

**Desenvolvimento e avaliação de vacinas de DNA contra  
*Photobacterium damselae* subsp. *piscicida***

Beatriz Isabel Pires Dos Santos

2021

# **Desenvolvimento e avaliação de vacinas de DNA contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***

Beatriz Isabel Pires Dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Especialista Teresa Baptista,  
Professora Marília Mateus e Professor Gabriel Monteiro

2021

**Título:** Desenvolvimento e avaliação de vacinas de DNA contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Copyright © Beatriz Isabel Pires Dos Santos

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2021

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

Quero agradecer a quem me apoiou desde o primeiro dia e a todos que estiveram envolvidos, de alguma forma, neste projeto; aos meus orientadores, professora Marília Mateus, professor Gabriel Monteiro e professora Teresa Baptista, que estiveram disponíveis para me ajudar sempre que necessário.

Agradeço aos meus amigos, que estiveram sempre do meu lado e me deram um ombro amigo, e à minha família e ao meu namorado pelo apoio incondicional, por me acompanharem nas minhas pequenas vitórias e também nos dias mais frustrantes.

Um obrigado aos membros do iBB, do Instituto Técnico de Lisboa, que me ajudaram sempre que possível, mas em especial, quero agradecer a Cláudia Aves por ter tido muita paciência comigo e por me ter acompanhado em grande parte desta aventura, e obrigada também a alguns membros do edifício Cetemares, que me ajudaram, em especial a Damiana Pires, que me acompanhou nos últimos momentos.

Por fim, obrigada Catarina Lapa, minha colega e grande amiga, que me acompanhou sempre durante este ano, de longe, mas sempre de perto, não de maneira prática, mas ajudando-me a manter-me sã e focada para terminar este trabalho.

## Resumo

Uma das bactérias frequentemente encontrada em aquacultura é *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Esta bactéria é responsável pela doença fotobacteriose, afetando mais de vinte espécies. Um dos grandes fatores de virulência desta bactéria é a capacidade de adquirir ferro do hospedeiro pela produção de sideróforos específicos, piscibactinas, sendo esta transportada pela proteína FrpA. Já existem alguns tipos de vacinas no mercado contra fotobacteriose, mas nenhuma é uma vacinas de DNA. Este trabalho tem como objetivo construir plasmídeos que codificam a sequência genética da proteína FrpA ou fragmentos desta proteína escolhidos por terem elevado potencial imunológico, desenvolver e produzir vacinas de DNA utilizando estes plasmídeos e verificar a sua eficácia, testando-as em robalos juvenis e avaliando a sua eficácia, recorrendo a ELISA indireto e à análise da percentagem relativa de sobrevivência (RPS).

Desenharam-se três plasmídeos: um com o gene completo da proteína FrpA, pVAX-FrpA-GFP, e dois plasmídeos com sequencias genómicas dos fragmentos escolhidos, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP. Apenas se conseguiu obter os plasmídeos com os fragmentos. Estes plasmídeos foram produzidos em quantidade necessária para vacinar 78 robalos (com certa de 15 g) por tratamento, havendo 4 tratamentos em triplicado. No tratamento 1 foi utilizada uma vacina contendo pVAX-GFP suplementada com adjuvante Montanide ISA 763 A VG, nos tratamentos 2 e 3 foram utilizadas vacinas suplementadas com o mesmo adjuvante, mas contendo os plasmídeos pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP, respetivamente. Por último, no tratamento 4 foi utilizada uma vacina contendo também pVAX-Frag6-GFP, porém suplementada com o adjuvante Montanide Gel 02 PR. A dose administrada de vacina para cada tratamento foi de  $1,2 \mu\text{g pDNA/g peixe}$ . Os peixes controlo foram injetados com PBS estéril.

Os peixes tratados com vacinas suplementadas com Montanide ISA contendo os plasmídeos pVAX-GFP e pVAX-Frag1-GFP sofreram mortalidade, no tempo de imunização, de 12% e 26%, respetivamente. Esta pode estar relacionada com os efeitos secundários deste adjuvante. Por outro lado, apenas em peixes vacinados com este adjuvante foram detetados títulos de anticorpos e aumento destes ao longo do tempo (de 15 dias para 30 dias após vacinação), nos ensaios ELISA indireto. Todas as vacinas concederam valores de RPS elevados após infeção, superiores a 70%. A vacina pVAX-Frag6-GFP suplementada com Montanide ISA alcançou um RPS de 93%, seguida da vacina contendo o vetor pVAX-GFP com um RPS de 86% e depois, as vacinas contendo os plasmídeos pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP suplementadas com Montanide ISA e Montanide Gel, respetivamente,

com um RPS de 73%. Os peixes de controlo, injetados com PBS obtiveram um valor de RPS de 0%, não havendo sobrevivência após 5 dias de infeção.

**Palavras-Chave:** *Photobacterium*; Fotobacteriose; Vacina; FrpA; ELISA; RPS

## Abstract

One of the most frequent bacteria in aquaculture is *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. This bacteria is responsible for the photobacteriosis disease, affecting more than twenty species. One of the major virulence factors of this bacteria is the ability to acquire iron from the host through the production of specific siderophores, piscibactin, which is transported by the FrpA protein. There are already some types of vaccines against photobacteriosis on the market, but there are still no DNA vaccines. This work aims to build plasmids that encode the genetic sequence of the FrpA protein or fragments of this protein chosen for having high immunological potential; to develop and produce DNA vaccines using these same plasmids; to verify their effectiveness, testing them in juvenile sea bass and using indirect ELISA and relative percent survival analysis.

Three plasmids were designed: one with the complete FrpA gene, pVAX-FrpA-GFP, and two plasmids with genomic sequences of the chosen fragments, pVAX-Frag1-GFP and pVAX-Frag6-GFP. Only plasmids with fragments could be obtained. These plasmids were produced in the necessary amount to vaccinate 78 sea bass (about 15 g) per treatment, with 4 treatments in triplicate. In treatment 1 it was used a vaccine containing pVAX-GFP supplemented with Montanide ISA 763 A VG adjuvante. In treatments 2 and 3 were used vaccines supplemented with the same adjuvant, but containing plasmids pVAX-Frag1-GFP and pVAX-Frag6-GFP, respectively. Finally, in treatment 4 a vaccine also containing pVAX-Frag6-GFP was used, but supplemented with the adjuvant Montanide Gel 02 PR. The administered dose of vaccine for each treatment was  $1.2 \mu\text{g}_{\text{pDNA/g fish}}$ . Control fish were injected with sterile PBS.

There was mortality in the 30 days after vaccination, in the group of fish vaccinated with vaccines supplemented with Montanide ISA (11% in fish vaccinated with pVAX-GFP and 22% in fish vaccinated with pVAX-Frag1-GFP), which may be related to the side effects of this adjuvant. On the other hand, only in fish vaccinated with this adjuvant were detected antibody titers and their increase over time (from 15 days to 30 days after vaccination). All vaccines gave high RPS values after infection, above 70%. Vaccine with pVAX-Frag6-GFP supplemented with Montanide ISA provided an RPS of 93%, the vaccine with pVAX-GFP provided an RPS of 86% and the vaccines with pVAX-Frag1-GFP and pVAX-Frag6-GFP (supplemented with Montanide Gel) provided an RPS of 73%. Control fish, vaccinated with PBS, obtained an RPS value of 0%, with no survival after 5 days of infection.

