

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Agrárias
Propaga de Pós-Graduação em Produção Animal

Eric Ribeiro Madureira

**EXPRESSÃO GÊNICA INTESTINAL DE UMA VACINA DE DNA VIA ORAL
UTILIZANDO DOIS MÉTODOS DE PROTEÇÃO EM TILÁPIA-DO-NILO.**

**Montes Claros
2020**

Eric Ribeiro Madureira

**EXPRESSÃO GÊNICA INTESTINAL DE UMA VACINA DE DNA VIA ORAL
UTILIZANDO DOIS MÉTODOS DE PROTEÇÃO EM TILÁPIA-DO-NILO.**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Diego Vicente da Costa

Coorientadores:

Mariana Martins Drumond
Junio Cota Silva

Montes Claros - MG
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

	Madureira, Eric Ribeiro.
R484e 2020	Expressão gênica intestinal de uma vacina de DNA via oral utilizando dois métodos de proteção em Tilápia-do-Nilo [manuscrito] / Eric Ribeiro Madureira. Montes Claros, 2020. 46 f. : il. Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Animal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias. Orientador: Diego Vicente da Costa. Banca examinadora: Diego Vicente da Costa, Mariana Martins Drumond, Pmale Del Carmen Macha Agresti, Gilmar Junqueira Machado, Junio Cota Silva. Inclui referências: f. 41-44 1. Peixe -- Criação -- Teses. 2. Microencapsulação -- Teses. 3. Liofilização -- Teses. 4. Fluorescência -- Teses. 5. Peixes -- Vacinação -- Teses. I. Costa, Diego Vicente da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título. CDU: 639.3



Universidade Federal de Minas Gerais
 Instituto de Ciências Agrárias
 Colegiado de Pós-Graduação em Produção Animal

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 19 dias do mês de novembro de 2020 às 08:00 horas, sob a Presidência do Professor Diego Vicente da Costa, D. Sc. (Orientador – ICA/UFMG) e com a participação dos Professores Mariana Martins Drumond, D. Sc. (Coorientadora – Centro Federal de Educação Tecnológica de MG), Junio Cota Silva, D. Sc. (Coorientador – ICA/UFMG - Suplente), Pamela Del Carmen Mancha Agresti, D. Sc. (Faminas/BH) e a Pós-doutoranda Gilmara Junqueira Machado, D. Sc. (UFLA) reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação de **ERIC RIBEIRO MADUREIRA**, aluno do Curso de Mestrado em Produção Animal. O resultado da defesa de dissertação intitulada “_____”

Expressão gênica intestinal de uma vacina de DNA via oral utilizando dois métodos de
proteção em tilápia-do-Nilo

_____”,
 sendo o aluno considerado (aprovado/reprovado) Aprovado. E, para constar, eu, Professor Diego Vicente da Costa, Presidente da Banca, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 53 do regulamento e da resolução 05/2016 do Curso de Mestrado em Produção Animal.

Montes Claros, 19 de novembro de 2020.

Diego Vicente da Costa
 Orientador

Mariana Martins Drumond
 Coorientadora

Pamela Del Carmen Mancha Agresti
 Membro

Gilmara Junqueira Machado
 Membro

Junio Cota Silva
 Coorientador
 Suplente

RESUMO

O controle e manejo de doenças que acometem a piscicultura mundial, a exemplo das causadas por protozoários, parasitas, vermes, bactérias oportunistas e fungos, é um pré-requisito para a sustentabilidade desse setor produtivo e, um desafio constante, muito complexo e atualmente, limitado de produtos eficazes de tratamento. Além disso, alevinos e juvenis são ainda mais suscetíveis, de maneira geral, a surtos dessas doenças, por terem o sistema imunológico ainda em formação, de modo que, a sobrevivência desses animais depende de estratégias multidisciplinares de manejo adequado de sua saúde, nutrição, da qualidade da água e de medidas de biossegurança. Portanto, se faz necessária a ênfase em prevenção e não somente em tratamento. Por esses motivos, vacinas de DNA ganham atenção crescente, devido a superarem desvantagens de outros tratamentos preventivos, em geral de maneira mais eficiente. Elas funcionam expressando no hospedeiro, diferentes proteínas de patógenos, codificadas em vetores plasmídeos. As vacinas comerciais licenciadas atualmente são relativamente caras, o que não gera estratégias amplas de vacinação. Foi avaliada a funcionalidade do plasmídeo vetorial pExu, transformado na linhagem *Lactococcus lactis* MG 1363, em peixes. Esta vacina gênica *L. lactis* MG1363 (pExu:mCherry) foi fornecida, por via oral, através de microencapsulamento ou liofilização, para a espécie Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), de elevado interesse comercial. Para tanto, 108 juvenis machos de Tilápia-do-Nilo com peso de 250 ± 20 g foram utilizados. O equivalente a 1 dose (1×10^9 UFC) foi administrado por via oral [microencapsulado (administração direta) e liofilizado (incorporado à ração comercial)] aos animais e, a área que apresentava fluorescência, foi comparada, nas três seções intestinais (Anterior, Média e Posterior), nos períodos de 6, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144, e 168 horas após a administração. Ambos os métodos avaliados permitiram a expressão do gene repórter em todas as regiões de interesse. Houve, no entanto, diferença significativa ($p < 0.001$) na área de expressão média por seção intestinal, de modo que a seção Posterior apresentou menor expressão em relação às outras duas seções, tanto quando avaliado o microencapsulamento quanto a liofilização (redução de 40% e 87%, respectivamente). No entanto, a expressão da proteína mCherry se mostrou mais eficiente pelo método de liofilização que pelo microencapsulamento ($p < 0.001$), ao apresentar, aproximadamente, áreas de fluorescência 25 mil, 13 mil e 4 mil por cento maiores, nas seções Anterior, Média e Posterior, respectivamente. O método de microencapsulamento e liofilização apresentaram amplitude máxima da expressão no intervalo de 24 horas e 96 horas, respectivamente. Tais descobertas são importantes pois irão guiar pesquisas sobre novas estratégias com vacinas de DNA, em especial, as fornecidas oralmente.

Palavras-chave:

Piscicultura, mCherry, Microencapsulamento, Liofilização, Fluorescência, Cinética, Vacinação oral.

ABSTRACT

The control and management of diseases that affect global pisciculture, such as those caused by protozoa, parasites, worms, opportunistic bacteria and fungi, is a prerequisite for the sustainability of this productive sector and a constant challenge, very complex and currently, limited of effective treatment products. In addition, fingerling and juvenile are even more susceptible, in general, to outbreaks of these diseases, as their immune systems are still in formation, so their survival relies on multidisciplinary strategies for the proper management of their health, nutrition, water quality and biosafety measures. Therefore, emphasis on prevention and not only just treatment is necessary. For these reasons, DNA vaccines are gaining increasing attention, due to overcoming disadvantages of other preventive treatments, generally more efficiently. They work by expressing different pathogen proteins in the host, encoded in plasmid vectors. Licensed commercial vaccines today are relatively expensive, which does not generate extensive vaccination strategies. It was evaluated the functionality of the plasmid pExu vector transformed in *Lactococcus lactis* MG 1363 strains, for fish. This genic *L. lactis* MG1363 (pExu:mCherry) vaccine was offered orally by either microencapsulation or lyophilization, for the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), of elevated commercial interest. 108 Nile tilapia male juveniles, weighing 250 ± 20 g were utilized. 1 dose (equivalent of 1×10^9 CFU) were administrated orally [microencapsulated (direct administration) and lyophilized (incorporated into fish feed)] to the animals, and the area that presents fluorescence were compared in three intestinal sections (Anterior, Medium, Posterior) at 6, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144, e 168 hours after administration. Both methods allowed the expression of the reporter gene in all regions of interest. Statistical difference was observed ($p < 0.001$) in mean área of expression from different sections, so that the Posterior section presented inferior expression in relation to others, either by microencapsulation or lyophilization (40% and 87% reduction, respectively). mCherry protein expression was more efficient with lyophilization than microencapsulation ($p < 0.001$), by express, in average, fluorescence areas 25 thousand, 13 thousand and 4 thousand percent higher, on Anterior, Medium and Posterior sections, respectively. Microencapsulation and lyophilization presented maximum amplitude of expression in the 24 hours and 96 hours intervals, respectively. Such findings are important because they will guide research on new strategies with DNA vaccines, especially those given orally.

Key words:

Pisciculture, mCherry, Microencapsulation, Lyophilization, Fluorescence, Kinetics, Oral vaccination.

Sumário

INTRODUÇÃO	8
OBJETIVOS	9
Objetivo Geral.....	9
Objetivos Específicos	9
REVISÃO DE LITERATURA	10
O setor da piscicultura	10
Principais doenças que afetam a piscicultura	11
Vacinas de DNA	11
Vantagens das vacinas de DNA	13
Desvantagens da Vacina de DNA	13
Vacinas de DNA licenciadas atualmente	14
Necessidade de pesquisa sobre nova vacina.....	14
A técnica de microencapsulamento	15
A técnica de Liofilização	16
Vacinação oral	16
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 1	22
Expressão gênica intestinal de uma vacina de DNA via oral utilizando dois métodos de proteção em Tilápia-do-Nilo.	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
ANEXO	47

1. INTRODUÇÃO

Diversas alternativas contra doenças biológicas na piscicultura são pesquisadas atualmente e, entre as mais promissoras, estão as chamadas “vacinas de DNA”, porque induzem tanto a resposta imune inata, quanto a não-específica e adaptativa, necessárias no combate ao patógeno, sendo que, geralmente, apresentam sobrevivência porcentual relativa (SPR) maior. Todavia, as vacinas já existentes no mercado são demasiado caras, se tornando pouco acessíveis a grande maioria dos piscicultores, a exemplo do que acontece no Brasil. Ademais, muitas estratégias para a vacinação de DNA ainda estão em fase de desenvolvimento, sendo que, geralmente, essas carecem de adaptações, especialmente para as realidades de mercado.

As vacinas de DNA carregadas por bactérias não-patogênicas, após administradas, ingressam nas células do hospedeiro e atingem o núcleo celular, aonde será realizada a transcrição de uma ORF (*Open Reading Frame*, em inglês), que é uma sequência de nucleotídeos codificadora de uma proteína de interesse. No caso, pode-se expressar uma proteína no hospedeiro, que confira antigenicidade a um determinado patógeno. Para expressar o gene de interesse, o promotor de citomegalovírus (pCMV) escolhido, permite que a RNA polimerase do hospedeiro transcreva a sequência de interesse e, em seguida, seja traduzida a proteína, pelo maquinário celular do próprio hospedeiro. Isso possibilita uma estratégia de prevenção, uma vez que, sendo o material genético expresso por um curto período de tempo no hospedeiro, gere elevada resposta imune a determinado patógeno.

O plasmídeo “pExu” é formado pela fusão de dois replicons, um proveniente do plasmídeo comercial pCDNA3.1 (Invitrogen) fornecendo: (i) promotor do citomegalovírus (pCMV) que permite a transcrição e consequente expressão do antígeno de interesse em células eucarióticas, (ii) sequências de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento (*Bovine Growth Hormone*, em inglês) para estabilizar o transcrito do RNA mensageiro e (iii) o sítio de múltipla clonagem (*Multiple Cloning Site*, em inglês), que permite que o DNA externo, de interesse, seja inserido no plasmídeo; o outro replicon, proveniente do plasmídeo pL253, fornece as origens de replicação as quais permitem a propagação do plasmídeo, tanto em *Escherichia coli*, quanto em *Lactococcus lactis*, com também, um gene de resistência ao antibiótico eritromicina, para a seleção de linhagens recombinantes.

Nesse referido plasmídeo, a ORF codificadora da proteína vermelho-fluorescente “mCherry”, clonada no vetor pExu foi transfectada em linhagens de *L. lactis* MG1363, que atuam como veículo de entrega deste plasmídeo vacinal (pExu:mCherry), a fim de se avaliar a eficácia dessa construção para a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma das principais espécies da piscicultura mundial e de grande relevância comercial. Além disso, a administração dessa construção foi testada por dois diferentes métodos: *i*) por microencapsulamento, via alimentação direta e, *ii*) por liofilização, através da incorporação na ração comercial, de modo que ambos isolam, de maneiras distintas, o composto vacinal orgânico.

Tudo isso, a fim de se obter a melhor combinação dentre as metodologias, para a administração oral da vacina, com objetivo de, posteriormente, desenvolver uma alternativa de melhor relação custo-benefício no combate a diferentes patologias que acometem a piscicultura mundial, haja visto que os desdobramentos dessa pesquisa irão ajudar a nortear futuras pesquisas com a utilização de diferentes vacinas de DNA, carregadas por bactérias lácticas, passíveis de ser suplementadas em ração comercial para peixes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar dois diferentes métodos de administração de uma linhagem recombinante de *L. lactis* MG1363, carreando o plasmídeo pExu:*mCherry* em células intestinais de Tilápia-do-Nilo.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a funcionalidade do plasmídeo pExu:*mCherry* em peixes.
2. Avaliar a expressão do gene repórter via dois diferentes métodos de proteção (microencapsulamento e liofilização).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O setor da piscicultura

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization*, FAO, em inglês) (2018), o crescimento da população mundial, a preocupação com a segurança alimentar e o interesse cada vez mais intenso em relação à sustentabilidade ambiental estão entre os principais desafios a serem enfrentados pelos países para as próximas décadas, sendo que, para o ano de 2050, estima-se que a população mundial seja de 9 bilhões de pessoas e, para alimentar este crescente número de indivíduos, a produção anual de carnes deverá aumentar em mais de 200 milhões de toneladas, até alcançar a marca dos 470 milhões.

A produção de pescados é dividida entre a pesca extrativa e a aquicultura. A pesca extrativa é uma atividade baseada na retirada de recursos pesqueiros do ambiente natural enquanto a aquicultura é o cultivo, normalmente em um espaço confinado e controlado, de organismos aquáticos, tais como peixes, crustáceos, moluscos, algas, répteis e qualquer outra forma de vida aquática de interesse econômico, sendo que a atividade produtiva da aquicultura ainda se divide em diferentes modalidades: piscicultura (criação de peixes); carcinicultura (criação de camarões); ranicultura (criação de rãs); malacocultura (criação de moluscos, ostras e mexilhões); algicultura (cultivo de algas) e outras espécies com menor apelo comercial, tais como a quelonicultura (criação de tartarugas e tracajás) e a criação de jacarés (EMBRAPA, 2017).

