

## **DESENVOLVIMENTO DE UMA BACTERINA RECOMBINANTE CONTRA ROTAVÍRUS EQUINO**

**LEONARDO BRASIL FIGUEIREDO<sup>1</sup>; ANA VITÓRIA COSTA<sup>2</sup>; NEIDA LÚCIA CONRAD<sup>3</sup>; VITÓRIA MÜLLER<sup>4</sup>; NATÁLIA SILVA PERES<sup>5</sup>; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – leonardo.brasil.08@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – anavitoriacost4@gmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – mullervitoria@hotmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – nataliaapeeres@outlook.com*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil possui o quarto maior rebanho de equinos do mundo e o maior da América Latina, com ~ 5.800.000 cabeças, no ano de 2023 (IBGE, 2023). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a equinocultura movimenta aproximadamente R\$30 bilhões anualmente, por essa razão é importante garantir à saúde e bem-estar desses animais para que não haja perdas econômicas e nem surtos de doenças infecciosas.

Dentre os principais patógenos víricos que acometem os equinos está o Rotavírus. O Rotavírus equino (RVE) pertencente à família *Reoviridae*, sendo não envelopado, e caracterizado por possuir um genoma composto por 11 segmentos de fita dupla de RNA (dsRNA) que codificam 12 proteínas estruturais e não estruturais do vírus (DHAMA et al., 2009; CARSTENS, 2010). O sequenciamento do genoma do RVE aponta que as cepas G3P[12] e G14P[12] são as principais causadoras dos casos clínicos atuais em equídeos (UPRETY, 2021). Rotavirose equina se caracteriza pela multiplicação do vírus nas células do intestino delgado, destruindo-as e atrofiando as vilosidades, ocasionando a má absorção de nutrientes, levando a diarreia, letargia, perda de peso e desidratação. Essa debilitação do equino faz com que se torne mais vulnerável à entrada de outros agentes infecciosos, o que agrava significativamente a doença (BAILEY, 2013). Em equinos, o ERV pode acometer potros de até seis meses, apresentando maior incidência em animais com menos de três meses de idade (MAGDESIAN, 2005). Potros mais jovens (2-4 meses) são especialmente vulneráveis aos sintomas da doença, devido à falta de desenvolvimento total do sistema imunológico (FELIPPE, 2023).

Atualmente existem três vacinas mundialmente licenciadas contra RVE, uma desenvolvida na Argentina, outras nos Estados Unidos e Japão. No entanto são vacinas derivadas da cepa G3P[12] (BAILEY, 2013). Estudo recente apontam surtos de diarreias oriundos da cepa G14P[12], inclusive em potros nascidos de éguas já vacinadas contra a cepa G3P[12] (UPRETY, 2024). Devido à falta de um imunizante contra a cepa G14P e dificuldade de importar vacinas contra o ERV, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão heteróloga em *Escherichia coli* de uma quimera recombinante composta de epítopos do RVE e sua utilização como bacterina capaz de induzir a imunidade protetora ao RVE.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Expressão e caracterização da proteína recombinante**

O plasmídeo sintético contendo a sequência do gene de interesse foi utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* C41(DE3). As células recombinantes foram selecionadas em placa contendo o meio ágar Luria Bertani (LB) suplementado com Ampicilina (Sigma Aldrich). Posteriormente, foi selecionada uma colônia recombinante para o cultivo do pré-inóculo, em Erlenmeyer com 30 ml de meio LB com ampicilina (37 °C, 150 rpm, por dezesseis horas).

O pré-inóculo foi transferido para 500 ml de meio LB e Ampicilina (100 µg/mL) e mantidos sob agitação de 150 rpm a 37 °C, até atingir a densidade óptica (D.O. 600 nm) entre 0,6 - 0,8. Após os cultivos atingirem a concentração mencionada, a expressão da proteína recombinante foi induzida com a adição de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosideo) 1mM, retornando às mesmas condições por quatro horas.