**Key-Words:** *Photobacterium*; Photobacteriosis; Vaccine; FrpA; ELISA; RPS.

# Índice

Agradecimentos .....	iv
Resumo.....	v
<i>Abstract</i> .....	vii
Lista de Figuras.....	x
Figuras do Anexo.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Tabelas do Anexo.....	xiii
Lista de equações .....	xiv
Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .....	1
1.2. Sistema imunológico dos teleósteos .....	5
1.2.1. ELISA - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> .....	6
1.3. Vacinação em aquacultura .....	8
1.3.1. Vacinas contra fotobacteriose .....	9
1.3.2. Vacinas de DNA.....	12
1.4. Utilização de nanopartículas em vacinas.....	13
1.4.1. Nanopartículas de quitosano.....	14
1.5. Plasmídeo de DNA.....	15
1.6. Reação em cadeia da polimerase .....	17
1.6.1. <i>Primers</i> .....	18
2. Objetivos.....	20
3. Metodologia .....	21
3.1. Desenho e construção molecular de plasmídeos codificantes de antígeno .....	21
3.1.1. Análises Bioinformáticas .....	22
3.1.2. Desenho de <i>primers</i> .....	22
3.1.3. Crescimento bacteriano de Phdp .....	23
3.1.4. Purificação de DNA genómico de Phdp .....	24
3.1.5. Cultivo de <i>E. coli</i> e purificação do plasmídeo pVAX-GFP.....	24
3.1.6. Amplificação do gene da FrpA .....	25
3.1.7. Digestão do plasmídeo pVAX-GFP .....	26
3.1.8. Construção dos fragmentos 1 e 6 .....	26
3.1.9. Construção dos plasmídeos pVAX-FrpA-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP.....	27




3.2.	Desenvolvimento das vacinas de DNA.....	28
3.2.1.	Produção de pDNA .....	28
3.2.2.	Lise alcalina e purificação primária de pDNA .....	29
3.2.3.	Purificação de pDNA por HIC.....	29
3.2.4.	Concentração e dessalinização por diafiltração.....	30
3.2.5.	Junção dos adjuvantes.....	30
3.2.6.	Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosano-TPP.....	32
3.2.7.	Encapsulamento de pDNA .....	32
3.3.	Avaliação da eficácia das vacinas de DNA.....	33
3.3.1.	Desenho experimental .....	33
3.3.2.	Imunização dos peixes.....	33
3.3.3.	Infeção com <i>Photobacterium damselae</i> subs. <i>piscicida</i> .....	35
3.3.4.	Colheitas de sangue e tratamento das amostras.....	36
3.3.5.	ELISA indireto .....	37
3.3.6.	Cálculo do RPS.....	39
3.3.7.	Análise estatística .....	39
4.	Resultados e Discussão de Resultados .....	40
4.1.	Análises Bioinformáticas .....	40
4.2.	Crescimento bacteriano de Phdp .....	43
4.3.	Construção de plasmídeos: pVAX-FrpA-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP .....	44
4.4.	Purificação de pDNA .....	52
4.5.	Síntese e Encapsulamento de Nanopartículas de CS-TPP .....	56
4.6.	Avaliação da eficácia das vacinas de DNA.....	58
5.	Conclusão e Perspetivas Futuras.....	64
6.	Referências Bibliográficas.....	67
7.	Anexos.....	79







## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – TBDTs envolvidos na captação de sideróforo-ferro e em cascatas de sinalização que regulam a expressão de genes envolvidos na aquisição de ferro. ME: Membrana externa; MI: Membrana interna. Adaptado de Schalk et al. (2012) .....	4
<b>Figura 2</b> - Sistema imunológico inato (esquerda) e adaptativo (direita). Tempo de respostas de cada sistema imunológico. Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções (primeiras horas). As respostas imunes adaptativas desenvolvem-se mais tarde. Os tempos de resposta podem variar. APCs: Células apresentadoras de antígeno ...	5
<b>Figura 3</b> - Diferentes métodos de ELISA. Elisa direto, indireto e sandwich. Ag: Antígeno. Adaptado da plataforma Researchgate, <a href="https://www.researchgate.net/figure/ELISA-assays-Direct-ELISA-mostly-used-for-antigen-detection-Indirect-ELISA-mainly-used_fig3_320265684">https://www.researchgate.net/figure/ELISA-assays-Direct-ELISA-mostly-used-for-antigen-detection-Indirect-ELISA-mainly-used_fig3_320265684</a> .....	7
<b>Figura 4</b> - Estrutura química de quitosano. Retirado de Mahapatro & Singh, 2011 .....	14
<b>Figura 5</b> – Elementos genéticos de uma vacina de DNA plasmídico. Retirado de Glentig & Wessels, 2005.....	16
<b>Figura 6</b> – Mapa de pVAX-GFP e as respectivas enzimas de corte. Obtido pelo software Snapgene.....	17
<b>Figura 7</b> – Componentes necessários para a reação de PCR e etapas efetuadas durante esta técnica. Adaptado de <a href="https://thebiologynotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr/">https://thebiologynotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr/</a> .....	18
<b>Figura 8</b> - Plasmídeos codificantes de antígeno, a partir de um plasmídeo construído anteriormente, pVAX-GFP (A), utilizando a sequência da proteína FrpA (B), o fragmento 1 (C) e o fragmento 6 (D). Estes dois fragmentos foram selecionados da sequência original de FrpA, tal como descritos no procedimento 3.1.1. Análises Bioinformáticas .....	21
<b>Figura 9</b> - Aquários utilizados para imunização. Cada aquário de 20 litros contém 26 peixes. Feitos em triplicado. Controlo - Peixes vacinados com PBS; T1 – Peixes vacinados com pVAX-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; T2 – Peixes vacinados com pVAX-Frag1-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; T3 – Peixes vacinados com pVAX-Frag6-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; T4– Peixes vacinados com pVAX-Frag6-GFP com adjuvante Montanide Gel 02 PR; SUMP – Sistemas de recirculação de águas utilizados para cada tratamento; Aquários enumerados com letras e cada número simboliza uma divisória .....	34
<b>Figura 10</b> – Procedimento para obter a placa com diluições. Sendo a linha A amostras duplicadas diluídas de 1:32 e as restantes linhas (até G) diluições sucessivas. A linha H corresponde ao controlo negativo .....	38
<b>Figura 11</b> - Curva de crescimento da bactéria <i>Photobacterium damsela</i> subsp piscicida em TSB suplementado com 2% NaCl, a 25°C, em incubador orbital a 250 rpm.....	43
<b>Figura 12</b> – a) Representação do plasmídeo pVAX-GFP. Vermelho: locais de recorte das enzimas de restrição NheI e EcoRI. Obtido através do software ApE; b) Representação da sequência de corte das enzimas de restrição NheI e EcoRI.....	44
<b>Figura 13</b> – Eletroforese de pVAX-GFP digerido. T: Tamanho das bandas (bp); M: Padrão; A: pVAX-GFP não digerido; B: pVAX-GFP digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI. C: Corte da amostra B .....	45
<b>Figura 14</b> – Eletroforese de pVAX-GFP digerido. T: Tamanho das bandas (bp); M: Padrão; A: pVAX-GFP não digerido; B: pVAX-GFP digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI; C e D: Corte das bandas .....	46
<b>Figura 15</b> – Eletroforese relativa às diversas frações de gDNA de Phdp. T: Tamanho das bandas (bp) de M; M: Padrão; A, B, C e D: Amostras gDNA purificadas relativas ao Erlenmeyer I, por ordem; E, F, G e H: Amostras purificadas relativas ao Erlenmeyer II, por ordem.....	47

