a historical perspective. *Heterologous Gene Expression in E. coli*, p. 3-10, 2017.

GOMMEREN, K., DESMAS, I., GARCIA, A., BAUER, N., MORITZ, A., ROTH, J., PEETERS, D. Inflammatory cytokine and C-reactive protein concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of veterinary emergency and critical care*, v. 28, n. 1, p. 9-19, 2018.

GORDON, A.H. *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels*. New York: Elsevier Science Publishers BV, p.213, 1975.

GROBMAN, M., OUTI, H., RINDT, H., REINERO, C. Serum Thymidine Kinase 1, Canine-C-Reactive Protein, Haptoglobin, and Vitamin D Concentrations in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia, Thrombocytopenia, and Polyarthropathy. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 31, n. 5, p. 1430-1440, 2017

GUPTA, S. K., DANGI, A. K., SMITA, M., DWIVEDI, S., SHUKLA, P. Effectual bioprocess development for protein production. In: *Applied microbiology and bioengineering*. Academic Press, 2019. p. 203-227, 2019.

HAGMAN, RAGNVI. Serum  $\alpha$ -1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. *Veterinary clinical pathology*, v. 40, n. 1, p. 52-59, 2011.

HE, RONG; SANG, HAIRONG; YE, RICHARD D. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 101, n. 4, p. 1572-1581, 2003.

HEILMANN, R. M., BERGHOFF, N., MANSELL, J., GRÜTZNER, N., PARNELL, N. K., GURTNER, C., STEINER, J. M. Association of fecal calprotectin concentrations with disease severity, response to treatment, and other biomarkers in dogs with chronic inflammatory enteropathies. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 32, n. 2, p. 679-692, 2018.

HEILMANN, ROMY M.; STEINER, JÖRG M. Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 32, n. 5, p. 1495-1508, 2018.

HILLSTRÖM, A., HAGMAN, R., TVEDTEN, H., KJELGAARD-HANSEN, M. Validation of a commercially available automated canine-specific immunoturbidimetric method for

measuring canine C-reactive protein. *Veterinary clinical pathology*, v. 43, n. 2, p. 235-243, 2014.

HINDENBERG S, KESSLER M, ZIELINSKY S, LANGENSTEIN J, MORITZ A. Evaluation of a novel quantitative canine species-specific point-of-care assay for C-reactive protein. *BMC veterinary research*, v. 14, n. 1, p. 99, 2018.

HOLM, J. L., ROZANSKI, E. A., FREEMAN, L. M., WEBSTER, C. R. C-reactive protein concentrations in canine acute pancreatitis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 14, n. 3, p. 183-186, 2004.

HULTEN, C., GRÖNLUND, U., HIRVONEN, J., TULAMO, R. M., SUOMINEN, M. M., MARHAUG, G., FORSBERG, M. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and  $\alpha$ 2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, v. 34, n. 7, p. 699-704, 2002.

HUNDT, Matthias; ZIELINSKA-SKOWRONEK, Margot; SCHMIDT, Reinhold E. Lack of specific receptors for C-reactive protein on white blood cells. *European journal of immunology*, v. 31, n. 12, p. 3475-3483, 2001.

ISHIDA, A., OHNO, K., FUKUSHIMA, K., NAKASHIMA, K., TAKAHASHI, M., GOTO-KOSHINO, Y., TSUJIMOTO, H. Plasma high-mobility group box 1 (HMGB1) in dogs with various diseases: comparison with C-reactive protein. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 73, n. 9, p. 1127-1132, 2011.

JAPOLLA, G., ALMEIDA, G. R., DA CUNHA JUNIOR, J. P., BATAUS, L. A. M., DE SOUZA, G. R. L. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. *Enciclopédia biosfera, centro científico conhecer-Goiânia*, 11(22), 26-49. 2015.

JASENSKY, A. K., BONDZIO, A., MURUGAIYAN, J., SIEBERT, U., ROESLER, U., KOHN, B., EINSPANIER, R. Characterization of the native C-reactive protein (cCRP) and the corresponding liver mRNA in dogs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 452, n. 3, p. 462-467, 2014.