Desde 2004, a produção brasileira de pescados (particularmente da tilápia, *Oreochromis sp.*) apresentou crescimento anual médio de 14,2%, despontando-se como uma atividade emergente na cadeia produtiva de proteína animal, devido essa espécie ser uma das poucas na piscicultura que consegue se adaptar a diferentes ambientes com níveis de salinidade intermediários, bem como a sua melhor adaptação a diferentes condições climáticas, alimentação onívora, tempo relativamente baixo de produção e maior resistência a doenças e qualidade superior da carne (EMBRAPA, 2017).

Dessa forma, a produção brasileira de pescado vem se especializando na criação e na exploração da tilápia, transformando-a na principal espécie aquícola cultivada no Brasil (EMBRAPA, 2017). Com isso, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) incluiu, no ano de 2013, a aquicultura, na sua Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) (IBGE, 2016) e, segundo último levantamento desse Instituto (2019), a produção nacional de tilápia nesse ano foi de 323 milhões de toneladas.

Em 2016, segundo a FAO (2018), em sua publicação bianual “*The State of World Fisheries and Aquaculture*” evidenciou que o crescimento da aquicultura, em poucos anos, se tornou cerca de 44% da produção mundial de pescado, ou seja, praticamente metade da produção de pescado no mundo advinha da aquicultura e não mais da pesca extrativa.

A FAO (2017) estimou que a produção de tilápia passou a estar presente em mais de 140 países e, com um valor de mercado na ordem dos 12 bilhões de dólares. Ainda segundo essa publicação, a tendência é que, de acordo com o crescimento previsto da população mundial e demonstrado pela tilapicultura, essa espécie passe a ganhar ainda mais espaço na produção nacional, por meio da busca de mercado interno, bem como nas exportações para o mercado externo.

3.2 Principais doenças que afetam a piscicultura

Mesmo com a sinalização positiva da aquicultura por parte da FAO (2017), existem desafios para desenvolver a cadeia produtiva como um todo, de forma a sustentar tal crescimento. Um importante exemplo disso são as doenças que comprometem o bom desempenho zootécnico dos animais, gerando prejuízos consideráveis à atividade aquícola.

FARUK et al., (2017) fizeram uma revisão sobre as principais doenças biológicas causadoras de prejuízos econômicos à piscicultura global. Eles ressaltam que tais doenças se tornaram um dos principais fatores limitantes do crescimento desse setor no mundo e a maior causa individual de prejuízo econômico aos piscicultores globais. Segundo eles, algumas das doenças mais comuns incluem a síndrome ulcerativa epizootica, necrose da cauda e da nadadeira, necrose branquial bacteriana, septicemia hemorrágica bacteriana, doença da columnaris, hidropisia, bem como vários tipos de doenças fúngicas e parasitárias. Segundo esses autores, tais doenças são associadas a altas densidades no cultivo, deterioração da qualidade da água, excesso de arraçoamento e de fertilizantes artificiais, devido ao fato de causarem condições ambientais mais favoráveis para desenvolvimento desses patógenos.

Ainda segundo essa pesquisa, as doenças parasitárias em viveiros são um dos fatores mais importantes que limitam o crescimento e a sobrevivência de alevinos e juvenis; as doenças virais causam sérios problemas em todos os aspectos da aquicultura; doenças causadas por esporozoários endoparasitários são uma preocupação séria em fazendas produtoras de juvenis e alevinos e; em cada tipo de cultivo e, para praticamente todas as espécies, patógenos bacterianos específicos são responsáveis por problemas graves e recorrentes. Essas doenças, em especial as de origem bacteriana, também estão entre as principais que acometem a produção no Brasil (FIGUEIREDO e LEAL, 2008).

Assim, dependendo da natureza, severidade e extensão do surto da doença, essa pode causar mortalidade em massa, reduzir o crescimento, a qualidade do produto final e possivelmente, estender a contaminação para fora da área de cultivo (FARUK et al., 2017). Desse modo, ainda se faz necessário desenvolver novas estratégias de manejo, a exemplo do manejo preventivo, no combate às várias doenças biológicas que acometem o setor da piscicultura. Nesse sentido, destaca-se a vacinação, estratégia preventiva bem aceita na piscicultura, mas que ainda carece de estudos mais abrangentes.

3.3 Vacinas de DNA

De acordo com KANO et al., (2007), a vacinação é a medida mais eficiente e menos dispendiosa para evitar doenças infecciosas e diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas, enquanto que a vacinação com DNA é uma das mais promissoras técnicas de imunização contra uma variedade de patógenos, para os quais os métodos convencionais não têm sido eficientes, devido ao fato dessas vacinas serem capazes de induzir resposta imune humoral (anticorpos) e celular, tanto para resposta de linfócitos CD4⁺ quanto CD8⁺, sem a necessidade de utilização de patógenos vivos, potencialmente causadores de enfermidades. Com os novos conhecimentos da imunologia, para uma vacina ser considerada eficiente hoje, precisa ativar linfócitos T auxiliares, que por sua vez ativam linfócitos B, a produzir anticorpos específicos, bem como produzir células citotóxicas potentes, sendo que as células T auxiliares também geram inúmeras células de memória que rapidamente

são mobilizadas quando ocorre a penetração do agente infeccioso no organismo (KALIL et al., 2008).

A primeira vacina de DNA foi descrita em 1990, quando um plasmídeo contendo um gene repórter que codifica a *â-galactosidase* expressou uma proteína antigênica após a inoculação direta no músculo de camundongos (WOLFF et al., 1990). A administração de uma única dose de plasmídeo vacinal pode proporcionar um amplo espectro de resposta imune, incluindo a ativação dos linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺, os quais secretam citocinas e têm função reguladora na produção de anticorpos (KOWALCZYK; ERTL, 1999). O sucesso da imunização com DNA depende, principalmente, da natureza dos antígenos, da frequência e via de administração, da concentração de DNA administrada, da localização celular do antígeno codificado pelo plasmídeo (secretado, ligado à membrana ou citoplasmático), da idade e saúde do hospedeiro e da espécie do animal vacinado (MOREL et al., 2004).

O material genético dos microrganismos, no entanto, é pouco estável na célula eucariótica devido ao tamanho da molécula de DNA e à repulsão existente entre as cargas negativas da membrana da célula e do DNA e, quando o material genético não é transfectado à célula, rapidamente é degradado pelas nucleases do hospedeiro (LEVY et al., 1996) e não haverá produção de anticorpos pela ausência da expressão proteica (KANO et al., 2007).

Para facilitar a entrada do DNA na célula do hospedeiro, são utilizadas em geral, partículas virais e lipossomas (PERKINS et al., 2005). Alguns dos vetores utilizados nas vacinas de DNA são os plasmídeos bacterianos, desenvolvidos, originalmente, para expressão *in vitro* de proteínas em células de mamíferos (DAVIS, 1999). Tais plasmídeos apresentam maior segurança biológica, menor custo, facilidade na produção, relativa estabilidade e capacidade genômica (de 2 a 19 kilobases), que podem ser transferidos para as células do hospedeiro.

A tecnologia do DNA recombinante permite ainda, modificações nas sequências gênicas, objetivando a melhoria na resposta imunológica do hospedeiro, tais como incorporações de sequências imunoestimulatórias (ISS), sequências de genes que codificam interleucinas e genes virais que codificam proteínas que melhoram sua propagação em células (ZHENG et al., 2005).

De modo que, resumidamente, uma vacina que seja baseada na tecnologia do DNA recombinante, envolve a transferência de um determinado gene (transgene), que codifica uma proteína (imunógeno), dentro de um vetor de expressão para células eucarióticas (WAINE, 1995). Uma vacina de DNA ideal deve promover grande resposta imunológica; ser de fácil produção; direcionar a resposta imune para tipos específicos de células; não permitir replicação autônoma do DNA; garantir uma expressão gênica por longo período; não ser tóxica; e não induzir reações autoimunes nos hospedeiros (GLENTING, 2005).

Os plasmídeos utilizados como vacinas para esses fins devem conter também os seguintes elementos essenciais: i) um promotor de expressão para células de mamíferos; ii) sinal de poliadenilação (poliA) do transcrito (mRNA), iii) um marcador de seleção; iv) uma origem de replicação bacteriana e v) sítio de múltipla clonagem onde será inserida a ORF ou o gene de interesse, sendo que, outras sequências também são relevantes, tais como por exemplo, um intron, que aumenta a atividade do promotor e um sinal peptídico e/ou sequências de nucleotídeos, com função imunoestimulatória (GLENTING, 2005).

3.3.1 Vantagens da vacina de DNA

A principal vantagem da vacina de DNA é que ela induz a produção de anticorpos e de resposta imune celular, tanto linfócitos T auxiliares (CD4⁺) quanto T citotóxicos (CD8⁺) (NAGATA et al., 2004). Adicionalmente, ainda segundo esses autores, estas vacinas não apresentam risco de reversão da atenuação e podem ser produzidas contra agentes infecciosos de difícil cultivo e, podem ainda, ser coadministradas para multiagentes de um determinado patógeno.

Além disso, o custo de produção das vacinas gênicas em larga escala é consideravelmente menor ao custo de produção das vacinas compostas de fração subcelular, proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos (ROBINSON, 1997). O controle de qualidade é mais fácil, assim como a comercialização, pelo fato de não necessitar de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente e podem inclusive ser liofilizadas (WAINE, 1995).

Estes fatores podem facilitar o transporte, a distribuição e o estabelecimento de amplos programas de imunizações em regiões de difícil acesso, o que seria interessante para a realidade brasileira e de outros países em desenvolvimento (GLENTING, 2005). Por fim, a imunidade adquirida pela vacina de DNA persiste por longo período de tempo, devido à constante produção endógena do antígeno pela célula hospedeira e a capacidade destes antígenos de estimularem linfócitos de memória imunológica (SNADEEP et al., 1996).

Outra vantagem a ser destacada sobre esta plataforma é obtida quando são utilizadas bactérias lácticas (BL) na formulação, como as carreadoras dos vetores, que serão fornecidos oralmente, devido não somente a maior capacidade resistiva contra o sistema digestivo, como também por serem promotores de benefícios a saúde do hospedeiro, ou ainda, por reduzirem possíveis efeitos colaterais oriundos dessa técnica, a exemplo de possíveis modificações do gene ou produto, após sua tradução (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2013).

As BL são um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas que incluem espécies de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, que não geram resposta inflamatória no hospedeiro como no caso da *Escherichia Coli*. Por serem Gram-positivas, não apresentam lipopolissacarídeos endotóxicos (LPS) (BAHEY-EL-DIN et al., 2010), logo, existem menos proteínas nativas para, potencialmente, contaminar amostras (KUNJI et al., 2003, NOUAILLE et al., 2003).

Além disso, a clonagem de proteínas eucarióticas em *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) tem potencial para superar problemas associados à localização das proteínas utilizadas na célula hospedeira (BERMÚDEZ-HUMARÁN et al., 2008). Outras vantagens da utilização de *L. lactis* incluem o aumento da produção de folato pela rota da biossíntese de folato (SYBESMA et al., 2003), que, posteriormente, contribui para o fortalecimento do sistema imunológico (FISHMAN et al., 2000).

3.3.2 Desvantagens da Vacina de DNA

Há riscos na utilização de vacinas de DNA que vêm sendo mais bem avaliados, tais como a integração do plasmídeo ao genoma hospedeiro, gerando mutagênese pela ativação de protoncogenes, ou, pela inativação de genes supressores de tumores, enquanto outros riscos

incluem a possível indução de alergias, devido à apresentação do antígeno em longo prazo, ou reações autoimunes, devido à indução de anticorpos anti-DNA (KANO et al., 2007).

Outra razão em detrimento da vacina de DNA é devido a essas terem sido menos potentes que as vacinas vivas atenuadas, pois não se distribuem no organismo do hospedeiro de maneira uniforme entre as células inicialmente transfectadas e, por isso, esforços têm sido realizados para aumentar o trânsito intracelular do antígeno, explorando a capacidade de espalhamento célula-célula do vetor, sendo que pesquisas têm focado na construção funcional das vacinas de DNA, em função do limitado conhecimento científico sobre a segurança biológica das mesmas, pois, estudos pré-clínicos ainda devem ser enfatizados para a avaliação da segurança destas vacinas antes do uso comercial (BRAZ et al., 2014).

Estudos sugerem uma grande preocupação com vetores de DNA plasmídeos, que é a possível integração do DNA externo ao genoma do hospedeiro, pois, geralmente, a razão de diploides celulares alterados naturalmente está na ordem de 1 a 30 cópias/ μg de DNA, embora essa possa ser modificada devido à utilização da eletroporação como etapa da formulação da vacina de DNA (LEDWITH et al., 2000).

Todavia, resultados indicam que essa é uma preocupação apenas teórica e que essa técnica é segura quanto a essa questão (WANG et al., 2004, BRAVE et al., 2010), pois, uma única cópia (μg) integrada indesejavelmente (equivalente a cerca de 150 mil diploides celulares) com essa técnica é, pelo menos, três ordens de magnitude menor que a própria mutação espontânea do DNA (LEDWITH et al., 2010), além de que isso não foi observado em peixes (KANELLOS et al., 1999).

3.3.3 Vacinas de DNA licenciadas atualmente

No Brasil, segundo o relatório de produtos com licença vigente, da coordenação de fiscalização de produtos veterinários, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mais recente (2014), 379 vacinas para uso veterinário e zootécnico estão licenciadas no Brasil atualmente, dentre as de origens nacionais ou importadas. Em setembro de 2020, segundo a lista de processos de registro de produtos veterinários biológicos aguardando análise, também do MAPA, 108 produtos biológicos para uso veterinário e zootécnico, dentre eles, novas vacinas, aguardam, em tramitação, com pedidos de registro.

3.3.4 Necessidade de pesquisa sobre nova vacina

Doenças zootécnicas preveníveis com vacinas já existentes ainda são um desafio, mesmo em países desenvolvidos (CARSON et al., 2010), pois, há diversos tipos de barreiras contra a imunização devida e em escala (DOLAN et al., 2016), de modo que mais otimização se faz necessária antes que a vacina de DNA se torne uma estratégia predominante/abrangente de vacinação (SUSCHAK et al., 2017).