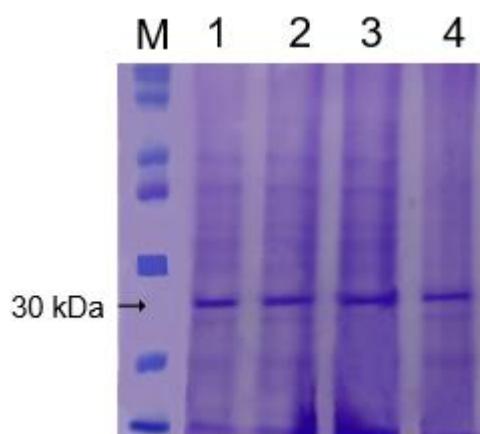
O cultivo foi centrifugado e o precipitado (*pellet*) foi suspenso em solução salina 0,9%, e adicionado formaldeído 0,4% e incubado 37 °C sob agitação por dezesseis horas. Posteriormente, a suspensão foi semeada em meio de cultura para confirmar a inativação das células de *E. coli*.

A expressão e a caracterização da proteína recombinante foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Após eletroforese, o gel foi corado com *Comassie blue* para a visualização do perfil proteico das amostras.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Bacterinas oferecem benefícios na otimização de vacinas recombinantes pelo menor custo de produção caracterizados pelo menor tempo em sua produção, mão de obra não especializada, segurança, e volume de produção (WALKER, 2005). Na produção de bacterinas a inativação tem como função desativar as funções biológicas do microrganismo, entretanto, sua estrutura e componentes continuem capazes de estimular o sistema imune (BRAZ *et al.*, 2014). Desta forma, as bacterinas entregam antígenos vacinais de forma eficaz e segura (WESTCOTT, 2024).

Neste estudo obteve-se a expressão da proteína recombinante de REV em células de *E. coli* (Fig. 1).



**Figura 1. Caracterização da proteína recombinante.** A figura representa eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12 % de culturas de *E. coli* recombinante após indução. (M) Marcador Molecular *Precision Plus Protein Standard* (Bio-rad Laboratories); (1) e (3) Expressão da proteína recombinante sem inativação; (2) e (4) Expressão após inativação com formol 0,4%.

Na figura 1 podemos observar que as proteínas expressas, anterior e posterior à inativação apresentaram uma massa molecular de ~30 kDa, indicando que não houve degradação da proteína após a inativação das células de *E. coli* com o formol. Sendo assim, observou-se que o processo de inativação para a produção da bacterina é capaz de inativar as células bacterianas e preservar a estrutura e propriedades da proteína recombinante.

#### 4. CONCLUSÕES

A expressão da proteína recombinante foi realizada com sucesso, bem como, o processo de inativação da *Escherichia coli*. sendo assim, o desenvolvimento de uma vacina recombinante proveniente da inativação de células inteiras de *E. coli* recombinante (bacterina) pode ser uma alternativa capaz de induzir imunidade protetora contra o Rotavírus equino.

Futuramente serão realizados testes para avaliar a imunogenicidade em equinos vacinados com a bacterina, caracterizando e avaliando a resposta imune vacinal.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAZ, L.C.C. et al. Contribuições da biotecnologia no desenvolvimento e produção de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. **Saúde e Ciência**. v. 3, n. 3, p. 198-206, 2014.

CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). **Archives of Virology**, v. 155, n. 1, p. 133–146, 2010.

DHAMA, K., CHAUHAN, R.S., Mahendran, M. et al. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary Research Communications**, 33, 1–23 (2009).

FELIPPE, M. J. B. IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS EM EQUINOS. **Veterinária e Zootecnia, Botucatu**, v.20, p.60-72, 2023.

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, acessado em <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equininos/br>, 2024.

MAGDESIAN, K. G. Neonatal foal diarrhea. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 21, p. 295-312, 2005.

UPRETY, Tirth et al. "Genetic and antigenic characterization of two diarrhoeic dominant rotavirus A genotypes G3P[12] and G14P[12] circulating in the global equine population." ***The Journal of General Virology*** vol. 105,8 2024.

WALKER, Richard I. Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries. ***Vaccine***, v.23, n.26, p.3369-3385, 2005.

WESTCOTT, M. M. et al. The immunogenicity and properties of a whole-cell ETEC vaccine inactivated with psoralen and UVA light in comparison to formalin. ***Microorganisms***, v. 11, n. 8, p. 2040, 2023.