JASENSKY, A. K., KLENNER, S., EINSPANIER, R., KOHN, B. Evaluation of three different point-of-care tests for quantitative measurement of canine C-reactive protein. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 44, n. 2, p. 205-214, 2015.

JENSEN, L. E.; WHITEHEAD, A. S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochemical Journal*, v. 334, n. 3, p. 489-503, 1998.

JERGENS, A. E., SCHREINER, C. A., FRANK, D. E., NIYO, Y., AHRENS, F. E., ECKERSALL, P. D., EVANS, R. A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 17, n. 3, p. 291-297, 2003.

JERGENS, A.E, SONEA, I.M, O'CONNOR, A.M, KAUFFMAN, L.K, GROZDANIC, S.D, ACKERMANN, M.R, EVANS, R.B. Expressão intestinal de mRNA de citocinas na doença inflamatória intestinal canina: uma metanálise com avaliação crítica. *Medicina comparada* , v. 59, n. 2, p. 153-162, 2009.

JIANG, H.; ROBEY, F. A.; GEWURZ, H. Localization of sites through which C-reactive protein binds and activates complement to residues 14-26 and 76-92 of the human C1q A chain. *The Journal of experimental medicine*, v. 175, n. 5, p. 1373-1379, 1992.

JIANG, S. L., LOZANSKI, G., SAMOLS, D., KUSHNER, I. Induction of human serum amyloid A in Hep 3B cells by IL-6 and IL-1 beta involves both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *The Journal of Immunology*, v. 154, n. 2, p. 825-831, 1995.

JITPEAN, S., HOLST, B. S., HÖGLUND, O. V., PETTERSSON, A., OLSSON, U., STRAGE, E., HAGMAN, R. Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. *Theriogenology*, v. 82, n. 1, p. 43-48, 2014.

KANEKO, J.J. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. San Diego: Academic Press, p.916, 2008.

KANEKO, Jiro Jerry; HARVEY, John W.; BRUSS, Michael L. (Ed.). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press, 2008.

KILPATRICK, J. M; VOLANAKIS, J. E. Molecular genetics, structure, and function of C-reactive protein. *Immunologic research*, v. 10, n. 1, p. 43-53, 1991.

KJELGAARD-HANSEN, M. Comments on measurement of C-reactive protein in dogs. *Veterinary clinical pathology*, v. 39, n. 4, p. 402-3; author reply 404, 2010.

KJELGAARD-HANSEN, M., E JACOBSEN, S. Stine. Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 31, n. 1, p. 51-70, 2011.

KJELGAARD-HANSEN, M., JENSEN, A. L., KRISTENSEN, A. T. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 32, n. 2, p. 81-87, 2003.

KJELGAARD-HANSEN, M.; KRISTENSEN, A. T.; JENSEN, A. L. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v. 50, n. 3, p. 164-168, 2003.

KMIEC, ZBIGNIEW. Cooperation of liver cells in health and disease: with 18 tables. 2001.

KURIBAYASHI, T., SHIMADA, T., MATSUMOTO, M., KAWATO, K., HONJYO, T., FUKUYAMA, M., YAMAMOTO, S. Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Experimental animals*, v. 52, n. 5, p. 387-390, 2003.

LEWIS, Mitchell. The lac repressor. *Comptes rendus biologies*, v. 328, n. 6, p. 521-548, 2005.

LI, ZHAOPENG; RINAS, URSULA. Recombinant protein production associated growth inhibition results mainly from transcription and not from translation. *Microbial cell factories*, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2020.

LILIE H, SCHWARZ E, RUDOLPH R. Advances in redobramento de proteínas produzidas em *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*; 9: 497–501, 1998.

LOMBORG, S. R., NIELSEN, L. R., HEEGAARD, P. M., JACOBSEN, S. J. V. R. C. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Veterinary research communications*, v. 32, n. 7, p. 575-582, 2008.