De acordo com LI et al., (2006), a administração da vacina de DNA utilizando a inoculação direta do plasmídeo pelas vias intratraqueal, intravenosa, intrabursal, intraorbital, intradérmica, intramuscular, oral, subcutânea e via mucosa demonstraram sucesso na indução da resposta imune em todas as vias testadas, entretanto, algumas vias proporcionaram maior ou menor nível de expressão de antígenos influenciando diretamente na imunogenicidade da mesma, de modo que os níveis de expressão dos antígenos obtidos pelas diferentes vias de administração parecem estar principalmente relacionados com a quantidade de células

transfectadas obtidas após administração dos plasmídeos e portanto, aprimoramentos nos vetores têm sido realizados, para melhorar a potência da vacina, tais como alteração no vetor para aumentar a eficiência do promotor, além de mais proteção dos componentes.

3.3.5 Métodos de proteção da vacina: Microencapsulamento

Os microrganismos probióticos utilizados como veículos de entrega de vetores plasmídeos são sensíveis a mudanças extremas de pH, calor, oxigênio e outros fatores, de modo que encontram dificuldades de viabilidade perante condições adversas, tais como pela ação de degradação enzimática do sistema digestivo (GOH et al., 2012). Esses têm que resistir a barreira gástrica, secreções entéricas, muito comuns na seção intermediária do intestino delgado, tais como mucos, lisossomos, e diversos tipos de lipases (HARWIG et al., 1995), ou ainda às secreções das células de Paneth como também aos sucos pancreáticos e biliares (MALLOW et al., 1996).

Diferentes técnicas para aumentar a resistência desses microrganismos contra condições adversas têm sido propostas. A microencapsulação por exemplo, pode ser definida como a tecnologia de recobrir partículas ou pequenas gotas de material líquido ou gasoso, formando cápsulas em miniatura, as quais podem liberar seu conteúdo em taxas controladas e/ou sob condições específicas, de modo que os propósitos gerais da microencapsulação, consistem na possibilidade de fazer um líquido comportar-se como sólido, separar materiais reativos, reduzir a toxicidade do material ativo, controlar a liberação do material, reduzir volatilidade de líquidos, mascarar gostos de componentes amargos, aumentar o tempo de prateleira dos produtos e protegê-los contra a ação da luz, água, calor, ou ainda, cabe salientar a importância de aumentar sua resistência à ação do sistema digestivo (MIRZAEI et al., 2012).

Tais microcápsulas podem apresentar tamanho na faixa de frações de micron até vários milímetros, possuindo diferentes formas, dependendo dos materiais e métodos utilizados em sua preparação, sendo que o material externo é denominado agente encapsulante, enquanto o ingrediente interno é denominado material ativo (FRITZEN-FREIRE et al., 2013).

Um material de revestimento deve ser capaz de resistir a condições específicas, permitindo, por exemplo, que os ingredientes ativos possam atravessar o estômago de maneira intacta (CHAMPAGNE et al., 2011). Entre os materiais que podem ser encapsulados, para aplicação na indústria, destacam-se ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, flavorizantes, corantes, enzimas e microrganismos (AUGUSTIN et al., 2001).

Vários polímeros, como alginato, quitosana, carboximetilcelulose (CMC), carragena, gelatina e pectina são aplicados, utilizando várias técnicas de microencapsulação (LI et al., 2009). O método convencional de encapsulação com o alginato de sódio em cloreto de cálcio (CaCl₂) tem sido utilizado para encapsular bactérias, com o intuito de proteger esses microrganismos das condições ácidas do fluido gástrico. As microcápsulas que utilizam polímeros, como material de revestimento, são de fácil confecção, sendo que esses polímeros podem ser isolados de várias fontes (BARRETO et al., 2015).

Alginato de sódio é ainda um dos compostos mais utilizados, também por sua alta versatilidade com diversos tipos de componentes bioativos (GOH et al., 2012). Estudo mostraram que a utilização de microencapsulamento com alginato aumenta a sobrevivência dos probióticos em até 95%, em relação a não utilização de nenhum mecanismo de proteção dos mesmos (KRASAEKOOPT et al., 2003, COELHO-ROCHA et al., 2018).

3.3.6 Métodos de proteção da vacina: Liofilização

Para contornar a questão da perda de parte da atividade probiótica discutida na seção anterior, a utilização do processo de liofilização apresenta, como principal vantagem, a estabilidade das bactérias probióticas, as quais permanecem viáveis após esse processo e, além disso, as atividades das enzimas do composto final são inativadas, devido ao fato de não haver água no meio e, as reações químicas oxidativas, ou não-oxidativas, ocorrem em pequena quantidade, apresentando um resultado satisfatório (BOSS, 2004).

Antes da liofilização, o produto é congelado a temperaturas abaixo de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, de modo que toda a água presente esteja no estado sólido e abaixo do ponto triplo da água, para que não haja formação de espuma durante o período de aplicação do vácuo (GONÇALVES, 2015). A primeira etapa consiste em sublimar o gelo formado na etapa anterior, para isso, o produto é colocado em uma câmara, à qual são aplicados o vácuo, queda de pressão, para que parte da água evapore, sem passar pelo estado líquido (FELLOEWS, 2000).

A dessorção é a etapa seguinte, eliminando cerca dos 10% de água que resultaram, num produto final com cerca de 2% de umidade total, sendo que, nessa etapa de sublimação, retira-se praticamente toda a água sólida presente no produto, porém, a umidade residual está na forma de água combinada, fortemente ligada ao substrato, que representa uma parte significativa da umidade total do produto e, portanto, deve ser retirada para que o produto final apresente valores próximos ou abaixo de 2%, valor suficiente para que não haja atividade microbiana (CHARM, 1971).

O produto final obtido, seco, de aspecto poroso e friável, possui caráter liófilo, apresentando avidez pela água, que possibilita sua rápida reconstituição e, sendo assim, esse processo pode ser aplicado em produtos, os quais poderão ser transportados sem a necessidade de refrigeração, até o momento do comércio e consumo, além de que possibilita ainda, o aumento do tempo de prateleira do produto, agregando ainda mais valor ao mesmo (JALES, 1999).

Apesar de apresentar alto custo, o uso deste método é justificado quando o produto é demasiado sensível ao calor e/ou quando se deseja preservar características originais do composto orgânico (YAMAGUCHI et al., 2017). Um produto liofilizado torna-se ainda mais competitivo quando se analisa sua praticidade no transporte e armazenamento, dado que o produto desidratado ocupa menos espaço, é mais leve e dispensa o uso de câmaras de refrigeração, desde que esteja adequadamente vedado em uma embalagem a vácuo para não absorver a umidade presente no ar e atmosfera livre de oxigênio (FELLOEWS, 2000).

3.3.7 Vacinação oral

Não há dúvida de que, no que diz respeito ao bem-estar animal e aos custos de manejo, a via de vacinação em peixes pelas mucosas e, em particular, a via oral, é hoje o método ideal de aplicação de vacinas nesse setor, apesar de que, a eficiência com esse método, geralmente não foi considerada alta, muito por parte da capacidade digestiva desses peixes (HARWIG et al., 1995, EMBREGETS et al., 2016). Um exemplo dessa baixa eficiência, segundo EMBREGETS et al., (2016), é que, em humanos, apenas 5 vacinas do tipo orais foram aprovadas após cerca de 100 anos de pesquisas, sendo elas contra a pólio, rotavirus, salmonela e vibrio (BÖHLES et al., 2014, LAMICHHANE et al., 2014). Mais especificamente em peixes,

considerando o total de vacinas comercialmente disponíveis, apenas uma fração mínima é fornecida oralmente (DHAR et al., 2014, SOMMERSET et al., 2014).

Dado o progresso promissor, porém insuficiente, no desenvolvimento de vacinas orais em peixes, esforços substanciais de pesquisa estão sendo realizados mais recentemente, em especial pelo estudo da melhora das respostas imunes da mucosa em peixes e à geração de novas estratégias com vacinas orais (EMBREGETS et al., 2016).

MUNANGANDU et al., (2016), encontraram que algumas estratégias com vacinação de DNA fornecida oralmente, em tilápias, tanto com patógenos atenuados quanto com inativos, já conseguiram gerar uma SPR acima de 70% após o desafio, que já é considerado satisfatório. Esses autores também concluíram que a vacinação oral já representa a maior parte das novas estratégias de fornecimento dos vetores vacinais atuais, devido não só à maior facilidade de fornecimento, quanto de produção, mas também, devido a eficiência mais baixa observada em outros tipos de metodologias.

Mesmo que, tais estratégias também tenham apresentado redução de eficiência em determinados estudos, sua utilização em vacinação de DNA, a exemplo da administração via oral e utilizando bactérias lácticas como carreadoras, em geral, tem sido positiva (ZURITA-TURK et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; SOUZA et al., 2016).

Referências:

1. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018–Meeting the sustainable development goals. **FAO**, 2018.
2. EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mercado da Tilápia – 2o trimestre de 2016. Palmas: Embrapa, 2017. (Informativo Mercado da Tilápia, n. 8).
3. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. PESQUISA DA PECUÁRIA MUNICIPAL. sidra.ibge.gov.br, 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>>. Acessado em: 02 de novembro de 2020.
4. MAPFUMO, B. **Tilapia trade global and regional trends**. **FAO**. ASTF GCP/RAF/510/MUL: Enhancing capacity/risk reduction of emerging Tilapia Lake Virus (TiLV) to African tilapia aquaculture. Disponível: <http://www.fao.org/fi/static-media/MeetingDocuments/TiLV/dec2018/p13.pdf>, 2017.
5. FARUK, Md Ali Reza et al. An overview of diseases in fish hatcheries and nurseries. **Fundamental and Applied Agriculture**, v. 2, n. 3, p. 311-316, 2017.
6. FIGUEIREDO, Henrique César Pereira; LEAL, Carlos Augusto Gomes. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. SPE, p. 8-14, 2008.
7. KANO, Flora Satiko; VIDOTTO, Odilon; VIDOTTO, Marilda Carlos. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 709-726, 2007.
8. KALIL, Jorge; CUNHA-NETO, Edecio; GUILHERME, Luiza. Novas estratégias de vacinas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008.
9. WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGHER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, New York, v.247, p.1465-1468, 1990.
10. KOWALCZYK, D. W.; ERTL, H. C. Immune response to DNA vaccine. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Paris, v.55, p.751-701, 1999.
11. MOREL, P. A.; FALKNER, D.; PLOWEY, J.; LARREGINA, A. T.; FALO JR., L. D. DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response. *Vaccine*, Kidlington, v.22, p.447–456, 2004.
12. LEVY, M. Y.; BARRON, L. G.; MEYER, K. B.; SZOKA, F. C. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into the blood. *Gene Therapy*, Pittsburgh, v.3, p.201-211, 1996.
13. PERKINS, S. D.; FLICK-SMITH, H. C.; GARMONY, H. S.; ESSEX-LOPRESTI, A. E.; STEVENSON, F. K.; PHILLPOTTS, R. J. Evaluation of the VP22 protein for enhancement of a DNA vaccine against anthrax. *Genetic Vaccines and Therapy*, Florida, v.3, n.3, p.1-9, 2005.
14. DAVIS, H. L., MCCLUSKIE, M. J. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes Infection*, Berlin, v.1, n.1, p.7-21, 1999.
15. ZHENG, C.; BABIUK, L. A.; VAN DRUNEM LITTLE-VAN DEN HURK, S. Bovine Herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of DNA vaccine in cattle. *Journal of Virology*, Princeton, v.79. n.3, p.1948-1953, 2005.
16. WAINE, G. J., McMANUS, D. P. Nucleic Acids: Vaccines of the future. *Parasitology Today*, Califórnia, v.11, n.3, p.113-116, 1995.
17. GLENTING, J., WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*, Barcelona, v.4, n.26, p.1-5, 2005.

18. NAGATA, T.; AOSHI, T.; UCHUIMA, M.; SUZUKI, M.; KOIDE, Y. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper Tlymphocyte oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology*, Philadelphia, v.23, n.2, p.93-106, 2004.
19. ROBINSON, H. L. Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine*, Kidlington, v.15, n.8, p.785-787, 1997.
20. SNADEEP, K.; TRIPATHY, S. K.; SVENSSON, E. C.; BLACK, H. B.; GOLDWASSER, E.; MARGALITH, M.; HOBART, P. M.; LEIDEN, J. M. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Genetics*, Pittsburgh, v.93, p.10876-10880, 1996.
21. BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G. et al. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. **Current opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 278-283, 2013.
22. BAHEY-EL-DIN, Mohammed; GAHAN, Cormac GM; GRIFFIN, Brendan T. Lactococcus lactis as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. **Current gene therapy**, v. 10, n. 1, p. 34-45, 2010.
23. KUNJI, Edmund RS; SLOTBOOM, Dirk-Jan; POOLMAN, Bert. Lactococcus lactis as host for overproduction of functional membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1610, n. 1, p. 97-108, 2003.
24. NOUAILLE, Sébastien et al. Heterologous protein production and delivery systems for Lactococcus lactis. **Genet Mol Res**, v. 2, n. 1, p. 102-111, 2003.
25. BERMÚDEZ-HUMARÁN, Luis G. et al. Production of biological active murine IFN- γ by recombinant Lactococcus lactis. **FEMS microbiology letters**, v. 280, n. 2, p. 144-149, 2008.
26. SYBESMA, Wilbert et al. Increased production of folate by metabolic engineering of Lactococcus lactis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3069-3076, 2003.
27. FISHMAN, Steven M.; CHRISTIAN, Parul; WEST, Keith P. The role of vitamins in the prevention and control of anaemia. **Public health nutrition**, v. 3, n. 2, p. 125-150, 2000.
28. BRAZ, Luana Camila Cordeiro et al. Contribuições da biotecnologia no desenvolvimento e produção de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 189-206, 2014.
29. LEDWITH, Brian J. et al. Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. **Intervirolgy**, v. 43, n. 4-6, p. 258-272, 2000.
30. WANG, Z. et al. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. **Gene therapy**, v. 11, n. 8, p. 711-721, 2004.
31. BRÅVE, Andreas et al. Biodistribution, persistence and lack of integration of a multigene HIV vaccine delivered by needle-free intradermal injection and electroporation. **Vaccine**, v. 28, n. 51, p. 8203-8209, 2010.
32. KANELLOS, T. et al. The safety and longevity of DNA vaccines for fish. **Immunology**, v. 96, n. 2, p. 307, 1999.
33. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Relatório de produtos com licença vigente. Gov.br/agricultura, 2014. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/listas/listas>>. Acessado em: 28 de outubro de 2020.
34. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Lista de processos de registro de produtos veterinários biológicos aguardando análise. Gov.br/agricultura, 2014. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/listas/listas>>. Acessado em: 28 de outubro de 2020.