<b>Figura 16</b> - Eletroforese referente às aos produtos da amplificação do gene da FrpA por PCR do gDNA de Phdp. T: Tamanho das bandas (bp) de M; M: Padrão; A: Amostra de 2l purificada; B, C, D, E, F, G, H e I: Amostras de PCR resultantes de diferentes temperaturas de annealing. As temperaturas foram de 48°C; 49,3°C; 51,5°C; 53,8°C; 56,2°C; 58,5°C; 60,7°C e 62°C, respetivamente e pela ordem indicada.....	48
<b>Figura 17</b> – Eletroforese relativa aos produtos de amplificação de FrpA. T: Tamanho das bandas (bp) de M; M: Padrão; A: 10 µl de amostra de FrpA; B, C e D: amostra A, com um maior volume e com o recorte feito para obter a banda pretendida .....	49
<b>Figura 18</b> - Placas referentes a colónias com plasmídeos de pVAX-FrpA-GFP com 10 ng (a) e com 100ng (b), pVAX-Frag1-GFP (c) e pVAX-Frag6-GFP (d), com as colónias escolhidas; (e) Gel referente a duas colónias escolhidas de pVAX-Frag1-GFP; (f) Gel referente às três colónias escolhidas de pVAX-Frag6-GFP; T: Tamanho das bandas do Padrão; M: Padrão; A: amostras purificadas; B: amostras purificadas e digeridas com EcoRI; C: amostras purificadas e digeridas com NheI. ....	50
<b>Figura 19</b> – Perfis cromatográficos nas etapas de HIC. a) pico de escoamento contendo impurezas não hidrófobas e primeiro pico de HIC que contém pDNA de círculo aberto (oc); b) segundo pico de HIC que contém pDNA superenrolado (sc); c) RNA e outras impurezas. Adaptado de Urthaler et al., 2005.....	53
<b>Figura 20</b> – Perfis cromatográficos de HIC de pDNA relativos a pVAX-GFP (a, b e c); pVAX-Frag1-GFP (d, e e f); e pVAX-Frag6-GFP (g, h e i). Absorvância a 260 nm (azul) e condutividade (cinzento) versus volume da coluna.....	54
<b>Figura 21</b> - Robalos juvenis com a) bexiga natatória hiper-insuflada e resíduo de adjuvante externo aos órgãos (circundado a vermelho) e b) intestino com tonalidade verde, ao final de 30 dias após vacinação .....	60
<b>Figura 22</b> – Anticorpos presentes no soro de peixes tratados com vacinas contendo pVAX-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP, suplementadas com adjuvante Montanide ISA 763 A VG e adjuvante Montanide Gel 02 PR.....	61
<b>Figura 23</b> – Mortalidade ao longo do período de infeção com Phdp .....	62

## Figuras do Anexo

<b>Figura A 1</b> – Detecção de <i>Photobacterium damsela</i> subs. piscicida em órgãos de peixes moribundos, através da amplificação dos genes Car (269 bp) e Pbp (277 bp). M-marcador molecular (50 bp, ThermoFisher, EUA); (-) -controlo negativo; (+) -controlo positivo; M1-peixe moribundo 1; M2-peixe moribundo 2; M3-peixe moribundo 3; M4-peixe moribundo 4.	82
<b>Figura A 2</b> - Péptidos previstos para FrpA, usando escala de acessibilidade de superfície de Emini, retirado do software IEDB.....	83
<b>Figura A 3</b> - Péptidos previstos para FrpA, usando previsão de hidrofília de Parker, retirado do software IEDB .....	83
<b>Figura A 4</b> - Hot spots da proteína FrpA, utilizando o software AGGRESCAN .....	83
<b>Figura A 5</b> - Fragmentos da proteína FrpA que estão no espaço extracelular (a azul), na membrana transmembranar (a vermelho) e no espaço periplasmático (a verde). Obtido através do software PRED-TMBB .....	84
<b>Figura A 6</b> - Estruturas secundárias, acessibilidade de superfície relativa e desordem de cada um dos fragmentos. Sendo que A corresponde ao fragmento 1 (160-175), B ao fragmento 2 (168-186), C ao fragmento 3 (263-276), D ao fragmento 4 (258 a 276), E ao fragmento 5 (314-327), F ao fragmento 6 (402-416) e F ao fragmento 7 (445-468). Acessibilidade de superfície relativa: o vermelho está exposto e o azul está oculto, com limite de 25%. Estrutura secundária:  Helix,  Strand e  Coil. Desordem: a espessura da linha é igual à probabilidade de resíduo desordenado. Existe uma maior desordem na parte que está mais exposta. Obtido através do software NetSurfP .....	87

<b>Figura A 7</b> - Representação gráfica de 660 previsões de resíduos em 1 sequência. Acessibilidade de superfície relativa:   o vermelho está exposto e o azul está oculto, com limite de 25%. Estrutura secundária:  Helix,  Strand,  Coil. Desordem:  a espessura da linha é igual à probabilidade de resíduo desordenado. Obtido através do software NetSurfP .....	88
<b>Figura A 8</b> - Tradução das sequências esperadas nos plasmídeos, relativos a (A) pVAX-Frag1-GFP e (B) pVAX-Frag6-GFP; e tradução das sequências obtidas nos plasmídeos pelo sequenciamento, utilizando um primer universal forward, CMV-F, relativos a (C) pVAX-Frag1-GFP; e (E) pVAX-Frag6-GFP; e utilizando um primer universal reverse, EGFP-CR, relativo a (D) pVAX-Frag1-GFP; (F) pVAX-Frag6-GFP; Azul em (A) e (B): sequência relativa aos fragmentos 1 e 6, respectivamente. Obtido com o software ExPASy .....	89
<b>Figura A 9</b> - Eletroforese para confirmação da purificação de pVAX-GFP digerido. T: Tamanho das bandas (bp) de M; M: Padrão; A: amostras pVAX-GFP não digerido; B: pVAX-GFP digerido e purificado.....	89
<b>Figura A 10</b> - Tradução da sequência esperada do plasmídeo relativo a pVAX-FrpA-GFP; Azul: sequência relativa a FrpA. Obtido com o software ExPASy .....	90

## Lista de Tabelas

<b>Tabela I</b> – Vacinas desenvolvidas contra <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .....	10
<b>Tabela II</b> - Componentes e volumes necessários para fazer a digestão de pVAX-GFP .....	26
<b>Tabela III</b> - Volumes utilizados para a preparação da emulsão de adjuvante Montanide Gel 02 PR com pDNA .....	31
<b>Tabela IV</b> - Volumes utilizados para as preparações das emulsões de adjuvante Montanide ISA 763 A VG com pDNA .....	31
<b>Tabela V</b> – Aquários usados na infecção com Phdp para cada grupo de “Infetados” e “Não infetados” .....	35
<b>Tabela VI</b> – Primers utilizados para amplificação de cada gene, 16S rRNA e Pbp.....	36
<b>Tabela VII</b> - Comparação entre os fragmentos mais promissores .....	41
<b>Tabela VIII</b> - Sequências de nucleótidos nos fragmentos sintetizados .....	42
<b>Tabela IX</b> - Primers da sequência da proteína .....	42
<b>Tabela X</b> – Concentrações de frações purificadas de pVAX-GFP digerido e valores de Abs 260/280 e Abs 260/230 .....	45
<b>Tabela XI</b> – Concentrações de amostras purificadas de pVAX-GFP digerido .....	46
<b>Tabela XII</b> – Concentrações de frações purificadas de pVAX-GFP digerido e valores de Abs 260/280 e Abs 260/230 .....	47
<b>Tabela XIII</b> – Concentrações e relações de Absorvância 260/280 e 260/230 de FrpA, de cada uma das frações purificadas .....	49
<b>Tabela XIV</b> – Valores de massa total obtida de cada plasmídeo .....	55
<b>Tabela XV</b> – Valores de tamanho (Z-avarage), Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta, após síntese de nanopartículas de CS-TPP. Retirado de Fonseca, 2020 .....	56
<b>Tabela XVI</b> – Valores médios de tamanho (Z-avarage), Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta obtidos após síntese de nanopartículas de CS-TPP .....	56
<b>Tabela XVII</b> – Valores de tamanho (Z-avarage), Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta, após encapsulamento. Retirado Fonseca, 2020.....	57
<b>Tabela XVIII</b> - Valores médios de tamanho (Z-avarage), Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta, após encapsulamento obtidos .....	58
<b>Tabela XIX</b> – Mortalidade registada em cada tanque durante o período após-vacinação ....	59
<b>Tabela XX</b> – Valores de RPS após 2 semanas de infecção.....	63