LOWRIE, M., PENDERIS, J., ECKERSALL, P. D., MCLAUGHLIN, M., MELLOR, D., ANDERSON, T. J. The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs. *The Veterinary Journal*, v. 182, n. 1, p. 125-130, 2009.

MARNELL, L; MOLD, C; DU CLOS, TERRY W. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical immunology*, v. 117, n. 2, p. 104-111, 2005.

MCCANN, T. M., RIDYARD, A. E., ELSE, R. W., SIMPSON, J. W. Evaluation of disease activity markers in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Journal of Small Animal Practice*, v. 48, n. 11, p. 620-625, 2007.

MCCLURE, V., VAN SCHOOR, M., THOMPSON, PN, KJELGAARD-HANSEN, M. GODDARD, A. Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 243, n. 3, p. 361-366, 2013.

MEHAL, WAJAHAT Z.; AZZAROLI, FRANCESCO; CRISPE, I. NICHOLAS. Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic T cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic T cell apoptosis. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 2, p. 667-673, 2001.

MÉNDEZ, J. C., CARRETÓN, E., MARTÍNEZ, S., TVARIJONAVICIUTE, A., CERÓN, J. J., MONTOYA-ALONSO, J. A. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology*, v. 204, n. 3-4, p. 420-425, 2014.

MERCK; Germany. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. P.1-63, 2011.

MOUTACHAKKIR, M., HANCHI, A. L., BARAOU, A., BOUKHIRA, A., CHELLAK, S. Caractéristiques immunoanalytiques de la protéine C-réactive et de la protéine C-réactive ultrasensible. In: *Annales de Biologie Clinique*. p. 225-229, 2017.

NAKAMURA, M., TAKAHASHI, M., OHNO, K., KOSHINO, A., NAKASHIMA, K., SETOGUCHI, A., TSUJIMOTO, H. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 70, n. 2, p. 127-131, 2008.

NIELSEN, L., TOFT, N., ECKERSALL, P. D., MELLOR, D. J., & MORRIS, J. S. Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 21, n. 6, p. 1231-1236, 2007.

NIEMI, K., TEIRILÄ, L., LAPPALAINEN, J., RAJAMÄKI, K., BAUMANN, M. H., ÖÖRNI, K., EKLUND, K. K. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome via P2X7 receptor and a cathepsin B-sensitive pathway. *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 11, p. 6119-6128, 2011.

Novagen®pET System Manual 11th Edition. Chemicals Inc

OTONI, C. C., HEILMANN, R. M., GARCÍA-SANCHO, M., SAINZ, A., ACKERMANN, M. R., SUCHODOLSKI, J. S., JERGENS, A. E. Serologic and fecal markers to predict response to induction therapy in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 32, n. 3, p. 999-1008, 2018.

OWCZAREK, B.; GERSZBERG, A.; HNATUSZKO-KONKA, K. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed research international*, v. 2019, 2019.

PEPYS, M. B., HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. *The Journal of clinical investigation*, v. 111, n. 12, p. 1805-1812, 2003.

PEPYS, M. B., BOOTH, S. E., TENNENT, G. A., BUTLER, P. J. G., WILLIAMS, D. G. Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 97, n. 1, p. 152-157, 1994.

PLANELLAS, M., BASSOLS, A., SIRACUSA, C., SACO, Y., GIMÉNEZ, M., PATO, R., PASTOR, J. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. *Veterinary clinical pathology*, v. 38, n. 3, p. 348-352, 2009.

PLOTZ, C.M. SINGER, J.M. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine*. v.21, p.888- 892, 1956.

REIMANN, M. J., LJUNGVALL, I., HILLSTRÖM, A., MØLLER, J. E., HAGMAN, R., FALK, T., OLSEN, L. H. Increased serum C-reactive protein concentrations in dogs with congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. *The Veterinary Journal*, v. 209, p. 113-118, 2016.

RIKIHISA, Y., YAMAMOTO, S., KWAK, I., IQBAL, Z., KOCIBA, G., MOTT, J., CHICHANASIRIWITHAYA, W. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 4, p. 912-917, 1994.

RIPATHI, NAGESH K.; SHRIVASTAVA, AMBUJ. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 7, p. 420, 2019.