35. CARLSON, Abigail L.; PERL, Trish M. Health care workers as source of hepatitis B and C virus transmission. **Clinics in liver disease**, v. 14, n. 1, p. 153-168, 2010.
36. DOLAN, Samantha B. et al. Evaluation of the first year of national reporting on a new healthcare personnel influenza vaccination performance measure by US hospitals. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 37, n. 2, p. 222, 2016.
37. SUSCHAK, John J.; WILLIAMS, James A.; SCHMALJOHN, Connie S. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 12, p. 2837-2848, 2017.
38. LI, L.; FANG, W.; LI, J.; HUANG, Y.; YU, L. Oral DNA vaccination with the polyprotein gene of infectious bursal disease virus (IBDV) delivered by the attenuated Salmonella elicits protective immune responses in chickens. *Vaccine*, Kidlington, v.24, n.33-34, p.5919-5927, 2006.
39. GOH, Cheong Hian; HENG, Paul Wan Sia; CHAN, Lai Wah. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 1-12, 2012.
40. HARWIG, S. S. et al. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A2. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 2, p. 603-610, 1995.
41. MALLOW, Eric B. et al. Human Enteric Defensins Gene Structure And Developmental Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4038-4045, 1996.
42. MIRZAEI, H.; POURJAFAR, H.; HOMAYOUNI, A. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of Lactobacillus acidophilus La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1966-1970, 2012.
43. FRITZEN-FREIRE, C.B. et al. Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT- Food Science and Technology**, v.50, p.39-44, 2013.
44. CHAMPAGNE C.P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193, 2011.
45. AUGUSTIN, M.A. et al. Microencapsulation of food ingredients. **Food Australia**, v.53, p.220-223, 2001.
46. LI, Bing-Zheng et al. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. **Journal of Food Engineering**, v. 92, n. 3, p. 250-254, 2009.
47. BARRETO, Andressa Ribas et al. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 164-174, 2015.
48. KRASAEKOOPT, Wunwisa; BHANDARI, Bshesh; DEETH, Hilton. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International dairy journal**, v. 13, n. 1, p. 3-13, 2003.
49. COELHO-ROCHA, Nina D. et al. Microencapsulation of lactic acid bacteria improves the gastrointestinal delivery and in situ expression of recombinant fluorescent protein. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2398, 2018.
50. BOSS, Edinara Adelaide et al. Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel. 2004.
51. GONÇALVES, Otília Maria de Almeida Ribeiro. **Estudo comparativo de processos de desidratação por liofilização e secagem convencional**. 2015. Tese de Doutorado.
52. FELLOWS, Peter John. **Food processing technology: principles and practice**. Elsevier, 2009.

53. CHARM, Stanley E. et al. **The fundamentals of food engineering**. Westport, Connecticut, USA: AVI Publishing Co., Inc., 1971.
54. JALES, STL. **Avaliação da atividade microbiológica e tecnologia de obtenção das formas farmacêuticas cápsulas e flaconetes à base de *Zymomonas mobilis***. 1999. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Produção e Controle de Medicamentos).
55. YAMAGUCHI, Shana Kimi Farias et al. Liofilização de produtos lácteos: Uma revisão. **Revista Espacios**, v. 38, p. 1-12, 2017.
56. FELLOWS, P. Principles and practice. **Food processing technology, 2nd ed.**, ed. Ellis Horwood, Chichester, UK, p. 369-380, 2000.
57. EMBREGTS, Carmen WE; FORLENZA, Maria. Oral vaccination of fish: lessons from humans and veterinary species. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 64, p. 118-137, 2016.
58. BÖHLES, Nathalie et al. Vaccines against human diarrheal pathogens: current status and perspectives. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 6, p. 1522-1535, 2014.
59. LAMICHHANE, Aayam; AZEGAMI, Tatsuhiko; KIYONO, Hiroshi. The mucosal immune system for vaccine development. **Vaccine**, v. 32, n. 49, p. 6711-6723, 2014.
60. DHAR, Arun K.; MANNA, Sanjib K.; ALLNUTT, FC Thomas. Viral vaccines for farmed finfish. **Virusdisease**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2014.
61. SOMMERSET, Ingunn et al. Vaccines for fish in aquaculture. **Expert review of vaccines**, v. 4, n. 1, p. 89-101, 2005.
62. MUNANG'ANDU, Hetron Mweemba; PAUL, Joydeb; EVENSEN, Øystein. An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for *Streptococcus agalactiae* vaccines in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 48, 2016.
63. ZURITA-TURK, Meritxell et al. Lactococcus lactiscarrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 73, 2014.
64. PEREIRA, Vanessa Bastos et al. Development of a new DNA vaccine based on mycobacterial ESAT-6 antigen delivered by recombinant invasive *Lactococcus lactis* FnBPA+. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 4, p. 1817-1826, 2015.
65. SOUZA, Bianca Mendes et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac eukaryotic expression vector coding for IL-4 reduces chemically-induced intestinal inflammation by increasing the levels of IL-10-producing regulatory cells. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2016.

4. CAPÍTULO 1

Artigo - Expressão gênica intestinal de uma vacina de DNA via oral utilizando dois métodos de proteção em Tilápia-do-Nilo.

Expressão gênica intestinal de uma vacina de DNA via oral utilizando dois métodos de proteção em Tilápia-do-Nilo.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa recebeu apoio financeiro do EDITAL UNIVERSAL - MCTI/CNPq nº 28/2018 DEMANDA UNIVERSAL - FAIXA A. Número do processo: 407929/2018-5.

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

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem ao Laboratório de Pesquisa do Hospital Universitário Clemente de Faria dos professores Sérgio Henrique Souza Santos e André Luiz Sena Guimarães, pelo apoio técnico às análises em microscopia de fluorescência.

RESUMO

O controle e manejo de doenças que acometem a piscicultura mundial, a exemplo das causadas por protozoários, parasitas, vermes, bactérias oportunistas e fungos, é um pré-requisito para a sustentabilidade desse setor produtivo e, um desafio constante, muito complexo e atualmente, limitado de produtos eficazes de tratamento. Além disso, alevinos e juvenis são ainda mais suscetíveis, de maneira geral, a surtos dessas doenças, por terem o sistema imunológico ainda em formação, de modo que, a sobrevivência desses animais depende de estratégias multidisciplinares de manejo adequado de sua saúde, nutrição, da qualidade da água e de medidas de biossegurança. Portanto, se faz necessária a ênfase em prevenção e não somente em tratamento. Por esses motivos, vacinas de DNA ganham atenção crescente, devido a superarem desvantagens de outros tratamentos preventivos, em geral de maneira mais eficiente. Elas funcionam expressando no hospedeiro, diferentes proteínas de patógenos, codificadas em vetores plasmídeos. As vacinas comerciais licenciadas atualmente são relativamente caras, o que não gera estratégias amplas de vacinação. Foi avaliada a funcionalidade do plasmídeo vetorial pExu, transformado na linhagem *Lactococcus lactis* MG 1363, em peixes. Esta vacina gênica *L. lactis* MG1363 (pExu:mCherry) foi fornecida, por via oral, através de microencapsulamento ou liofilização, para a espécie Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), de elevado interesse comercial. Para tanto, 108 juvenis machos de Tilápia-do-Nilo com peso de 250 ± 20 g foram utilizados. O equivalente a 1 dose (1×10^9 UFC) foi administrado por via oral [microencapsulado (administração direta) e liofilizado (incorporado à ração comercial)] aos animais e, a área que apresentava fluorescência, foi comparada, nas três seções intestinais (Anterior, Média e Posterior), nos períodos de 6, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144, e 168 horas após a administração. Ambos os métodos avaliados permitiram a expressão do gene repórter em todas as regiões de interesse. Houve, no entanto, diferença significativa ($p < 0.001$) na área de expressão média por seção intestinal, de modo que a seção Posterior apresentou menor expressão em relação às outras duas seções, tanto quando avaliado o microencapsulamento quanto a liofilização (redução de 40% e 87%, respectivamente). No entanto, a expressão da proteína mCherry se mostrou mais eficiente pelo método de liofilização que pelo microencapsulamento ($p < 0.001$), ao apresentar, aproximadamente, áreas de fluorescência 25 mil, 13 mil e 4 mil por cento maiores, nas seções Anterior, Média e Posterior, respectivamente. O método de microencapsulamento e liofilização apresentaram amplitude máxima da expressão no intervalo de 24 horas e 96 horas, respectivamente. Tais descobertas são importantes pois irão guiar pesquisas sobre novas estratégias com vacinas de DNA, em especial, as fornecidas oralmente.

Palavras-chave:

Piscicultura, mCherry, Microencapsulamento, Liofilização, Fluorescência, Cinética.

Introdução:

Novas estratégias de vacinação são pesquisadas constantemente por causa de sua baixa toxicidade e sucesso no combate de doenças graves em todo o mundo (RUFF et al., 2013). Até a presente data, a vacinação oral baseada em peptídeos não virulentos para a piscicultura oferece algumas vantagens óbvias sobre outras vias de vacinação nesse setor, como por exemplo, a natureza não invasiva desta abordagem, facilidade de administração e, menor custo de produção (ZHANG et al., 2016). Portanto, um novo tratamento promissor de doenças que acometem a piscicultura, envolve a utilização de vacinas de DNA, fornecidas oralmente. Nesse sistema de vacinação, carregado por bactérias lácteas, as células eucarióticas do hospedeiro alvo expressam antígenos codificados pela vacina (COELHO-ROCHA et al., 2018), contribuindo para a fisiologia nutricional, modulação da imunidade da mucosa intestinal e prevenção e/ou tratamento, de infecções intestinais. Porém, muito ainda é pesquisado para aumentar a imunogenicidade desse tipo de sistema (SUSCHAK et al., 2017).

Uma atual questão importante relacionada aos sistemas de vacinação de DNA, em especial às que utilizam bactérias lácteas, por exemplo, refere-se ao material biológico envolvido, que pode se deteriorar em questão de dias ou semanas (COELHO-ROCHA et al., 2018). Para amenizar tais questões, vários processos de proteção do composto vacinal foram desenvolvidos e várias metodologias existem. Dentre elas, o processo de microencapsulamento é um dos mais utilizados, para proteção de microrganismos no trato gastrointestinal e, tem a vantagem da sua alta aplicabilidade e menor custo, ao passo que sua eficiência não sempre se mostra elevada em vacinação com DNA (HOLVOLD et al., 2014). Já o processo da liofilização tem sido crescentemente utilizado na pesquisa farmacêutica, bem como na ciência e tecnologia de alimentos de maneira geral (ISHWARYA et al., 2015), pois tem a vantagem de proteger um composto ativo químico e/ou biológico por anos, ao invés de meses, como no caso do microencapsulamento (COELHO-ROCHA et al., 2018), todavia, possui custo mais elevado (YAMAGUCHI et al., 2017) e precisa, a exemplo do microencapsulamento, ser avaliado em novos modelos teóricos, a exemplo da formulação de novas patentes de vacinas (MANWARING, 2002).

Desse modo, ainda há muito a se descobrir sobre o comportamento *in vivo* das vacinas de DNA, principalmente no que se refere a espécies e necessidades específicas e, ainda mais, em relação a diferentes metodologias, além de que os benefícios das vacinas orais não podem ser totalmente alcançados até que as mesmas possam ser administradas com eficiência para células imunes antes de serem degradadas, dentro do ambiente severo do trato gastrointestinal (ZHANG et al., 2016). Por isso, a fim de se avaliar a eficácia de um novo sistema de entrega de DNA adaptado para vacinação em massa na indústria aquícola, fornecido oralmente, primeiro deve-se acessar qual a melhor estratégia de fornecimento desses compostos, a partir da quantificação da correlação da cinética de expressão do composto vacinal, dentre as principais metodologias. Para isso, utilizamos um gene repórter, que codifica uma proteína fluorescente (PF), a ser mensurada no intestino da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie de elevada importância comercial, denominada “mCherry”, que é um monômero não tóxico que não precisa de nenhuma indução de estresse por parte do organismo hospedeiro para ser expressa em níveis elevados (CARROLL et al., 2010). Portanto, o objetivo deste estudo foi de avaliar a eficiência do plasmídeo vetorial pExu:mCherry, carregado por BL (*Lactococcus lactis* MG1363) fornecido após microencapsulamento de forma direta ou liofilização, na raça comercial, para a Tilápia-do-Nilo.

Material e Métodos:

Preparação das doses

Culturas de *L. lactis* MG 1363 portando o plasmídeo pExu:*mCherry* foram obtidas do Laboratório de Genética Celular e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil). Para seu preparo, as culturas foram cultivadas durante 16 horas a 30 °C em meio de cultura M17 (Sigma-Aldrich, Brasil) e suplementadas com 0.5% de glicose (Labsynth, Brasil) e 125 mg/mL de eritromicina (Sigma-Aldrich, Brasil). Após esse período, uma diluição de 1/20 foi realizada, de modo que a cultura apresentasse absorvância (OD_{600nm}) = 1.0.

Em seguida, 2mL, correspondentes a uma dose (1×10^{14} UFC – Unidades Formadoras de Colônias), foram centrifugados durante 10 minutos a 4 °C a 4,000 rpm. Após o sobrenadante ser descartado e o pellet lavado duas vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfato) (0.0067 M), a dose foi resuspendida em 20µL de PBS estéril e imediatamente congelada em *ultrafreezer* a -80 °C até o uso, de acordo com o descrito por COELHO-ROCHA et al. (2018).