## Tabelas do Anexo

<b>Tabela A I</b> – Concentrações de cada componente necessário para a reação de PCR .....	79
<b>Tabela A II</b> - Valores de Peso, em gramas, e volumes, em $\mu$ L de vacina administrada para cada peixe e cada tratamento .....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
<b>Tabela A III</b> – Valores de Peso, em gramas, e volumes, em $\mu$ L de vacina administrada para cada peixe e cada tratamento (Continuação da Tabela A III) ....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
<b>Tabela A IV</b> – Valores médios de absorvância obtidos dos Ensaio ELISA para cada tratamento, das várias diluições .....	82
<b>Tabela A V</b> - Dados obtidos através do software IEDB (( <a href="http://tools.immuneepitope.org/bcell/">http://tools.immuneepitope.org/bcell/</a> ) relativo à previsão de hidrofília de Parker, flexibilidade de Karplus & Schulz, existência de epitopos através de BepiPred e BepiPred-2.0, acessibilidade superficial de Emini e antigenicidade de Kolaskar e Tongaonkar.....	85
<b>Tabela A VI</b> - Dados obtidos através do software IEDB (( <a href="http://tools.immuneepitope.org/bcell/">http://tools.immuneepitope.org/bcell/</a> ) relativo à previsão de hidrofília de Parker, flexibilidade de Karplus & Schulz, existência de epitopos através de BepiPred e BepiPred-	

2.0, acessibilidade superficial de Emini e antigenicidade de Kolaskar e Tongaonkar (Continuação da Tabela A V) .....	86
<b>Tabela A VII</b> – Dosagens, tipos de vacina, espécies e condições utilizadas noutros estudos referentes a vários tipos de vacinas .....	91

## Lista de equações

<b>Equação 1</b> – Cálculo da percentagem relativa de sobrevivência .....	39
<b>Equação 2</b> – Cálculo da percentagem de mortalidade.....	39

## Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

<b>Abs</b> – Absorvância;	<b>Kan</b> – Canamicina;
<b>Aprox.</b> – Aproximadamente;	<b>LB</b> – Meio Luria Bertani;
<b>ATP</b> – Trifosfato de adenosina (codão de iniciação);	<b>LPS</b> – Lipopolissacáridos;
<b>BLAST</b> – <i>Basic Alignment Search Tool</i> ;	<b>MCS</b> – <i>Multiple cloning site</i> ;
<b>bp</b> – Pares de bases;	<b>MiliQ-H<sub>2</sub>O</b> – Água purificada em sistema miliQ;
<b>C.d.o.</b> – Comprimento de onda;	<b>NCBI</b> – <i>National Center for Biotechnology Information</i> ;
<b>CD4+</b> – Célula T auxiliar;	<b>NEB</b> – <i>New England Biolabs</i> ;
<b>CD8+</b> – Célula T citotóxica;	<b>NK</b> – Células assassinas naturais;
<b>CMV</b> – Promotor humano (Citomegalovírus);	<b>oc</b> – Círculo aberto;
<b>CS-TPP</b> – Quitosano - Tripolifosfato;	<b>PBS</b> – Tampão fosfato-salino;
<b>DI</b> – Imersão direta;	<b>PCR</b> – Reação em cadeia polimerase;
<b>DLS</b> – <i>Dynamic Light Scattering</i> ;	<b>PDI</b> – Índice de polidispersidade;
<b>DNA</b> – Ácido desoxirribonucleico;	<b>pDNA</b> – DNA plasmídico;
<b>DO</b> – Densidade ótica;	<b>Phdd</b> – <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> ;
<b>ECP</b> – Células do exsudado peritoneal;	<b>Phdp</b> – <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ;
<b>ELISA</b> – <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ;	<b>Primers</b> – Oligonucleótidos iniciadores;
<b>FDA</b> – <i>Food and Drug Administration</i> ;	<b>Pool</b> – Junção de várias frações;
<b>FEC</b> – Função extracitoplasmática;	<b>ROS</b> – Espécies reativas de oxigénio;
<b>Frag1 e 6</b> – Fragmento 1 e fragmento 6;	<b>RPS</b> – Percentagem relativa de sobrevivência;
<b>FrpA</b> – Proteína de membrana externa de <i>Photobacterium</i> ;	<b>sc</b> – Superenrolado;
<b>G/C</b> – Razão entre a quantidade de guaninas e quantidade de citosinas presentes numa determinada sequência de DNA;	<b>t(num)</b> – Tempo pós-vacinação. Ex.: t15 – 15 dias pós-vacinação;
<b>gDNA</b> – DNA genómico;	<b>TB</b> – <i>Terrific broth</i> ;
<b>GFP</b> – Proteína verde fluorescente;	<b>Tm</b> – Temperatura de <i>melting</i> ;
<b>HI</b> – Infiltração hiperosmótica;	<b>TSA</b> – <i>Trypticase soy agar</i> ;
<b>HIC</b> – Cromatografia de interação hidrofóbica;	<b>TSB</b> – <i>Tryptic soy broth</i> ;
<b>IEDB</b> – <i>Immune Epitope Database</i> ;	<b>UFC</b> – Unidades formadoras de colónias;
<b>i.m.</b> – Intramuscular;	<b>USDA</b> – <i>United States Department of Agriculture</i> ;
<b>i.p.</b> – Intraperitoneal;	<b>Z-average</b> – Tamanho/diâmetro médio de nanopartículas.

# 1. Introdução

A criação e cultivo de animais e plantas aquáticas denomina-se por aquacultura. Um dos grandes obstáculos em aquacultura é o *stress* imposto aos peixes devido à intensificação da produção aquícola. Este deprime a imunidade dos peixes e aumenta a suscetibilidade a certos agentes patogénicos, para além disso, estes sistemas de produção favorecem a sobrevivência de bactérias e outros microrganismos, potencializando assim o aparecimento de doenças bacterianas, virais e parasitárias (Spinosa *et al.*, 2017; Pridgeon & Klesius, 2012). Consequentemente, existe uma mortalidade em massa dos peixes, levando a grandes perdas económicas neste setor (Harper & Wolf, 2009).

## 1.1. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

A família *Vibrionaceae* faz parte das  $\gamma$ -Proteobactérias e inclui espécies que são habitantes comuns do ambiente marinho. Os membros desta família são caracterizados por uma ampla gama de nichos ecológicos, incluindo espécies patogénicas, simbióticas e de vida livre (Thompson *et al.*, 2004).

Uma das espécies patogénicas desta família é *Photobacterium damsela*, que inclui duas subespécies: *damsela* e *piscicida*. Estas demonstram diferenças fenotípicas extensas que contribuem para a distinção entre si (Thyssen *et al.*, 1998).