ROSANO, Germán L.; MORALES, Enrique S.; CECCARELLI, Eduardo A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein science**, v. 28, n. 8, p. 1412-1422, 2019.

RUSH, J. E., LEE, N. D., FREEMAN, L. M., BREWER, B. C-reactive protein concentration in dogs with chronic valvular disease. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 20, n. 3, p. 635-639, 2006.

SALES P, HALPERN, A., CERCATO C. *O essencial em endocrinologia*, V 1, 2016.

SATO, T., OHNO, K., TAMAMOTO, T., OISHI, M., KANEMOTO, H., FUKUSHIMA, K., TSUJIMOTO, H. Avaliação da gravidade e alterações na concentração de proteína C-reativa e vários biomarcadores em cães com pancreatite. *Journal of Veterinary Medical Science* , v. 79, n. 1, p. 35-40, 2017.

SELTING, K. A, RINGOLD, R., HUSBANDS, B., PITHUA, P. O. Thymidine kinase type 1 and C-reactive protein concentrations in dogs with spontaneously occurring cancer. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 30, n. 4, p. 1159-1166, 2016.

SEVERO, J. S., SANTANA, A. E., AOKI, V., MICHALANY, N. S., MANTOVANI, M. M., LARSSON JR, C. E., LARSSON, C. E. Evaluation of C-reactive protein as an inflammatory marker of pemphigus foliaceus and superficial pyoderma in dogs. *Veterinary dermatology*, v. 29, n. 2, p. 128-e51, 2018.

SHILLING, P. J., MIRZADEH, K., CUMMING, A. J., WIDESHEIM, M., KÖCK, Z., DALEY, D. O. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications biology*, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2020.

SHIMADA, T., ISHIDA, Y., SHIMIZU, M., NOMURA, M., KAWATO, K., IGUCHI, K., JINBO, T. MONITORING. C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Research Communications*, v. 26, n. 3, p. 171-177, 2002.

SHRIVE, A. K., GHEETHAM, G. M., HOLDEN, D., MYLES, D. A., TURNELL, W. G., VOLANAKIS, J. E., GREENHOUGH, T. J. Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nature structural biology*, v. 3, n. 4, p. 346-354, 1996.

SILVESTRINI, P., ZOIA, A., PLANELLAS, M., ROURA, X., PASTOR, J., CERÓN, J. J., CALDIN, M. Iron status and C-reactive protein in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, v. 55, n. 2, p. 95-101, 2014.

SKINNER, J. GORDON; EUROPEAN CONCERTED ACTION GROUP ON ACUTE PHASE PROTEINS. International standardization of acute phase proteins. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 30, n. 1, p. 2-7, 2001.

SOLER, L., GARCÍA, N., UNZUETA, A., PIÑEIRO, M., ÁLAVA, MA, LAMPREAVE, F. Purification and determination of C-reactive protein and inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor heavy chain 4 in dogs after major surgery through generation of specific antibodies. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 179, p. 26-31, 2016.

SPROSTON, NICOLA R .; ASHWORTH, JASON J. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in immunology* , v. 9, p. 754, 2018.

STEEL, D. M.; WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology today*, v. 15, n. 2, p. 81-88, 1994

STUDIER, F. William. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. In: Structural genomics. Humana Press, Totowa, NJ, p. 17-32, 2014.

STUDIER, F.W. ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, v.185 p.60-89,1990.

SZCZUBIAŁ, M., DABROWSKI, R., ŁOPUSZYŃSKI, W., BOCHNIARZ, M., KRAWCZYK, M. Changes in serum neopterin and C-reactive protein concentrations in female dogs with mammary gland tumours. *Polish journal of veterinary sciences*, v. 21, n. 4, p. 691-696, 2018.

TABOR, Stanley. Expression using the T7 RNA polymerase/promoter system. *Current protocols in molecular biology*, v. 11, n. 1, p. 16.2. 1-16.2. 11, 1990.

THOMPSON, DARREN; PEPYS, MARK B.; WOOD, STEVE P. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, v. 7, n. 2, p. 169-177, 1999.