Microencapsulamento

Para o microencapsulamento, 10^{14} UFC de *L. lactis* MG 1363 (pExu:*mCherry*) foram misturadas com 20µL de PBS estéril e 50µL de solução matriz de alginato de sódio 1%, seguindo metodologia de KRASAEKOOPT et al. (2003). Para esse procedimento, a solução de alginato foi preparada e esterilizada com autoclave (121 °C, durante 15 minutos). Em seguida a mistura foi homogeneizada cuidadosamente e extrusada com auxílio de uma agulha 21 G em meio estéril de 3% de solução $CaCl_2$ com agitação magnética (uma solução *cross-linking*), formando microcápsulas (bactérias encapsuladas) pelo contato das duas soluções. Em seguida, as microcápsulas foram coletadas através de filtração usando um filtro *Cell Strainer* de nylon de 40 mm (Corning, NY, Estados Unidos da América), enquanto o volume remanescente de $CaCl_2$ foi removido por pipetagem. As microcápsulas foram transferidas para micro tubos estéreis e armazenadas em *ultrafreezer* a -80 °C até utilização. Antes da administração nos respectivos animais, 100 µL de PBS estéril foi adicionado à mistura final para divisão das doses entre todos os peixes.

Liofilização

A liofilização foi realizada usando um liofilizador de bancada (*HumanLab Instrument Co*, Coreia do Sul). A cultura foi primeiramente suspensa em 2 mL de leite em pó (Itambé, Belo Horizonte, Brasil) para reduzir a lesão celular e, as suspensões foram congeladas por imersão rápida em frascos em nitrogênio líquido por 10 minutos antes de serem colocadas no liofilizador. A temperatura da câmara de vapor foi mantida a -80 °C durante o todo o processo. A pressão do vácuo dentro da câmara de secagem foi mantida abaixo de 1×10^{-3} bar e, as amostras foram deixadas durante 16 horas, tempo necessário para secagem total da mistura (peso total de 40g).

Desenho Experimental

324 juvenis de tilápia, sexualmente revertidos em machos, com peso médio de 250 ± 20 g, foram mantidos em um sistema de recirculação, no Laboratório de Piscicultura do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (Montes Claros, Brasil). Esse

sistema é dotado de aeração ($83\% \pm 3\%$ de oxigênio dissolvido) e termorregulação (29 ± 1 °C) constantes. As concentrações de amônia e nitrito foram mantidas em $0,3 \pm 0,1$ e $0,2 \pm 0,1$ mg/L, respectivamente. Um ciclo de luz claro/escuro de 12 horas também foi adotado.

Os procedimentos experimentais envolvendo peixes foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo N°: 335/2019, em anexo). Os peixes foram distribuídos em vinte e um tanques plásticos de 150 L, na densidade de 15 peixes/tanque. O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados, com no total, 6 tratamentos e, 54 repetições (peixes), em cada.

Os tratamentos são resumidos da seguinte forma:

- i. Grupo Controle Negativo (encapsulamento de PBS).
- ii. Grupo Controle Negativo (encapsulamento de *L. lactis* MG1363 portando o plasmídeo pExu:vazio).
- iii. Grupo Positivo (encapsulamento de *L. lactis* MG1363 portando o plasmídeo pExu:mCherry).
- iv. Grupo Controle Negativo (leite em pó).
- v. Grupo Controle Negativo (liofilização de *L. lactis* MG1363 portando o plasmídeo pExu:vazio).
- vi. Grupo Positivo (liofilização de *L. lactis* MG1363 portando o plasmídeo pExu:mCherry).

Preparação e administração da ração experimental

Todos os tratamentos experimentais foram oferecidos de uma só vez e simultaneamente, em substituição à primeira refeição do dia. A administração das doses microencapsuladas foram feitas por alimentação forçada, sendo 1 dose fornecida para cada peixe. Para administração das doses liofilizadas, as mesmas foram previamente liofilizadas e incorporadas em ração comercial de peixes (42% de proteína bruta, pellets de 3 mm) como atrativo.

Para tanto, os pellets foram primeiro triturados em um moinho de facas durante um minuto, em seguida, o pó liofilizado foi adicionado à ração triturada e, em seguida, essa mistura foi repetizada, usando um moedor de carne com filtro de 3 mm. Em seguida, os pellets foram secos em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 24 horas. As rações experimentais equivalem a 2% do peso corporal vivo/tanque/dia.

Quantificação e cinética da expressão da mCherry por microscopia de fluorescência

Às 6, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após as administrações terem sido realizadas, 6 animais de cada tratamento foram aleatoriamente eutanasiados, com overdose de benzocaína (300 mg/L, dissolvido em álcool 70%) e, segmentos do intestino Anterior, Médio e Posterior foram coletados para análise, por microscopia de fluorescência, utilizando um microscópio confocal invertido a laser FSX 100 (Olympus, Japão) na banda 610 nm, com auxílio do programa FSX-BSW, versão 03.02.12 (Olympus, Japão). A área de expressão foi determinada via delimitação automática, usando a função “Limiar de cor”, pelo programa ImageJ (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos da América), versão 1.53e.

Ao invés de simplesmente considerar uma imagem inteira com determinadas áreas de expressão visíveis, como um único valor, foi tomada cada unidade de expressão,

individualmente, como sub-repetições, caso contrário, o valor da área de uma unidade de expressão individual seria superestimado. As bandas azul e verde do microscópio foram usadas para excluir a seleção de autofluorescência.

Análise estatística

Os dados foram analisados com ANOVA a 95% de intervalo de confiança, seguidos do teste de Holm-Sidak, em caso de significância estatística, usando o programa Sigmaplot (Systat Software, Inc.), versão 14.

Resultados:

Nenhum peixe morreu durante o experimento e as dietas experimentais foram bem aceitas. A análise de microscopia de fluorescência confirmou que células intestinais de peixes foram capazes de expressar o gene repórter em todas as três seções do intestino avaliadas, incluindo a região Posterior (Figura 1), extremidade final do intestino. Os grupos controle negativo mostraram apenas a fluorescência natural emanando do alimento e das paredes do intestino (dados não apresentados).

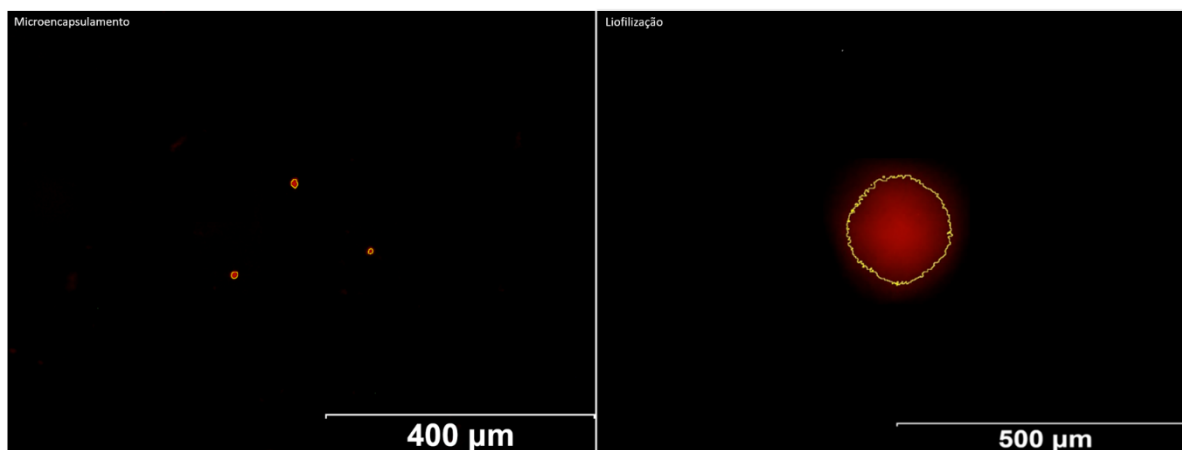
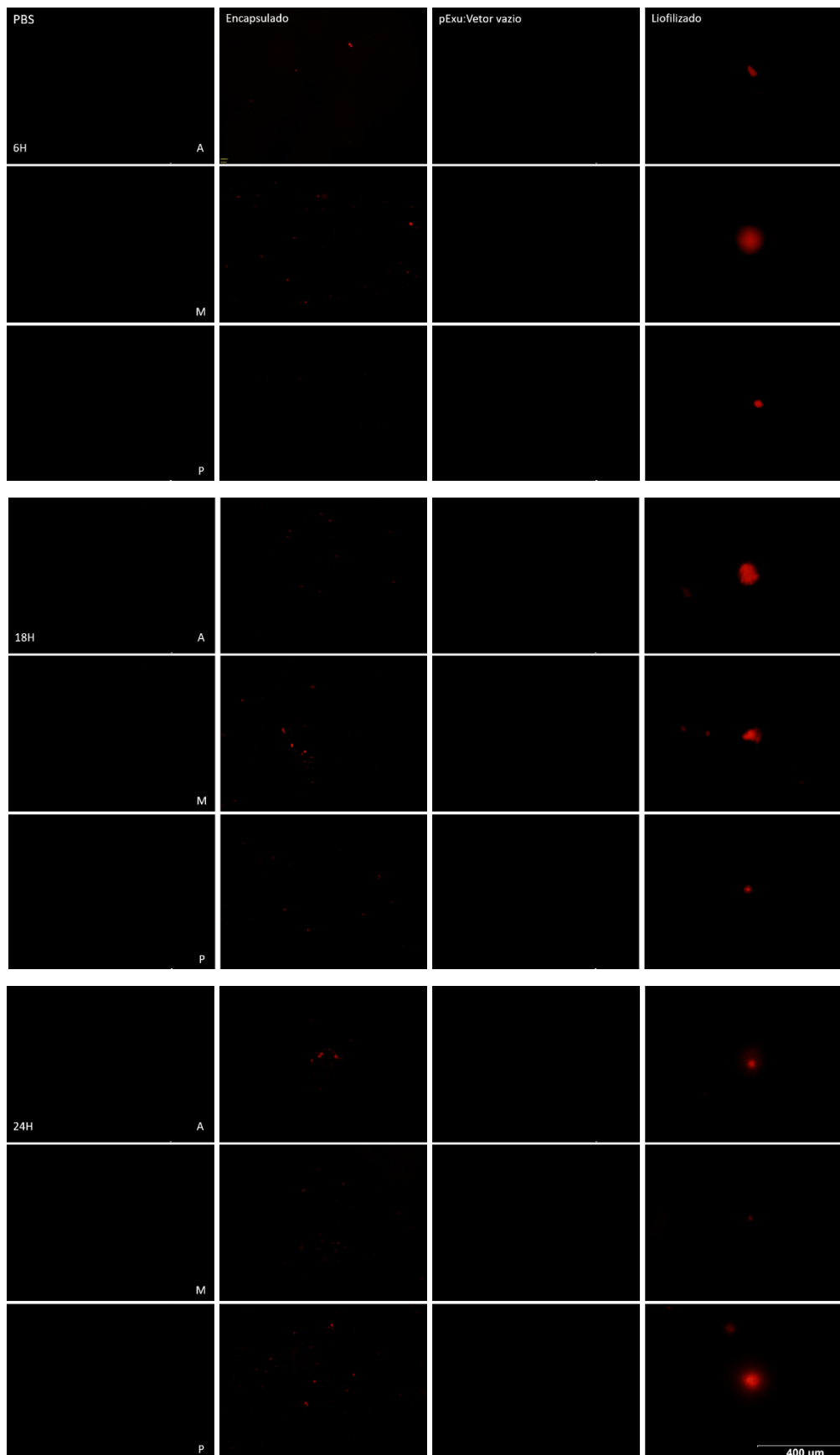


Figura 1. Áreas de expressão da proteína mCherry (círculos vermelhos) na seção Posterior do intestino dos peixes, avaliado por microscopia de fluorescência. Esquerda: Utilização do método de microencapsulamento. Direita: Utilização do método de liofilização. O perímetro da expressão (linhas amarelas) foi delimitado automaticamente através da função Limiar de cor do programa ImageJ. Magnitude: 40x.

Houve, no entanto, diferença na expressão da proteína mCherry em relação à cinética, metodologias e seções intestinais (Figura 2). De modo que, com o método de microencapsulamento, houve expressão em todos os intervalos de tempo avaliados, até o período de 96 horas, com exceção do intervalo de 72 horas (seção Médio). Enquanto que a expressão com a bactéria liofilizada não apresentou nenhum resultado válido no intervalo de 24 horas (seção Médio), 72 horas (seção Posterior) e 96 horas (seções Médio e Posterior), porém, também encerrou a expressão da proteína mCherry, igualmente no período de 96 horas.



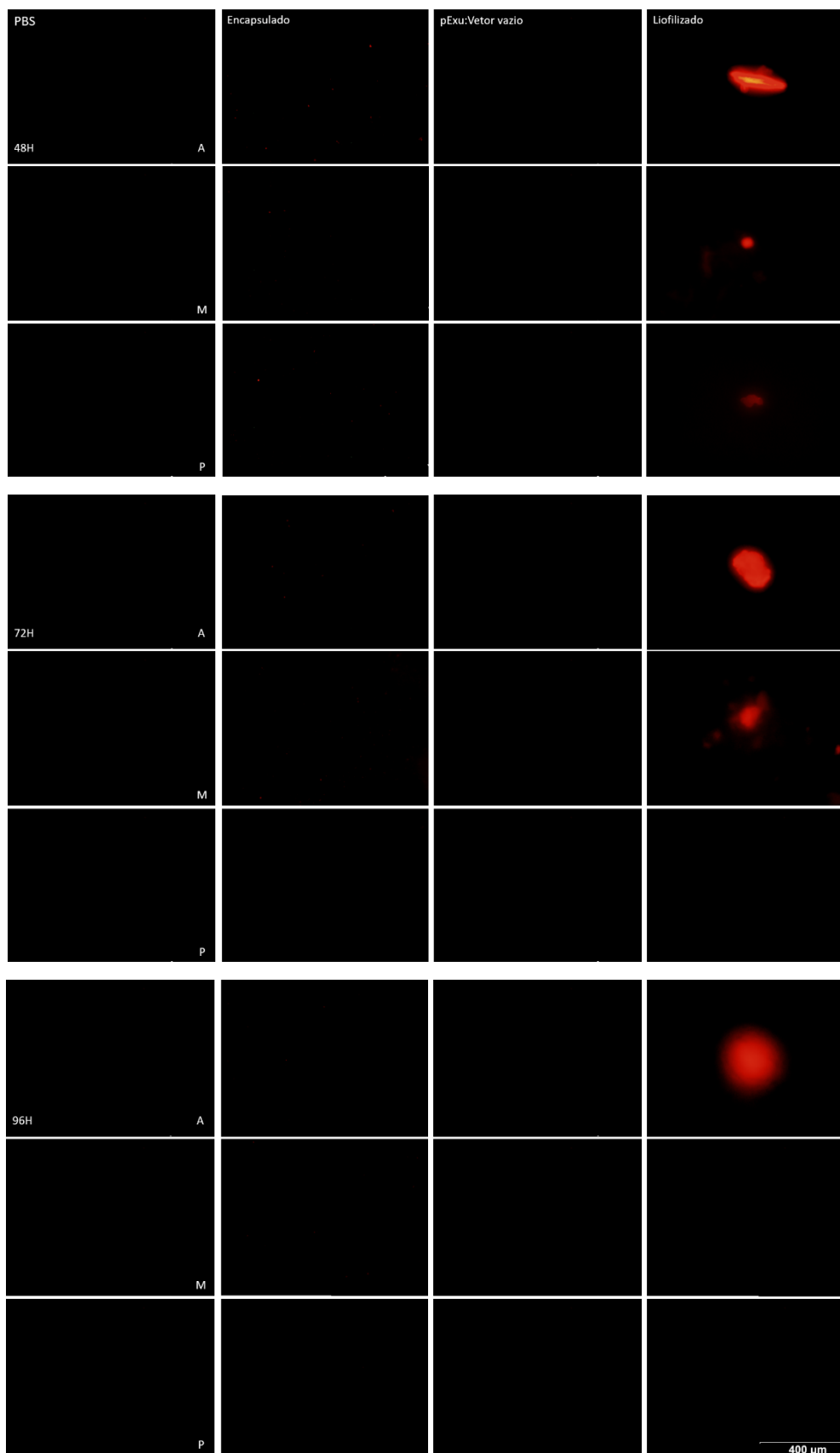


Figura 2. Expressão da proteína mCherry em células intestinais de peixes, avaliadas por microscopia de fluorescência. Comparação de PBS e pExu:vazio com os métodos de microencapsulamento e de liofilização até o período de 96 horas. A = Anterior. M = Médio. P = Posterior. Magnitude: 40x.