A bactéria da subespécie *damsela* (Phdd), descreve-se como organismo autóctone, de ecossistemas aquáticos, responsável pela doença vibriose em vários animais marinhos, incluindo peixes, crustáceos e moluscos. Esta pode ser um patógeno primário para mamíferos, incluindo humanos (Rivas *et al.*, 2011).

A bactéria da subespécie *piscicida* (Phdp) é uma bactéria gram-negativa, em forma de bacilo, com as dimensões entre 0,5  $\mu\text{m}$  e 1,5  $\mu\text{m}$ , sem mobilidade, halófila, anaeróbia facultativa, fermentativa e com oxidase e catalase positiva (Romalde, 2002; Baptista *et al.*, 1996; Janssen & Surgalla, 1968). Infeta apenas espécies de peixes (Magariños *et al.*, 1996a), sendo o agente causador da fotobacteriose, também conhecida como pasteurelose ou pseudotuberculose. Esta é uma doença bacteriana que afeta cultivos à escala mundial, devido à sua vasta gama de hospedeiros economicamente importantes, ampla distribuição geográfica e elevada mortalidade (Barnes *et al.*, 2005; Toranzo *et al.*, 2005; Romalde, 2002).

Esta bactéria foi inicialmente isolada de populações de ambiente natural de perca branca (*Roccus americanus*) em 1963 durante uma epizootica massiva na Baía de Chesapeake, EUA (Snieszko *et al.*, 1964). Foi conhecida inicialmente como *Pasteurella piscicida*, porém,

baseado nos estudos da sequência de rRNA e hibridação DNA-DNA (Gauthier *et al.*, 1995), a bactéria foi renomeada como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Truper & De' Clari, 1998).

Afeta mais de 20 espécies de peixes, entre elas a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), que são espécies cultivadas na Europa, incluindo países como França, Itália, Malta, Espanha, Grécia e Portugal (Toranzo *et al.*, 2005). Comparativamente à dourada, o robalo parece ser muito mais sensível à bactéria Phdp (Athanasopoulou & Bitchava, 2010). Além destas, esta doença afeta também outras espécies emergentes de cultivo de elevado valor comercial, como o linguado (*Solea senegalensis* e *S. solea*) (Morais *et al.*, 2016; Arijó *et al.*, 2005; Zorrilla *et al.*, 1999), a cobia (*Rachycentron canadum*) (Guo *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2003), e a corvina (*Argyrosomus regius*) (Costa *et al.*, 2017).

Um indivíduo afetado com esta doença pode ou não apresentar sinais externos da doença, dependendo da espécie afetada. Esta pode ocorrer de duas formas: aguda e crónica (Toranzo *et al.*, 2005; Magariños *et al.*, 1996a). Na forma aguda os sinais externos são pouco visíveis, sendo possível observar pequenas hemorragias nos opérculos ou na base das barbatanas e escurecimento da pele. A nível interno, podem apresentar esplenomegalia e lesões (Romalde, 2002; Magariños *et al.*, 1996a).

Na forma crónica os órgãos internos apresentam nódulos brancos, que representam as acumulações da bactéria (Liu *et al.*, 2003). O rim, o baço e o fígado apresentam acumulações de macrófagos com várias bactérias intactas (Toranzo *et al.*, 2005; Baptista *et al.*, 1996; Magariños *et al.*, 1996a).

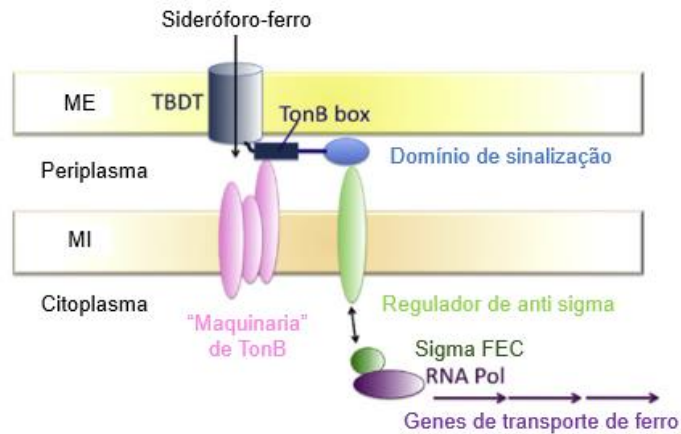
As larvas e os juvenis são mais suscetíveis à doença. Houve estudos que comprovaram que a infeção aguda induz 90-100% de mortalidade em douradas juvenis e que as douradas com mais de 50-100g são mais resistentes (Noya *et al.*, 1995). Esta resistência deve-se à maior eficiência da fagocitose e morte da bactéria por neutrófilos e macrófagos (Bakopoulos *et al.*, 2015; Acosta *et al.*, 2004; Bakopoulos *et al.*, 1995).

A bactéria Phdp permanece viável em água durante 4 a 5 dias, e por isso concluiu-se que a água não é um reservatório primário (Toranzo *et al.*, 1982; Janssen & Surgalla, 1968). No entanto, apesar deste microrganismo não parecer persistir por muito tempo em forma cultivável sem peixes, as células de Phdp podem entrar num estado "viável, mas não cultivável" em resposta a *stresses* ambientais, como fome, exposição a antibióticos ou baixa temperatura, permitindo que a célula entre num estado de dormência e sobreviva até que as condições permitam a ressuscitação e reinício de infeção (Pinto *et al.*, 2015; Oliver, 2010; Magariños *et al.*, 1994a).

Este patógeno pode ser transmitido tanto verticalmente, a partir de fluidos ováricos e seminais de peixes, como horizontalmente, de peixe para peixe (Toranzo *et al.*, 2005; Magariños *et al.*, 1996a; Austin & Austin, 1989).

Vários estudos indicam que a Phdp é um patógeno intracelular facultativo de peixes que promove a sua internalização nos tecidos do hospedeiro e que é capaz de ocupar macrófagos e células epiteliais de diferentes espécies de peixes (Acosta *et al.*, 2009; Elkamel *et al.*, 2003; López-Dóriga *et al.*, 2000; Magariños *et al.*, 1996a; Noya *et al.*, 1995). A aderência é um fator importante na patogenicidade bacteriana, pois promove a libertação de toxinas (Magariños *et al.*, 1996b). Esta é mediada por um recetor de proteína ou glicoproteína da superfície celular bacteriana, e a internalização da bactéria no hospedeiro ocorre por um mecanismo dependente de microfilamento de actina (Magariños *et al.*, 1996a), com o metabolismo celular desempenhando um papel ativo (Acosta *et al.*, 2009). São conhecidos vários mecanismos de virulência de Phdp. O material capsular polissacarídeo desempenha um papel importante na patogénese da bactéria, conferindo resistência à morte sérica e aumentando a mortalidade de peixes (Magariños, 1996). Além disso, a sobrevivência intracelular do patógeno confere proteção contra defesas específicas e inespecíficas do hospedeiro e agentes antimicrobianos exógenos (Swain *et al.*, 2014; Tuševljak *et al.*, 2013; Magariños *et al.*, 1996b).

