



Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

MELLANIE KAROLINE DO CARMO FÉLIX

**ANTÍGENO INATIVADO DE *CLOSTRIDIUM NOVYI* TIPO B EM
EMULSÃO W/O: UMA PROVA DE CONCEITO EM CAMUNDONGOS
SWISS VISANDO O CONTROLE DE NECROSE HEPÁTICA DE
RUMINANTES**

GURUPI - TO
2018



Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

MELLANIE KAROLINE DO CARMO FÉLIX

**ANTÍGENO INATIVADO DE *CLOSTRIDIUM NOVYI* TIPO B EM
EMULSÃO W/O: UMA PROVA DE CONCEITO EM CAMUNDONGOS
SWISS VISANDO O CONTROLE DE NECROSE HEPÁTICA DE
RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu

**GURUPI - TO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

F316a Félix, Mellanie Karoline do Carmo.
Antígeno inativado de Clostridium novyi tipo B em emulsão W/O:
Uma prova de conceito em camundongos Swiss visando o controle de
necrose hepática de ruminantes. / Mellanie Karoline do Carmo Félix. –
Gurupi, TO, 2018.
81 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do
Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-
Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2018.

Orientador: Alex Sander Rodrigues Cangussu

1. Clostridioses. 2. Necrose hepática. 3. Vacinas. 4.
Imunogenicidade. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que
citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime
estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-1649 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br



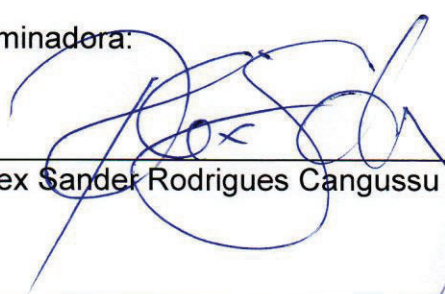
MELLANIE KAROLINE DO CARMO FÉLIX

Antígeno inativado de *Clostridium novyi* Tipo B em emulsão W/O: uma prova de conceito em camundongos Swiss visando o controle de necrose hepática de ruminantes.

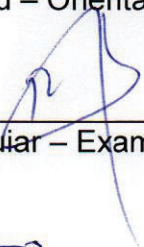
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 09/03/2018 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 09/03/2018.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Alex Sander Rodrigues Cangussu – Orientador - UFT



Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar – Examinador - UFT



Prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro – Examinador - UnB

Gurupi (TO).
2018.

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela vida, sabedoria e por ter me permitido a realidade de um sonho e a Nossa Senhora Aparecida pelas tantas bênçãos concedidas e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais.

Aos meus pais Maria e Geraldo que durante toda uma vida sacrificaram os seus sonhos para que os meus fossem realizados, me incentivando, encorajando, me amando e torcendo sempre por mim mesmo a distância.

À minha irmã Fernanda Karine que sempre me encorajou, amparou em todos os momentos e me deu força para que meus objetivos fossem alcançados.

A todos meus familiares que mesmo distantes se fizeram presente com ensinamentos e com mensagens de apoio.

A todos meus professores que sempre me auxiliaram nas mais variadas ocasiões e possibilitaram direta ou indiretamente o desenrolar deste trabalho, em especial ao meu orientador Alex Sander Rodrigues Cangussu que sempre me incentivou, corrigiu e motivou com seus conselhos e conhecimentos.

O meu muito obrigado ao meu namorado Matheus Chaves que tantas vezes soube me entender nas horas de angústias e trabalhos com compreensão e carinho.

A todos meus amigos e colegas pelas palavras de conforto, pelo companheirismo e incentivos dados durante todo o período da minha graduação.

À Universidade Federal do Tocantins – UFT, campus de Gurupi, que me proporcionou a realização deste sonho com oportunidades e infraestrutura.

Só tenho a agradecer por tudo o que vivi nestes anos...

RESUMO

A bovinocultura brasileira possui grande ênfase no mercado nacional. Doenças que acometem rebanhos comprometem o mercado além de gerarem grandes prejuízos econômicos. O *Clostridium novyi* tipo B provoca necrose hepática em bovinos através da produção da alfa toxina, uma potente exotoxina que reduz a produtividade através de alterações como hemoglobinúria, redução do apetite, febre, letargia, diminuição da produção de leite e sangue nas fezes. Conter o microrganismo causador torna-se uma busca necessária tanto do ponto de vista econômico quanto social. Entretanto, o controle da doença ainda é realizado por vacinas formuladas com múltiplos antígenos. A emulsão pode ser uma alternativa promissora para a melhoria da adsorção de antígenos nas formulações vacinais. Camundongos da linhagem Swiss foram utilizados a fim de se avaliar aspectos clínicos e validar resultados referentes a composição de uma nova formulação vacinal contendo adjuvante Montanide ISA 61 VG e antígeno inativado de *C. novyi*. Os testes de caracterização e antigenicidade indicaram a presença da proteína alfa toxina na composição avaliada. A imunogenicidade do antígeno inativado em emulsão W/O (água/óleo) foi verificada e a proporção empregada (40/60) mostrou ser ideal no uso de múltiplos antígenos, apresentando inocuidade, estabilidade do produto, liberação controlada e estímulo da resposta imune. A determinação da concentração de antígeno foi averiguada pela relação antígeno ativo e inativado com soros de animais doentes, visto a eficácia vacinal de 40%. A adequação da concentração de alfa toxina inativada na emulsão mostrou ser necessária para atingir melhores valores de proteção animal. Análises de hemograma, bioquímicas e morfologia de fígado, baço e coxa contribuíram para elucidar os efeitos da emulsão e comprovar necrose hepática nos grupos não imunizados, além de sugerir avanços na adsorção de vacinas. Os resultados possibilitaram o estabelecimento de um modelo murino de infecção de *C. novyi* com futuras aplicações relacionadas à produção vacinal com múltiplos antígenos emulsificados para controle das clostridioses.