A respeito da eficiência do microencapsulamento entre seções intestinais (Figura 3), não houve diferença estatística na expressão média nas seções Anterior e Média ($p = 0,190$). A área média de expressão foi menor na seção Posterior em relação a seção Anterior ($p = 0,028$) e, muito menor, em relação a seção Média ($p < 0.001$).

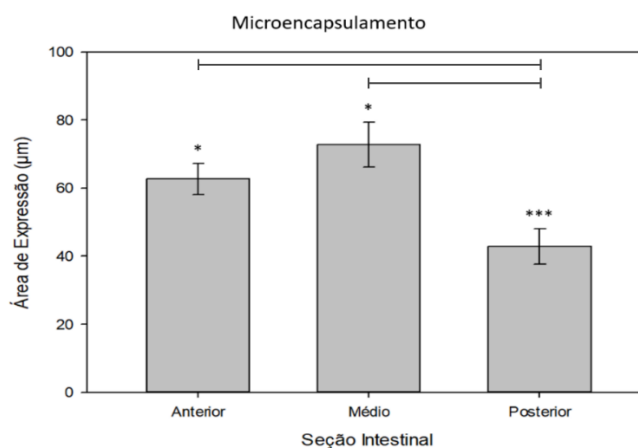


Figura 3. Área de expressão média (em micrômetros) da proteína mCherry, via microencapsulamento, nas seções Anterior, Médio e Posterior do intestino dos peixes. Barras representam média, escalas verticais representam desvio padrão e escalas horizontais representam significância da seção Posterior. * = ($p > 0.05$). *** = ($p < 0.001$).

Sobre a eficiência da formulação liofilizada, entre seções intestinais, após administração, no intestino dos peixes, não foi observada diferença estatística entre as áreas de expressão média nas seções Anterior e Média ($p = 0.369$), porém, a seção Posterior, a expressão foi muito reduzida em relação às outras duas seções ($p < 0.001$) (Figura 4).

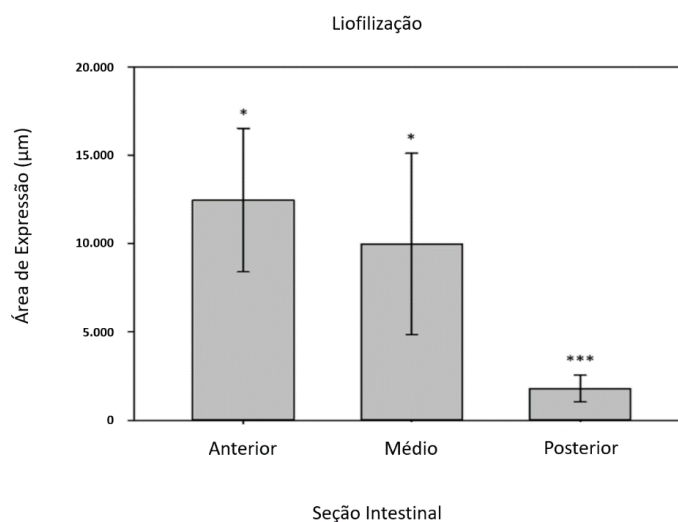


Figura 4. Área de expressão média (em micrômetros) da proteína mCherry, via liofilização, nas seções Anterior, Médio e Posterior do intestino dos peixes. Barras representam média e escalas representam desvio padrão. * = ($p > 0.05$). *** = ($p < 0.001$).

A expressão da proteína mCherry é significativamente reduzida com ambas metodologias testadas na região Posterior do intestino dos peixes. De maneira análoga, não houve diferenciação na expressão de mCherry entre as seções Anterior e Média, para ambas metodologias avaliadas ($p > 0.05$).

A Tabela 1 descreve a variação quantitativa da cinética da expressão da proteína nas três seções intestinais, através dos dois diferentes métodos de proteção do composto vacinal. No microencapsulamento, um coeficiente de variação alto (> 30%) foi observado em praticamente todas as seções intestinais. No entanto, na liofilização, apenas a seção anterior foi capaz de apresentar a expressão do gene repórter até 96 horas, sendo que apenas uma unidade foi encontrada. Da mesma maneira, apenas uma única unidade foi registrada nessa mesma seção no intervalo de 24 horas. A expressão com esse método cessou na seção Média no intervalo de 72 horas e, no intervalo de 48 horas na seção Posterior. Um coeficiente de variação alto (> 30%) também foi observado em todas as seções intestinais avaliadas com essa metodologia.

Tabela 1. Média, desvio padrão e coeficiente de variação da expressão da proteína mCherry (*L. lactis* MG1363 pExu:mCherry) nas seções Anterior, Média e Posterior do intestino dos peixes, via diferentes métodos de proteção do composto vacinal.

Cinética (Horas)	Fluorescência da proteína do plasmídeo pExu:mCherry (micrômetros)								
	Seção Intestinal da Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)								
	Anterior			Médio			Posterior		
	Média	DP	CV	Média	DP	CV	Média	DP	CV
<i>Liofilização</i>									
6h	6.955,4	3.695,1	49	3.810,4	2.405,4	58	417,1	319,0	70
18h	4.222,0	1.410,2	30	31.881,6	17.037,5	49	385,1	222,0	53
24h	1.795,2	-	-	1.492,6	714.305	44	2.947,1	1.906,0	59
48h	13.196,1	6.443,0	45	1.372,7	772.139	51	3.400,2	1.253,0	34
72h	22.013,7	730,0	-	11.369,2	962.873	08	-	-	-
96h	44.130,0	-	-	-	-	-	-	-	-
>120h	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microencapsulamento</i>									
6h	107.834	50.720	53	80.969	21.536	25	12.979	1.136	8
18h	51.477	3.730	6	68.125	32.732	45	57.753	12.488	20
24h	73.711	11.652	14	104.303	60.600	55	98.808	24.435	23
48h	50.097	24.726	47	102.904	76.455	70	38.425	19.002	47
72h	48.958	22.823	44	41.052	13.723	31	-	-	-
96h	39.599	7.145	17	37.012	1.851	4	6.587	0.493	7
>120h	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: DP = Desvio Padrão. CV = Coeficiente de Variação (%). - = Sem data ou variação.

Nas duas metodologias, a seção Anterior apresentou os valores máximos em relação à área de expressão da proteína mCherry. O valor de área máximo obtido foi no intervalo de 24 horas e 96 horas, com os métodos de microencapsulamento e de liofilização, respectivamente. Em sua maioria, na metodologia com liofilização, a área de expressão atingiu a escala dos milímetros (1 milímetro = 1000 micrometros), sendo que, a área de expressão média, com esse método, foi 25 mil, 13 mil e 4 mil por cento maior, nas seções Anterior, Média e Posterior, respectivamente, em relação a área de expressão média com o método do microencapsulamento.

A taxa de expressão (em porcentagem) da proteína mCherry, em relação à cinética e, seções intestinais, pelo método de microencapsulamento (Figura 5), ou de liofilização (Figura 6), são apresentadas. Nota-se uma relação inversamente proporcional entre a taxa de expressão (em porcentagem) com relação à cinética (em horas) de acordo com as duas metodologias, nas diferentes seções intestinais.

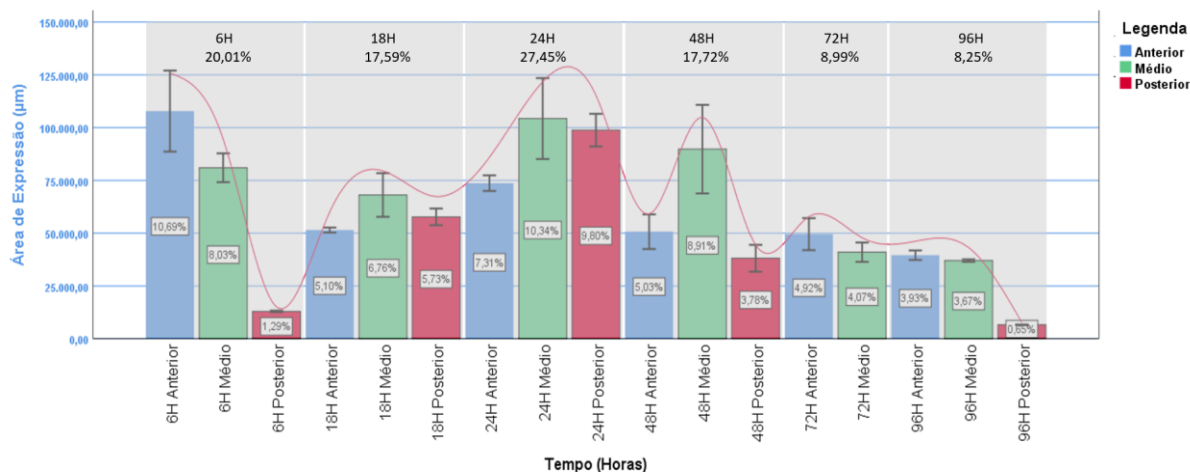


Figura 5. Relação entre a cinética, com a porcentagem de expressão de mCherry, pelas diferentes seções intestinais, após administração da vacina genica administrada, por via oral, com o método de microencapsulamento. Barras representam média e escalas representam desvio padrão.

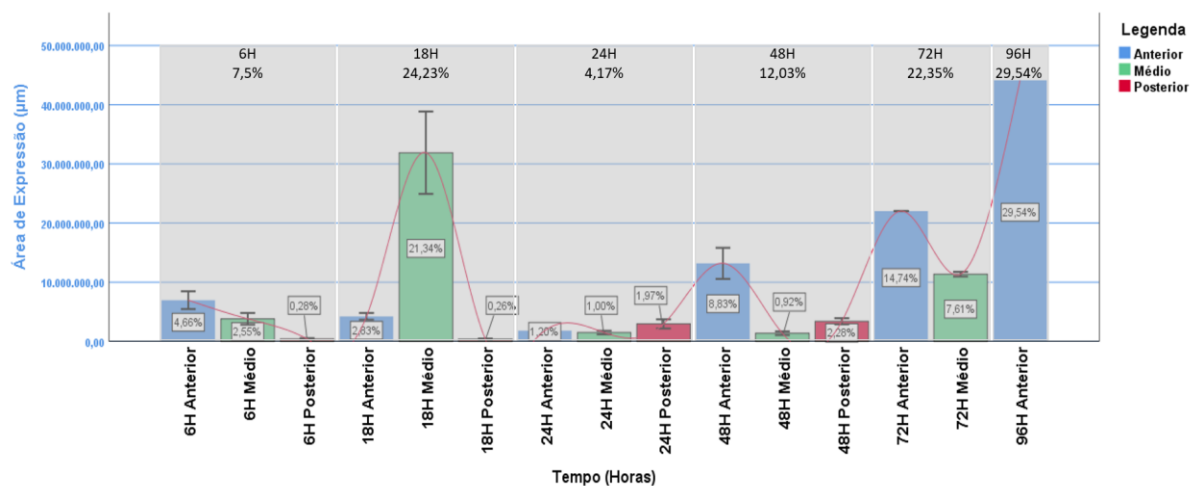


Figura 6. Relação entre a cinética, com a porcentagem de expressão de mCherry, pelas diferentes seções intestinais, após administração da vacina genica administrada, por via oral, com o método de liofilização incorporada na ração. Barras representam média e escalas representam desvio padrão.

As correlações entre a cinética da fluorescência da proteína *mCherry*, com o método de microencapsulamento, nas três diferentes seções intestinais são apresentadas na Figura 7. A seção Anterior é bem representada por uma regressão polinomial da terceira ordem ($R^2 > 0.7$), com dois movimentos distintos de redução da expressão. A seção Média é bem representada por uma regressão polinomial da terceira ordem ($R^2 > 0.7$), com um aumento seguido de uma redução na expressão. A seção Posterior é fortemente representada por uma regressão polinomial da terceira ordem ($R^2 > 0.8$), com resposta muito semelhante à de uma curva de pico, do tipo normal.