Um dos fatores chave de virulência presente em Phdp é a capacidade de adquirir ferro do hospedeiro para produção de sideróforos (Osorio *et al.*, 2015; Magariños *et al.*, 1994b). Phdp tem a capacidade de adquirir ferro de fontes de ferro *in vivo*, como de hemoglobinas (Magariños *et al.*, 1994b), fazendo com que haja uma limitação deste composto no hospedeiro que resulta num aumento de estirpes virulentas (Lemos & Osorio, 2007). A Phdp sintetiza um sideróforo específico conhecido como piscibactina (Souto *et al.*, 2012). A proteína de membrana FrpA é a proteína recetora de piscibactina e desempenha um papel fundamental na virulência de Phdp (Valderrama *et al.*, 2019). Sideróforos são compostos de baixo peso molecular (150 a 2000 Da) e com grande afinidade ao ferro (Boukhalfa & Crumbliss, 2002). Como se pode observar na Figura 1, os complexos sideróforo-ferro são transportados para a célula bacteriana por recetores de membrana externa e transportadores específicos, os TBDTs (transportadores dependentes de TonB) (Postle & Larsen, 2007). Os complexos sideróforo-ferro do meio extracelular são reconhecidos pelo seu TBD específico correspondente, que transporta o complexo sideróforo-ferro para o periplasma da bactéria Phdp (Schalk *et al.*, 2012).



**Figura 1** – TDBTs envolvidos na captação de sideróforo-ferro e em cascatas de sinalização que regulam a expressão de genes envolvidos na aquisição de ferro. ME: Membrana externa; MI: Membrana interna. Adaptado de Schalk *et al.* (2012)

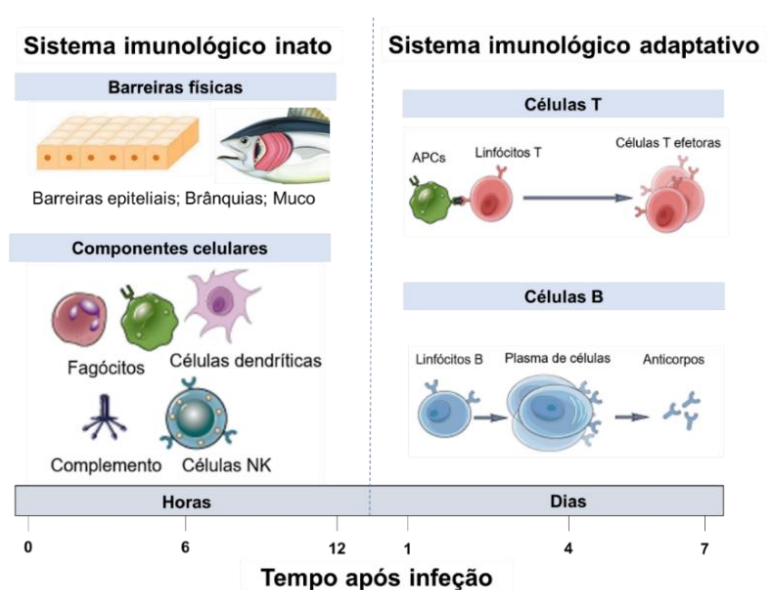
Alguns TDBTs também estão envolvidos em cascatas de sinalização que regulam a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na captação de ferro (Figura 1). Esta cascata de sinalização é iniciada pela ligação do complexo sideróforo-ferro ao TDBT e envolve vários componentes: o domínio de sinalização N-terminal do TDBT, a proteína reguladora sigma da membrana interna e o fator sigma da função extracitoplasmática (FEC). Ambas as funções de transporte e indução requerem transdução de energia da “maquinaria” de TonB na membrana interna (Schalk *et al.*, 2012).

A primeira linha de defesa em aquicultura é a utilização de antibióticos, sendo a primeira forma de tratamento da fotobacteriose; porém, *Phdp* adquiriu resistência aos antibióticos devido ao aparecimento de um plasmídeo que codificava a resistência a vários antibióticos (Del Castillo *et al.*, 2013), como, ampicilina, clorofenicol, tetraciclina e canamicina (*Kan*) (Baptista *et al.*, 1996). Além disso, antibióticos utilizados em aquicultura e os seus produtos de degradação podem causar efeitos nocivos não só à saúde humana e animal, mas também no ambiente natural (Shah *et al.*, 2014; Cabello *et al.*, 2013). A quimioterapia no tratamento da doença, mostrou-se ineficaz, devido à ampla resistência aos antibióticos e ao parasitismo intracelular de *Phdp* nos macrófagos durante a infecção (Romalde, 2002).

Ao contrário do sistema imunitário dos mamíferos, os mecanismos imunológicos em peixes acionados após a vacinação, não são completamente conhecidos, principalmente após a imunização com vacinas de DNA (Pellizzari *et al.*, 2013).

## 1.2. Sistema imunológico dos teleósteos

O sistema imunológico dos peixes teleósteos, como em todos os vertebrados, pode ser dividido em dois subsistemas: o sistema imunológico inato e o sistema imunológico adaptativo (Figura 2). A primeira linha de defesa dos peixes é o sistema imunológico inato, que responde à infecção nas fases iniciais, mas não retém memória das respostas anteriores (Romo *et al.*, 2016). Neste sistema estão incluídas as barreiras físicas, como a pele (escamas e muco), as brânquias e a camada epitelial do trato gastrointestinal, componentes celulares (exemplo: fagocitose), e respostas humorais (exemplo: imunoglobulinas) (Magnadóttir, 2006).



**Figura 2** - Sistema imunológico inato (esquerda) e adaptativo (direita). Tempo de respostas de cada sistema imunológico. Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções (primeiras horas). As respostas imunes adaptativas desenvolvem-se mais tarde. Os tempos de resposta podem variar. APCs: Células apresentadoras de antígeno

Quando uma célula imune inata encontra um agente patogénico específico reconhece o padrão molecular que lhe está associado, ativa-se e dependendo do seu subtipo celular participa em várias respostas, incluindo, a fagocitose e subsequente destruição do patógeno, produção de várias citocinas e ativação do sistema imune adaptativo por meio da apresentação de antígeno junto com a estimulação de citocinas (Smith *et al.*, 2019).

Quando o patógeno persiste, o sistema imunológico adaptativo é recrutado. Este é altamente específico para um determinado antígeno e fornece uma imunidade de longa duração (Brazeau & Friedman, 2015; Flajnik & Kasahara, 2010; Magnadóttir, 2006). As

células T e B são dois componentes principais da imunidade adaptativa, sendo os elementos-chave das respostas imunes mediadas por células e humorais, respetivamente (Mogensen, 2009). A resposta celular é mais importante que a imunidade humoral na proteção dos peixes contra a fotobacteriose (Margarines, 1994d). O principal papel das células B é produzir imunoglobulinas de alta afinidade contra o antígeno estranho. O recetor de células T está sempre ligado à sua membrana e, uma vez estimulado via interação com o antígeno e na presença de coestimulação ativar a célula T para funcionar como uma célula T auxiliar (CD4+) ou uma célula T citotóxica (CD8+) (Smith *et al.*, 2019). Os anticorpos produzidos pelas células B podem neutralizar ainda mais os micróbios invasores ou limpar as células infetadas (ou patógenos opsonizados) por meio de sistemas mediados por células (Mogensen, 2009).

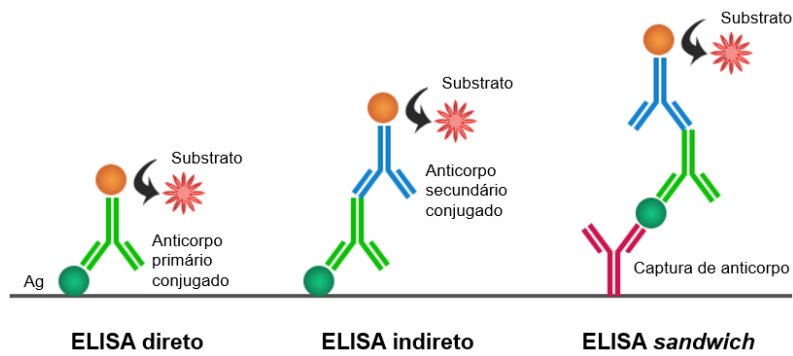
A defesa do hospedeiro contra patógenos como Phdp é iniciada pelo sistema imune inato, particularmente a modulação da expressão de citocinas inflamatórias, que desempenha papéis cruciais na diferenciação, maturação e ativação de células imunes (Zou & Secombes, 2016; Secombes & Ellis, 2012).