TOMOYASU, T., MOGK, A., LANGEN, H., GOLOUBINOFF, P., BUKAU, B. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Molecular microbiology*, v. 40, n. 2, p. 397-413, 2001.

TORRENTE, C., MANZANILLA, E. G., BOSCH, L., FRESNO, L., RIVERA DEL ALAMO, M., ANDALUZ, A., RUIZ DE GOPEGUI, R. Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 25, n. 5, p. 611-619, 2015.

ULUTAS, B., BAYRAMLI, G., ULUTAS, P. A., KARAGENC, T. BULENT. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Veterinary clinical pathology*, v. 34, n. 2, p. 144-147, 2005.

VENCO, L., BERTAZZOLO, W., GIORDANO, G., PALTRINIERI, S. Evaluation of C-reactive protein as a clinical biomarker in naturally heartworm-infected dogs: a field study. *Veterinary parasitology*, v. 206, n. 1-2, p. 48-54, 2014.

VIITANEN, S. J., LAURILA, H. P., LILJA-MAULA, L. I., MELAMIES, M. A., RANTALA, M., RAJAMÄKI, M. M. Serum C-reactive protein as a diagnostic biomarker in dogs with bacterial respiratory diseases. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 28, n. 1, p. 84-91, 2014.

VREUGDENHIL, A. C., DENTENER, M. A., SNOEK, A. P., GREVE, J. W. M., BUURMAN, W. A. Lipopolysaccharide binding protein and serum amyloid A secretion by human intestinal epithelial cells during the acute phase response. *The Journal of Immunology*, v. 163, n. 5, p. 2792-2798, 1999.

WAGNER, S., BAARS, L., YTTERBERG, A. J., KLUSSMEIER, A., WAGNER, C. S., NORD, O., GIER, J. W. Consequences of membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 6, n. 9, p. 1527-1550, 2007.

WARITANI, TAKAKI; CUTLER, Dawn; CHANG, Jessica. Development of canine C-reactive protein assays. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 62, n. 1, p. 1-5, 2020.

WON, KWANG-AI; CAMPOS, SUSANA P.; BAUMANN, Heinz. Experimental systems for studying hepatic acute phase response. In: *Acute Phase Proteins*. CRC Press, p. 255-271, 2020.

YAMAMOTO S, MIYAJI S, ABE N. Canine C-reactive protein (CRP) does not share common antigenicity with human CRP. *Vet Res Commun*. v.17, p. 259–266,1993.

YAMAMOTO, S., TAGATA, K., NAGAHATA, H., ISHIKAWA, Y., MORIMATSU, M., NAIKI, M. Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 30, n. 4, p. 329-339, 1992.

YAMAMOTO, S., SHIDA, T., MIYAJI, S., SANTSUKA, H., FUJISE, H., MUKAWA, K., FURUKAWA, E., NAGAE, T. NAIKI, M. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications* v.17, p. 85-93, 1993.

YEAGER, MARK P.; GUYRE, P. M.; MUNCK, A. U. Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v. 48, n. 7, p. 799-813, 2004.

YOO, JOO-YEON; DESIDERIO, STEPHEN. Innate and acquired immunity intersect in a global view of the acute-phase response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 3, p. 1157-1162, 2003.

ZHANG, D., SUN, M., SAMOLS, D., KUSHNER, I. STAT3 Participates in Transcriptional Activation of the C-reactive Protein Gene by Interleukin-6. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 16, p. 9503-9509, 1996.

ZHOU, ZHOU; XU, MING-JIANG; GAO, BIN. Hepatocytes: A key cell type for innate immunity. *Cell and Molecule Immunology*, v. 13, n. 3, p. 301-315, 2016.

Khreiss, T., József, L., Hossain, S., Chan, JS, Potempa, LA, & Filep, JG. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 43, p. 40775-40781, 2002.

Khreiss, T., József, L., Potempa, L. A., & Filep, J. G. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. **Circulation**, v. 109, n. 16, p. 2016-2022, 2004.