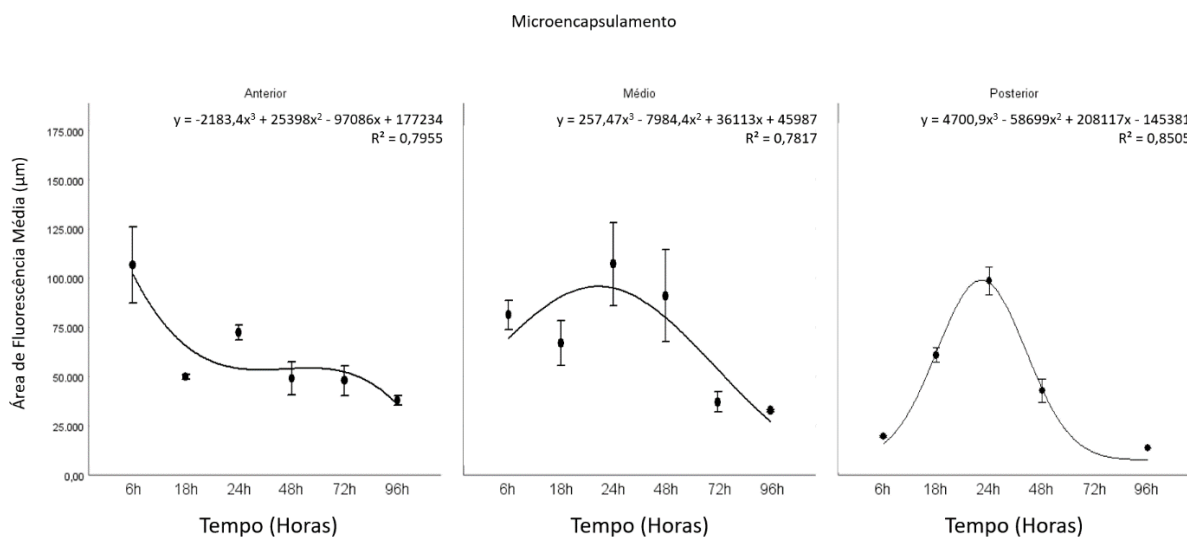


Figura 7. Correlação das regressões entre a expressão da proteína *mCherry* microencapsulado nas seções Anterior, Médio e Posterior (em micrometros), no intestino dos peixes, sobre o tempo (em horas). Escalas representam desvio padrão.

As correlações entre a cinética da fluorescência da proteína *mCherry*, com o método da liofilização, nas três diferentes seções intestinais são apresentadas na Figura 8. A seção Anterior é fortemente representada por uma regressão polinomial de segunda ordem ($R^2 > 0.9$), com pequena redução inicial seguida de crescimento exponencial, após às 24 horas. A seção Média é representada por uma regressão polinomial de terceira ordem ($R^2 > 0.7$), com dois crescimentos distintos, indicando a ocorrência de uma resposta bifásica nessa seção intestinal. A seção Posterior é fortemente representada por uma regressão polinomial de terceira ordem, de modo que, nessa sessão, a resposta se assemelha fortemente a uma curva polinomial, do tipo sigmoidal.

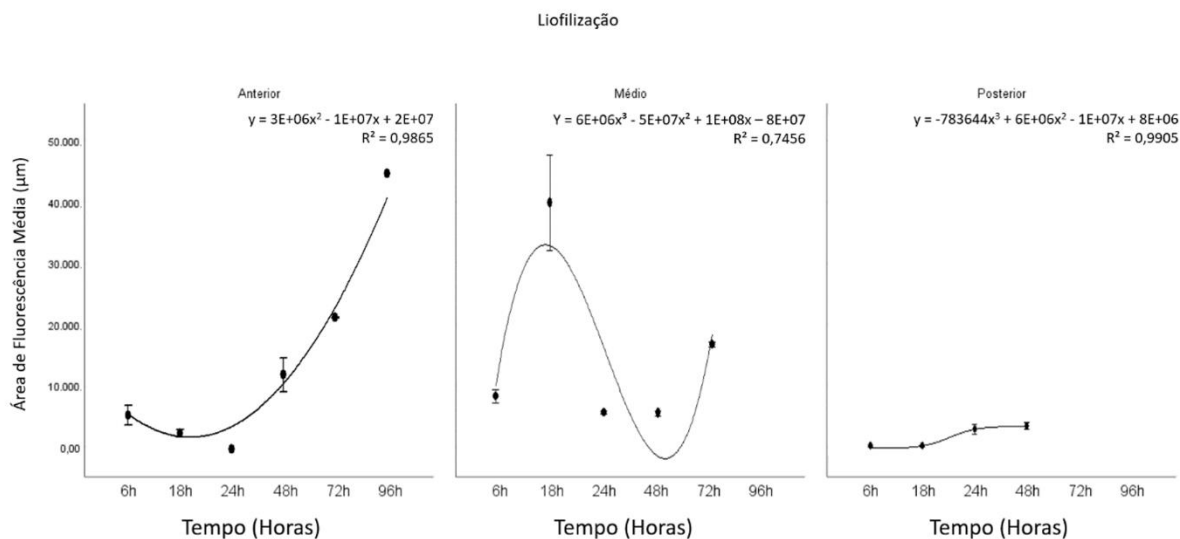


Figura 8. Correlação das regressões entre a expressão da proteína mCherry liofilizado nas seções Anterior, Média e Posterior (em micrometros), no intestino dos peixes, sobre o tempo (em horas). Escalas representam desvio padrão.

Em todas as seções avaliadas, com o método do microencapsulamento, a área média de expressão de mCherry reduziu em correlação ao tempo (em horas), todavia, houve um aumento intermediário nas seções Média e Posterior durante esse movimento. O pico máximo de expressão (amplitude) registrado, por seção, com esse método, foi no intervalo de 6 horas, para a seção Anterior e, de 24 horas, para as seções Médio e Posterior. Já com a metodologia de liofilização, a área de expressão média de mCherry aumentou constantemente nas seções Anterior e Posterior, enquanto que, na seção Média, houveram dois movimentos de crescimento distintos. A amplitude registrada na expressão, por seção, foi no intervalo de 96 horas, para a seção Anterior, de 16 horas, para a seção Média e, de 48 horas, para a seção Posterior.

Discussão:

Foi verificada a funcionalidade do plasmídeo pExu:mCherry em células de peixe. O princípio dessa técnica já havia sido demonstrado inicialmente em células de peixes, apesar de, naquela situação, não garantir a segurança dos mesmos (HEPPELL et al., 1998).

Funcionalidade também verificada devido a ser fornecida com a bactéria *L. lactis*. HUANG et al. (2014) usaram um vetor atenuado de *Salmonella typhimurium* que codifica a proteína Sip de *S. agalactiae* que produziu altos níveis de proteção contra essa bactéria, mas, devido ao risco de reversão de patogenicidade dessa abordagem, bactérias não-patogênicas têm sido crescentemente utilizadas, como sistema de entrega de antígenos na vacinação de DNA, por serem consideradas seguras, uma vez que possuem o status GRAS (*Generally Regarded As Safe*, em inglês) além de, em muitas vezes, também com propriedades adjuvantes (POUWELS et al., 1996).

Funcionalidade verificada também devido o promotor Citomegalovirus (pCMV) utilizado, que permite que a transcrição e consequente expressão da proteína de interesse em células eucarióticas seja realizada, ser originalmente de mamíferos (ref). A escolha de um promotor adequado para a vacinação de DNA ajuda a assegurar que o gene alvo seja expresso no local correto (células, tecidos e órgãos), no momento correto (estágios de desenvolvimento), no nível fisiológico apropriado (quantidade satisfatória, porém segura) e, possivelmente, sob uma condição específica (por exemplo na presença/ausência de fatores ambientais) (HILBECK et al., 2011). Embora o pCMV seja o mais utilizado em pesquisas com mamíferos, por promover um maior nível de expressão constitutiva (MANCHA-AGRESTI et al., 2017, HOLVOLD et al., 2014), também já se mostrou eficiente em peixes (CORBEIL et al., 1999), corroborando com este trabalho.

A fluorescência de mCherry foi claramente detectável, nessa espécie, 6 horas após a administração, em todas as três seções do intestino, bem como com as duas metodologias utilizadas. Isso está de acordo com vários outros estudos, inclusive como por exemplo, com células humanas (DUELLMAN et al., 2015) e células de parasitas (GRAEWE et al., 2009). Como esperado com pesquisas semelhantes, a expressão não durou mais do que cerca de alguns dias (96 horas) devido ao tempo de fotoestabilidade da proteína fluorescente mCherry (HEBISCH et al., 2013), além de fatores naturais intrínsecos do hospedeiro, tais como seu estado imunológico, tempo de trânsito intestinal e descamação das células intestinais (ANDRADE et al., 2011).

Esse tempo de fotoestabilidade é semelhante ao observado em outros animais, como 72 horas relatado no intestino de camundongos (ZYL et al., 2015). Além disso, em células de peixes, mais especificamente, autores encontraram um tempo de fotoestabilidade ligeiramente menor para mCherry (48 horas) no intestino do peixe-zebra (RUSSO et al., 2015) usando também, vacinação de DNA. Essa diferença é provavelmente, principalmente devido aos hospedeiros díspares empregados, pois esses autores utilizaram embriões e, como os processos de transcrição e tradução de genes são realizados pela própria maquinaria celular do hospedeiro e é influenciado também por uma variedade de fatores, como o tipo do vetor, concentrações do DNA fornecido, volumes de administração, idade e tamanho dos peixes, temperatura da água e método e/ou via de administração, esses fatores poderiam influenciar nos resultados obtidos nesses diferentes experimentos (HOLVOLD et al., 2014).

Como a maior parte do coeficiente de variação registrado (acima de 30%), a área de expressão média da fluorescência apresentou grande amplitude em todos os cortes intestinais, inclusive com as duas metodologias de proteção utilizadas. Isso tem muitas razões possíveis, como por exemplo, autores descobriram que a taxa de maturação de mCherry segue uma cinética sigmoide em suas primeiras cinco horas de expressão (pouca maturação seguida de muita maturação) (HEBISCH et al., 2013).

Isso é relevante no presente estudo porquê as linhagens recombinantes foram intencionalmente protegidas pelo processo de microencapsulamento e de liofilização, para resistirem às condições adversas e atingir regiões mais distantes do trato gastrointestinal. Entretanto, é igualmente necessário que a microcápsula de alginato ou ração de peixe utilizadas sejam digeridas primeiramente para que posteriormente a bactéria láctea carreadora do plasmídeo seja capaz de ingressar nas células epiteliais desses peixes e, assim, atingir o núcleo celular das mesmas e, conseqüentemente, expressar a ORF da proteína mCherry, nas células intestinais. Por esse motivo, um alto coeficiente de variação, como o observado nesses casos, provavelmente se deve muito aos tempos díspares que determinadas quantidades da proteína de mCherry começaram a maturar, em relação a outras quantidades, numa determinada seção intestinal.

Tilápias vacinadas com o antígeno *Sip* de *S. agalactiae*, que foi fornecido após o microencapsulamento, conseguiram apresentar proteção de longo prazo contra essa doença (ZHANG et al., 2016). Da mesma maneira, CHEN et al., (2014) conseguiram, utilizando injeção parenteral de antígenos contra o vírus da necrose pancreática microencapsulados com alginato de sódio, induzir resposta humoral sistêmica satisfatória na mucosa do salmão do Atlântico (*Salmo salar*).

Considerando que a média da área de expressão da proteína mCherry aumentou cerca de 25 mil, 13 mil e 4 mil por cento, nas seções Anterior, Média e Posterior, respectivamente, com o método da liofilização, em comparação ao do microencapsulamento, esse se mostrou mais eficiente, para a Tilápia-do-Nilo. Formulações liofilizadas também se mostraram superiores a outras metodologias de proteção, em outras finalidades, como por exemplo, com emulsificantes (MORAIS et al., 2015).

Segundo REXROAD et al., (2002) formulações liofilizadas tornavam sua administração mais complexa, devido à dificuldade de reativação do composto ativo. A formulação liofilizada é hoje facilmente reconstituída e sua incorporação e posterior administração é facilitada (AMOROJ et al., 2008) em alimentos, como rações, já sendo uma metodologia prática de fornecimento. A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) vacinada oralmente com vírus liofilizado da septicemia hemorrágica viral, incorporado em ração comercial apresentou sobrevivência porcentual relativa considerada satisfatória (ADELMANN et al., 2008), que é geralmente estabelecido como a partir de 70% (MUNANGANDU et al., (2016), pelo motivo de nessas porcentagens, justificar o custo do tratamento.

O fornecimento de *L. Lactis* microencapsulado com alimentação forçada e/ou liofilizada e incorporada em ração comercial permitiu, em ambos os casos, a expressão da proteína mCherry nas células intestinais. Vários autores recentemente conseguiram produzir vacinas fornecidas oralmente, com eficácia considerada alta, que era o principal desafio da vacinação oral até então (EVANS et al., 2004, MUTOLOKI et al., 2015). MOHD ET AL. (2014) já observaram alta proteção em tilápias vacinadas, por via oral, usando vacinas com patógenos atenuados.

A bactéria microencapsulada fornecida por alimentação forçada apresentou expressão decrescente da expressão da proteína mCherry, ao longo das seções intestinais, em relação ao passar das horas. Isso está de acordo com o encontrado por HUANG et al., (2018), que forneceram linhagens atenuadas de *S. agalactiae* YM001 para tilápias, enquanto avaliaram sua distribuição ao longo dessas mesmas seções intestinais. Uma vacina contra *S. agalactiae* fornecida por gavagem oral apresentou também, sobrevivência porcentual relativa (SPR) intermediária (71.81%), em relação a injeção (96.88%) e imersão (67,22%), após 15 dias, porém, considerada satisfatória (LI et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados com fornecimento de plasmídeo de DNA incorporado em ração comercial, sendo considerado também satisfatório em tilápias (RAMOS et al., 2005).

Nos dois métodos de proteção da bactéria avaliados, não houve diferença estatística entre a área de expressão de mCherry nas seções Anterior e Média, porém, houve redução muito significativa ($p < 0.001$) em relação a área de expressão nos dois sistemas, na seção Posterior. A partir da seção Média (seção intermediária do intestino delgado), aumenta-se a pressão que a bactéria *L. lactis* sofre por parte do sistema digestivo da tilápia, pois, nessa seção, há grandes quantidades de secreções entéricas, tais como mucos, lisossomos, sucos pancreáticos e biliares, diversos tipos de lipases, ou ainda, células de Paneth (HARWIG et al., 1995, MALLOW et al., 1996).