Uma das alternativas mais promissoras e mais eficazes de controlar a fotobacteriose é a utilização de vacinas (Valderrama *et al.*, 2019; Håstein *et al.*, 2005), possível devido à memória imunológica. A memória é mantida por um subconjunto de linfócitos B e T chamados células de memória, que podem sobreviver por anos no organismo. As células de memória permanecem prontas para responder rápida e eficientemente a um encontro subsequente com um patógeno, dando origem às chamadas respostas secundárias mais fortes e mais rápidas (Litman *et al.*, 2010).

### 1.2.1.ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Um dos testes imunológicos mais utilizado é a análise de imunoabsorção enzimática, ELISA. Este ensaio deteta e quantifica compostos como anticorpos, antígenos, glicoproteínas e hormonas em amostras biológicas utilizando anticorpos específicos. Esta técnica é normalmente realizada em placas de poliestireno de 96 poços, fazendo com que seja possível analisar várias amostras em simultâneo (Engvall & Perlmann, 1971).

Existem diferentes métodos de ELISA. Estes podem ser os métodos de captura e deteção diretos, indiretos ou *sandwich*, como está representado na Figura 3. O ensaio ELISA *sandwich* é o mais utilizado, devido à sua sensibilidade e especificidade (Hnasko, 2015).



**Figura 3** - Diferentes métodos de ELISA. Elisa direto, indireto e *sandwich*. Ag: Antígeno. Adaptado da plataforma *Researchgate*, [https://www.researchgate.net/figure/ELISA-assays-Direct-ELISA-mostly-used-for-antigen-detection-Indirect-ELISA-mainly-used\\_fig3\\_320265684](https://www.researchgate.net/figure/ELISA-assays-Direct-ELISA-mostly-used-for-antigen-detection-Indirect-ELISA-mainly-used_fig3_320265684)

O método de detecção direta utiliza um anticorpo primário que reage diretamente com o antígeno e está associado a uma enzima ou a um marcador. Esta detecção pode ser realizada com um antígeno imobilizado diretamente na placa de ensaio ou com o formato de ensaio de captura. As vantagens deste método é a rapidez do processo, pois utiliza apenas um anticorpo, são necessárias menos etapas e não existe a possibilidade de reatividade cruzada do anticorpo secundário. Existem algumas desvantagens como: a necessidade de marcação de anticorpos primários para cada ensaio ELISA específico, que é demorada e dispendiosa, existência de um número limitado de anticorpos primários conjugados disponíveis comercialmente e o facto da amplificação do sinal ser mínima (Hnasko, 2015).

O método de detecção indireta baseia-se na utilização de um anticorpo secundário marcado ou um complexo biotina-estreptavidina que após se unir ao anticorpo secundário vai amplificar o sinal. O anticorpo primário é específico para o antígeno, normalmente um anticorpo monoclonal (produzido em ratos) enquanto o anticorpo secundário (anticorpo policlonal) tem especificidade em relação ao tipo de anticorpo primário. Algumas vantagens deste método são: o mesmo anticorpo secundário marcado pode ser utilizado para detecção de distintos anticorpos primários, tornando-se versátil; o anticorpo primário pode ser reconhecido pelos vários epitopos do anticorpo secundário marcado, permitindo uma amplificação do sinal e o aumento da sensibilidade; e diferentes métodos de detecção podem ser utilizados com o mesmo anticorpo primário. Porém, é necessária uma etapa extra de incubação e a reatividade cruzada pode ocorrer com o anticorpo secundário, fazendo com que haja um sinal inespecífico (Hnasko, 2015).

No ELISA *sandwich* são utilizados dois conjuntos de anticorpos para detetar antígeno. A placa de teste é revestida com o anticorpo de captura, que corresponde a um anticorpo criado contra o antígeno de interesse. De seguida coloca-se a amostra biológica, e o

antígeno que existe na amostra vai ligar-se ao anticorpo de captura anteriormente colocado. Posteriormente, adiciona-se o anticorpo de detecção. O anticorpo de detecção está marcado com uma enzima (como por exemplo fosfatase alcalina), e este liga-se ao antígeno alvo que já foi indiretamente ligado à placa.

Todos os distintos ELISA são finalizados, com adição de um substrato da enzima, normalmente cromogêneos, que convertem o substrato num produto corado, sendo este quantificado com um espectrofotômetro para microplacas (Paulie *et al.*, 2006).

### 1.3. Vacinação em aquacultura

A vacinação é uma estratégia fundamental para controlar e prevenir o aparecimento de doenças infecciosas na aquacultura. Existem três meios principais de administrar as vacinas: imersão, via oral e por injeção (Kitiyodom *et al.*, 2019).

O método de imersão é o mais prático e simples, porém possui pouca eficiência devido à dificuldade de captação de antígenos por parte das brânquias e pele (Kitiyodom *et al.* 2019). Existem diferentes protocolos, dos quais o mais utilizado é o da imersão direta (DI), induzindo menos *stress*, conferindo uma melhor proteção, quando comparado com outros protocolos de imersão, como por exemplo o da infiltração hiperosmótica (HI). Na vacinação por DI os peixes são transferidos para um tanque com água que contém a vacina, durante um determinado período de tempo, após o qual regressam ao seu tanque (Plant & LaPatra, 2011).

As vacinas orais são produzidas revestindo a ração com um antígeno ou mistura de antígenos. O fornecimento de vacina na alimentação dos peixes tem duas vantagens principais: não induzir *stress* e maior facilidade em administrar a vacina a um grande número de peixes ao mesmo tempo. Algumas desvantagens deste meio de administração são a dificuldade de determinar a quantidade exata que cada peixe consome, ou seja, a dose de vacina recebida, e a necessidade de a vacina intacta no sistema digestivo dos peixes até alcançar o segundo segmento do intestino onde será absorvida (Quentel & Vigneulle, 1997).

A vacinação por imersão e por via oral são métodos eficazes e práticos para a vacinação de larvas de peixes e de peixes de pequenas dimensões. A vacinação por imersão pode ser usada em larvas de dourada a partir de 90 dias (pós-eclosão; 160 mg), devido que a esta idade as lavas já demonstram uma competência da resposta por parte do sistema

imunológico contra os antígenos testados (Hanif *et al.*, 2005; Fernandez-Alonso *et al.*, 1999).

A vacinação por injeção fornece, uma quantidade determinada de vacina diretamente para o peixe, fazendo com que haja maior probabilidade de eficácia e proteção de longa duração (Mitchell, 1995). No entanto, existem várias limitações neste método, principalmente, o facto dos processos de manuseio e de anestesia induzirem *stress* nos peixes. A vacinação por injeção pode ser administrada por via intraperitoneal (i.p.) e por via intramuscular (i.m.) (Corbeil *et al.*, 2000). Uma das vantagens da vacinação por injeção é a possibilidade de se aumentar a imunogenicidade da vacina pela adição de um adjuvante. As vacinas injetáveis para peixes são frequentemente formuladas com um adjuvante à base de óleo, mas o seu uso tem efeitos secundários, sendo comum observar lesões no local da injeção (Midtlyng *et al.*, 1996), nos órgãos internos e na parede peritoneal (Mutoloki *et al.*, 2004).