Palavras-chave: bovinocultura; *Clostridium novyi* tipo B; alfa toxina; necrose hepática; modelo murino; vacinas; emulsão; imunogenicidade.

ABSTRACT

Brazilian cattle breeding has great emphasis on the national market. Diseases that affect herds compromise the market as well as generate great economic losses. *Clostridium novyi* type B causes hepatic necrosis in cattle through the production of alpha toxin, a potent exotoxin that reduces productivity through changes such as hemoglobinuria, reduced appetite, fever, lethargy, decreased milk and stool production. Containing the causative micro-organism becomes a necessary quest both economically and socially. However, control of the disease is still performed by vaccines formulated with multiple antigens. The emulsion may be a promising alternative for the improvement of antigen adsorption in vaccine formulations. Swiss strain mice were used to evaluate clinical aspects and validate results regarding the composition of a new vaccine formulation containing Montanide ISA 61 VG adjuvant and *C. novyi* inactivated antigen. Characterization and antigenicity tests indicated the presence of the alpha toxin protein in the evaluated composition. The immunogenicity of antigen inactivated in W / O emulsion (water / oil) was verified and the ratio employed (40/60) showed to be ideal in the use of multiple antigens, presenting innocuousness, product stability, controlled release and stimulation of the immune response. The determination of the antigen concentration was investigated by the active antigen ratio and inactivated with sera from sick animals, since the vaccine efficacy was 40%. The suitability of the inactivated alpha toxin concentration in the emulsion was shown to be necessary to achieve better animal protection values. Hemogram, biochemical and liver, spleen and thigh morphology contributed to elucidate the effects of the emulsion and to verify hepatic necrosis in the nonimmunized groups, in addition to suggesting advances in the adsorption of vaccines. The results allowed the establishment of a murine model of *C. novyi* infection with future applications related to the vaccine production with multiple emulsified antigens to control clostridia.

Keywords: cattle breeding; *Clostridium novyi* type B; alpha toxin; hepatic necrosis; murine model; vaccines; emulsion; immunogenicity.

SUMÁRIO

| | | |
|---|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 | CLOSTRIDIOSES E O MERCADO DA BOVINOCULTURA | 15 |
| 2.1.1 | <i>Necrose hepática de bovinos e agente infeccioso</i> | 15 |
| 2.2 | DIAGNÓSTICOS DE NECROSE HEPÁTICA..... | 17 |
| 2.3 | VACINAS EMPREGADAS PARA O CONTROLE DE NECROSE HEPÁTICA..... | 18 |
| 2.4 | ADJUVANTE OLEOSO E EMULSÃO | 20 |
| 2.5 | MODELO IDEAL DE RESPOSTA IMUNE PARA CONTROLE DA CLOSTRIDIOSES | 22 |
| 2.6 | MODELOS MURINOS EMPREGADOS PARA ANÁLISES DE RESPOSTA A VACINAS..... | 25 |
| CAPÍTULO I: ALPHA TOXIN BY <i>CLOSTRIDIUM NOVYI</i> TYPE B CAUSES HISTOPATHOLOGICAL INJURIES IN MURIN MODELS | | 28 |
| 1 | INTRODUCTION | 29 |
| 2 | MATERIALS AND METHODS | 31 |
| 2.1 | MOUSE LINE AND ETHICAL ASPECTS..... | 31 |
| 2.2 | ANESTHESIA AND EUTHANASIA..... | 31 |
| 2.3 | BACTERIAL LINEAGE AND CULTURE CONDITIONS | 31 |
| 2.4 | DETERMINATION AND INACTIVATION OF ALPHA TOXIN | 32 |
| 2.5 | INOCULATION OF TOXIN AND TOXOID IN MICE | 32 |
| 2.6 | HEMATOLOGICAL ANALYSIS | 32 |
| 2.7 | STATISTICAL ANALYSIS | 33 |
| 3 | RESULTS | 34 |
| 4 | DISCUSSION | 36 |
| 5 | CONCLUSIONS | 38 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| CAPÍTULO 2: EFFECTIVENESS OF VACCINE WITH INACTIVATED ALPHA TOXIN FROM <i>C. NOVYI</i> TYPE B FORMULATED IN W/O EMULSION WITH EVALUATION IN SWISS MICE | | 47 |
| HIGHLIGHTS | | 48 |
| 1 | INTRODUCTION | 50 |
| 2 | MATERIALS AND METHODS | 52 |
| 2.1 | MOUSE LINES AND ETHICS IN ANIMAL EXPERIMENTATION | 52 |
| 2.2 | ANESTHESIA AND EUTANÁSIA | 52 |
| 2.3 | BACTERIAL LINEAGE AND CULTURE CONDITIONS | 52 |
| 2.4 | DETERMINATION AND INACTIVATION OF ALPHA TOXIN | 53 |
| 2.5 | W/O 40/60 VACCINE EMULSION | 53 |
| 2.6 | CHARACTERIZATION AND ANTIGENICITY OF INACTIVATED ALPHA TOXIN | 53 |
| 2.7 | IMMUNOGENICITY ASSAY..... | 54 |
| 2.8 | HEMATOLOGIC DATA AND LIVER FUNCTION..... | 55 |
| 2.9 | MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF LIVER, SPLEEN AND INOCULATED RIGHT THIGH..... | 55 |
| 2.10 | STATISTICAL ANALYSIS | 55 |
| 3 | RESULTS | 57 |
| 4 | DISCUSSION | 60 |
| 5 | CONCLUSIONS | 63 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |

CONCLUSÃO GERAL.....77
REFERÊNCIAS.....78