A seção Posterior, expressou em média, 13% das outras duas seções, mesmo na primeira hora avaliada, pelo método de liofilização. No entanto, a expressão nessa seção aumentou 965% de 6 para 48 horas, quando cessou, assemelhando-se ao comportamento sigmoide acima discutido. Essa redução pode ser atribuída à passagem do alimento e, o aumento da pressão entérica a partir da seção Média, que parecem ditar majoritariamente a diferença observada.

No entanto, uma determinada expressão pode ser potencializada, quando necessário e, existem muitas abordagens viáveis para tal, como por exemplo, repetir e/ou aumentar a dosagem oferecida. Foi demonstrado, em peixes, que uma maior dose de vacina induz maior proteção (DUBEY et al., 2016). Outra alternativa, é adicionar uma variedade de metodologias de liberação controlada de drogas (JAMES et al., 2014). Essa estratégia foi inclusive adaptada para sistemas de entrega de DNA, para que esses possam aumentar sua extensão e a duração da expressão ao longo do intestino (PANNIER et al., 2004).

A amplitude máxima registrada com os métodos de microencapsulamento e liofilização (24 horas e 96 horas, respectivamente), sugerem que esses são os períodos ideais, em cada metodologia, para fornecimento de uma segunda dose de uma vacina de DNA teórica, seguindo tais metodologias. Pois, vários autores demonstraram que uma correlação direta entre aumento de SPR e aumento de dosagem de administração de antígeno para tilápias, contra doenças bacterianas é obtida (MUNANGANDU et al., 2016).

Também foi relatada uma relação direta de imunidade via vacinação de tilápias dose-dependente (MUNANGANDU et al., 2013, DUBEY et al., 2016). Já HUANG et al. (2014) encontraram uma SPR 57% maior com o fornecimento de duas doses ao invés de apenas uma, após o desafio com *S. agalactiae*.

De maneira semelhante, LI et al., (2015) obtiveram aumento de SPR de até 67,74% quando a mesma dose foi fornecida novamente, 15 dias após a primeira administração, contra essa mesma bactéria. Conclusões semelhantes foram encontradas até mesmo com outros sistemas de vacinação, tais como pela via de imersão. PONNERASSERY et al., (2016), por exemplo,

concluíram que, apesar de uma dose baixa de determinada vacina poder prover proteção significativa em peixes, a potencialização da mesma é necessária para sua máxima eficiência e, doses maiores e/ou prolongadas/repetidas, aparentemente também proveem proteção por mais tempo.

Conclusões:

Foi verificado que a bactéria *L. lactis MG1363* portando o plasmídeo pExu:mCherry é funcional em células intestinais de peixes, utilizando o promotor do Citomegalovirus (pCMV). Ambos os métodos de proteção do composto vacinal (microencapsulamento e liofilização) foram eficazes para sua formulação e administração em Tilápia-do-Nilo, permitindo a expressão da proteína mCherry em todas as regiões do intestino, inclusive na região Posterior, no período máximo de 96 horas. A expressão da proteína mCherry apresentou pico máximo às 24 horas após sua administração, com microencapsulamento, enquanto que, para o método com liofilização, esse tempo foi de 96 horas. Já a construção com o método da liofilização se mostrou mais eficiente para células de peixes, quando comparado com o microencapsulamento, ao expressar, aproximadamente, uma área de fluorescência 25 mil, 13 mil e 4 mil por cento maior, na seção Anterior, Média e Posterior, respectivamente, sendo assim, mais indicado para entrega de compostos vacinais nessas espécies, quando com vacinação oral, através de incorporação em ração comercial. As duas metodologias se mostraram significativamente inferiores quanto suas médias de expressão da proteína mCherry na seção Posterior do intestino dos peixes, em relação às outras seções intestinais, de modo que, a utilização de determinada metodologia de proteção, associada com técnicas de liberação controlada de substâncias bioativas, adaptadas para vacinação de DNA, é recomendada, para maior eficiência, especialmente nessa seção intestinal.

Pesquisas com plasmídeos vetoriais, expressando antígenos de interesse, em especial, pela administração oral, poderão ser realizadas futuramente, se embasando nessas descobertas.

Referências:

1. HILBECK, Angelika et al. Environmental risk assessment of genetically modified plants-concepts and controversies. **Environmental Sciences Europe**, v. 23, n. 1, p. 13, 2011.
2. MANCHA-AGRESTI, Pamela et al. A new broad range plasmid for DNA delivery in eukaryotic cells using lactic acid bacteria: in vitro and in vivo assays. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, v. 4, p. 83-91, 2017.
3. HOLVOLD, Linn B.; MYHR, Anne I.; DALMO, Roy A. Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. **Veterinary research**, v. 45, n. 1, p. 21, 2014.
4. HEPPELL, Joël et al. Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, n. 4, p. 271-286, 1998.
5. MORTAZAVIAN, Amir et al. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. 2007.
6. COELHO-ROCHA, Nina D. et al. Microencapsulation of lactic acid bacteria improves the gastrointestinal delivery and in situ expression of recombinant fluorescent protein. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2398, 2018.
7. ZHANG, Lei et al. Controlled and targeted release of antigens by intelligent shell for improving applicability of oral vaccines. **Biomaterials**, v. 77, p. 307-319, 2016.
8. CHEN, Lihan et al. Augmentation of the antibody response of Atlantic salmon by oral administration of alginate encapsulated IPNV antigens. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109337, 2014.
9. MALYALA, Padma; O'HAGAN, Derek T.; SINGH, Manmohan. Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 3, p. 218-225, 2009.
10. NGUYEN, David N. et al. Polymeric materials for gene delivery and DNA vaccination. **Advanced Materials**, v. 21, n. 8, p. 847-867, 2009.
11. SINGH, Manmohan et al. Cationic microparticles: a potent delivery system for DNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 2, p. 811-816, 2000.
12. COHEN, H. et al. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. **Gene therapy**, v. 7, n. 22, p. 1896-1905, 2000.
13. BALLESTEROS, Natalia A.; SAINT-JEAN, Sylvia Rodriguez; PEREZ-PRIETO, Sara I. Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Fish & shellfish immunology**, v. 37, n. 2, p. 220-228, 2014.
14. KUMAR, S. Rajesh et al. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 47-56, 2008.
15. VIMAL, S. et al. Delivery of DNA vaccine using chitosan–tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection. **Aquaculture**, v. 420, p. 240-246, 2014.
16. MANDAL, Amitesh. **Modification of a DNA Vaccine for Oral Administration in Fish for Aquaculture by Using Non-Microbial Nanoparticles**. 2010. Tese de Doutorado. Virginia Tech.
17. MANWARING, S. United States Patent Application Publication, Pub. Number: US, v. 98898, p. A1, 2002.

18. POXON, Scott W.; HUGHES, Jeffrey A. The effect of lyophilization on plasmid DNA activity. **Pharmaceutical development and technology**, v. 5, n. 1, p. 115-122, 2000.
19. BOWATER, R. O. et al. Epizootics of *Streptococcus agalactiae* infection in captive rays from Queensland, Australia. *Journal of fish diseases*, v. 41, n. 2, p. 223-232, 2018.
20. HOLMSTRÖM, Katrin et al. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International journal of food science & technology*, v. 38, n. 3, p. 255-266, 2003.
21. CHEN, Ming et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. *Veterinary microbiology*, v. 159, n. 3-4, p. 526-530, 2012.
22. HALLALI, Eyal et al. Dietary salt levels affect digestibility, intestinal gene expression, and the microbiome, in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PloS one*, v. 13, n. 8, p. e0202351, 2018.
23. AHMED, Nesar; GLASER, Marion. Can “Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA)” adapt to climate change in coastal Bangladesh. *Ocean & coastal management*, v. 132, p. 120-131, 2016.
24. DALMO, Roy Ambli. DNA vaccines for fish: review and perspectives on correlates of protection. *Journal of fish diseases*, v. 41, n. 1, p. 1-9, 2018.
25. ISHWARYA, S. Padma; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; STAPLEY, Andrew GF. Spray-freeze-drying: a novel process for the drying of foods and bioproducts. *Trends in Food Science & Technology*, v. 41, n. 2, p. 161-181, 2015.
26. BRON, Peter A.; VAN BAARLEN, Peter; KLEEREBEZEM, Michiel. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 66-78, 2012.
27. GRAEWE, Stefanie et al. Going live: a comparative analysis of the suitability of the RFP derivatives RedStar, mCherry and tdTomato for intravital and in vitro live imaging of *Plasmodium* parasites. 2009.
28. DUELLMAN, Tyler; BURNETT, John; YANG, Jay. Quantitation of secreted proteins using mCherry fusion constructs and a fluorescent microplate reader. *Analytical biochemistry*, v. 473, p. 34-40, 2015.
29. HEBISCH, Elke et al. High variation of fluorescence protein maturation times in closely related *Escherichia coli* strains. *PloS one*, v. 8, n. 10, p. e75991, 2013.
30. VAN ZYL, Winschau F.; DEANE, Shelly M.; DICKS, Leon MT. Use of the mCherry fluorescent protein to study intestinal colonization by *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 in mice. *Applied and environmental microbiology*, v. 81, n. 17, p. 5993-6002, 2015.
31. RUSSO, Pasquale et al. Zebrafish gut colonization by mCherry-labelled lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, n. 8, p. 3479-3490, 2015.
32. DUBEY, Saurabh et al. *Edwardsiella tarda* OmpA encapsulated in chitosan nanoparticles shows superior protection over inactivated whole cell vaccine in orally vaccinated fringed-lipped peninsula carp (*Labeo fimbriatus*). *Vaccines*, v. 4, n. 4, p. 40, 2016.
33. JAMES, Honey Priya et al. Smart polymers for the controlled delivery of drugs—a concise overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 4, n. 2, p. 120-127, 2014.
34. PANNIER, Angela K.; SHEA, Lonnie D. Controlled release systems for DNA delivery. *Molecular Therapy*, v. 10, n. 1, p. 19-26, 2004.
35. ZHU, Qing et al. Large intestine-targeted, nanoparticle-releasing oral vaccine to control genitoretal viral infection. **Nature medicine**, v. 18, n. 8, p. 1291-1296, 2012.

36. RUFF, Laura E. et al. Antigen-loaded pH-sensitive hydrogel microparticles are taken up by dendritic cells with no requirement for targeting antibodies. **Integrative Biology**, v. 5, n. 1, p. 195-203, 2013.
37. NUR-NAZIFAH, M.; SABRI, M. Y.; SITI-ZAHRAH, A. Development and efficacy of feed-based recombinant vaccine encoding the cell wall surface anchor family protein of *Streptococcus agalactiae* against streptococcosis in *Oreochromis* sp. **Fish & shellfish immunology**, v. 37, n. 1, p. 193-200, 2014.
38. FIRDAUS-NAWI, Mohd et al. Efficacy of feed-based adjuvant vaccine against *S. streptococcus agalactiae* in *O. reochromis* spp. in Malaysia. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 1, p. 87-96, 2013.
39. HUANG, L. Y. et al. Safety and immunogenicity of an oral DNA vaccine encoding Sip of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* delivered by live attenuated *Salmonella typhimurium*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 38, n. 1, p. 34-41, 2014.
40. EVANS, Joyce J.; KLESIUS, Phillip H.; SHOEMAKER, Craig A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. **Vaccine**, v. 22, n. 27-28, p. 3769-3773, 2004.
41. MUTOLOKI, Stephen; MUNANG'ANDU, Hetron Mweemba; EVENSEN, Øystein. Oral vaccination of fish-antigen preparations, uptake, and immune induction. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 519, 2015.
42. HUANG, Ting et al. Spatiotemporal distribution of *Streptococcus agalactiae* attenuated vaccine strain YM001 in the intestinal tract of tilapia and its effect on mucosal associated immune cells. **Fish & shellfish immunology**, v. 87, p. 714-720, 2019.
43. RAMOS, Erwin A.; RELUCIO, Jenne Liza V.; TORRES-VILLANUEVA, Celia Aurora T. Gene expression in tilapia following oral delivery of chitosan-encapsulated plasmid DNA incorporated into fish feeds. **Marine biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 89-94, 2005.
44. LI, L. P. et al. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage in vitro. **Fish & shellfish immunology**, v. 45, n. 2, p. 955-963, 2015.
45. MUNANG'ANDU, Hetron Mweemba et al. Antigen dose and humoral immune response correspond with protection for inactivated infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). **Veterinary research**, v. 44, n. 1, p. 7, 2013.
46. MUNANG'ANDU, Hetron Mweemba; PAUL, Joydeb; EVENSEN, Øystein. An overview of vaccination strategies and antigen delivery systems for *Streptococcus agalactiae* vaccines in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 48, 2016.
47. ANDRADE, Ana Margarida Dias Santos de Azevedo. *Microflora Intestinal: uma Barreira Imunológica Desconhecida*. 2011.
48. POWWELS, Peter H.; LEER, Rob J.; BOERSMA, Wim JA. The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. **Journal of biotechnology**, v. 44, n. 1-3, p. 183-192, 1996.
49. REXROAD, Jason et al. Lyophilization and the thermostability of vaccines. **Cell Preservation Technology**, v. 1, n. 2, p. 91-104, 2002.
50. AMORIJ, J. P. et al. Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 6, p. 1256-1273, 2008.
51. DO VALE MORAIS, Andreza Rochelle et al. Freeze-drying of emulsified systems: A review. **International journal of pharmaceuticals**, v. 503, n. 1-2, p. 102-114, 2016.
52. ADELMANN, Malte et al. Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. **Vaccine**, v. 26, n. 6, p. 837-844, 2008.


53. CORBEIL, S. et al. Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, n. 1, p. 29-36, 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novas abordagens com plasmídeos vetoriais, expressando antígenos de interesse, em especial via a administração oral, para a vacinação de DNA, poderão ser realizadas futuramente, se embasando nessas descobertas, no combate a doenças que causam prejuízos ao setor da piscicultura.

ANEXO.

Anexo 1. Parecer da comissão de ética no uso de animais da UFMG.

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 335/2019	
Título do projeto: Nova vacina de DNA contra Estreptococose em Tilápias-do-Nilo	
Finalidade: Pesquisa	
Pesquisador responsável: Diego Vicente da Costa	
Unidade: Instituto de Ciências Agrárias	
Departamento: Instituto de Ciências Agrárias	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião do dia 02/03/2020. Validade: 02/03/2020 à 01/03/2025. Belo Horizonte, 03/03/2020.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br	