Um dos adjuvantes utilizados para a vacinação em peixes é Montanide ISA 763 A VG. Este adjuvante é bastante eficiente e ajuda a alcançar uma resposta imune protetora a longo prazo, melhorando a entrega do antígeno às células alvo (Thim *et al.*, 2014). No estudo de Soltani *et al.* (2016), o uso deste adjuvante aumentou a eficácia da vacina contra *Y. ruckeri*, uma bactéria Gram-negativa. Estes resultados devem-se, segundo os autores, ao facto deste adjuvante conseguir retardar a libertação das partículas de antígeno absorvido originando um prolongamento da exposição ao antígeno.

As vacinas podem ser formuladas com microrganismos vivos atenuados, microrganismos mortos ou toxinas inativadas. As vacinas que utilizam microrganismos vivos têm como vantagem a produção de imunidade humoral e celular, e geralmente requerem apenas um reforço. Porém, apresentam também desvantagens, como o risco de reversão à sua forma virulenta e a instabilidade intrínseca, tornando-as difíceis de administrar. As vacinas que utilizam microrganismos mortos ou inativados e as vacinas de toxóide geram uma resposta imunológica mais fraca e normalmente requerem doses múltiplas, mas são mais seguras (Peek *et al.*, 2008).

### 1.3.1. Vacinas contra fotobacteriose

Já foram relatados e testados alguns tipos de vacinas contra Phdp (Tabela I) e algumas estão disponíveis comercialmente.

**Tabela I – Vacinas desenvolvidas contra *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***

	Tipos de vacina	Tipo de produto	Método de administração (Dose)	Juvenis de espécie(s)	Observações	Referências
<b>Lipoproteína (PDP 0080)</b>	Vacina de subunidade recombinante	Experimental	Injeção i.p. (25 µg/ peixe)	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Produção de anticorpos séricos específicos; Maior mortalidade cumulativa no controlo comparado aos peixes vacinados; Não se registou doença nos peixes sobreviventes.	Andreoni <i>et al.</i> , 2013
<b>Antígenos rHSP60, rENOLASE e rGAPDH</b>	Vacina de subunidade recombinante	Experimental	Injeção i.p. (100 µg/ peixe)	<i>Rachycentron canadum</i> L.	Resposta imune rápida e persistência após 42 dias; RPS 65%, 62% e 56%; Maior produção de anticorpos específicos e maior imunidade protetora (comparado com outros antígenos).	Ho <i>et al.</i> , 2011
<b>Bactéria morta com formalina</b>	Inativa	Licenciada	Imersão	<i>Dicentrarchus labrax</i> e <i>Seriola quinqueradiata</i>	Provoca uma forte resposta de anticorpos nas brânquias e mucosas que podem bloquear a entrada de patógenos e colonização.	Barnes <i>et al.</i> , 2005
<b>Bactéria morta com formalina com <i>E. coli</i> LPS</b>	Inativa	Experimental	Imersão	<i>Sparus aurata</i>	Mortalidade cumulativa inferior e proteção superior em larvas provenientes de progenitores imunizados comparativamente a larvas provenientes de pais não imunizados; Produção de anticorpos específicos.	Hanif <i>et al.</i> , 2005
<b>Mutante de <i>aroA</i> vivo atenuado</b>	Atenuada viva	Experimental	Injeção i.p. e imersão	Robalo híbrido	Não houve mortalidade quando utilizada a dose de 10 <sup>8</sup> ou 10 <sup>7</sup> UFC/mL por via de imersão; RPS de 85%.	Thune <i>et al.</i> , 2003
<b>LPS misturado com bactéria morta por clorofórmio</b>	Inativa	Experimental	Injeção i.p. (0,1 mL/peixe)	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Taxa de mortalidade inferior nos peixes vacinados comparado aos peixes controlo; Após 63 dias da vacinação RPS foi de 47,4%.	Kawakami <i>et al.</i> , 1997
<b>Bactéria inativada com formalina enriquecida com ECP</b>	Inativa	Comercial	Imersão (6 x 10 <sup>3</sup> UFC/peixe)	<i>Sparus aurata</i> , <i>Seriola quinqueradiata</i> e <i>Roccus americanu</i>	Nível de proteção significativo alcançado; Valores de RPS de 85 a 90%;	Magariños <i>et al.</i> , 1994c
<b>Bactéria viva atenuada</b>	Viva atenuada	Experimental	Imersão	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Taxa de mortalidade inferior nos peixes vacinados comparado aos peixes controlo;	Kusuda & Hamaguchi, 1988
<b>Bactéria morta por calor e formalina</b>	Inativa	Experimental	Imersão e via oral	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Taxa de mortalidade inferior nos peixes vacinados comparado aos peixes controlo;	Fukuda & Kusuda, 1981

Uma das vacinas disponíveis comercialmente é uma preparação de bactérias enriquecida com produtos extracelulares (ECP). Esta foi utilizada com sucesso, em Espanha, Turquia e Grécia, e insucesso, em Itália (Håstein *et al.*, 2005; Magariños *et al.*, 1994c).

Muitas das vacinas testadas não demonstram uma proteção satisfatória. Isto deve-se à existência de vários obstáculos, tais como: a dificuldade de tornar os antigénios imunogénicos; dificuldade de induzir a resposta imunitária certa para obter proteção, particularmente quando a imunidade mediada por células é necessária; a dificuldade de estimar a eficácia das vacinas piloto quando faltam correlações empíricas que requerem ensaios clínicos desafiadores que são caros e fornecem informações limitadas (Secombes, 2008).

No Japão, nove empresas farmacêuticas comercializam vacinas para peixes, com 29 formulações de vacinas foram aprovadas até 2018. Algumas delas foram desenvolvidas para combater Phdp, tais como: uma vacina bivalente e outra trivalente para o género *Seriola*, *S. lalandi* (20-110 g) e *S. dumerili* (20-210 g), administradas por injeção (0,1 mL/peixe), tendo como adjuvante Montanide ISA 763 A VG, duas vacinas tetravalentes ambas administradas por injeção e com doses de 0,1 mL/peixe, uma para *S. quinqueradiata* (20-1000 g), também com adjuvante Montanide ISA 763 A VG, e outra para *S. lalandi* (30-300 g), porém com adjuvante fucoidan. Todas estas vacinas são produzidas com patógeno inativado e nenhum outro tipo de vacina (vivas atenuadas, de subunidades recombinantes ou vacinas de DNA) foram licenciadas para aquacultura no Japão (Matsuura *et al.*, 2019).

A Phdp morta com formalina também foi ligeiramente eficaz por imersão (Magariños *et al.*, 1994d). Bactérias mortas com clorofórmio misturadas com lipopolissacáridos (LPS-CKC) conferiram uma melhor proteção na *S. quinqueradiata* contra Phdp, quando administrada por injeção (Kawakami *et al.*, 1997).

O progresso nas tecnologias de biologia molecular permitiu o desenvolvimento de novas formulações de vacinas, tais como subunidades purificadas (proteínas ou glicoproteínas) de Phdp, que são clonadas e purificadas a partir de culturas de estirpes recombinantes de *Escherichia coli* (*E. coli*), em combinação com adjuvantes ou sistemas de nano e microvetor (Andreoni *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2014; Andreoni *et al.*, 2013).

As proteínas da membrana externa das bactérias que são relacionadas à aquisição de ferro foram propostas como antigénios eficientes para formular vacinas de subunidades contra vários agentes patogénicos bacterianos (Bonin *et al.*, 2014; Brumbaugh *et al.*, 2013).

### 1.3.2. Vacinas de DNA

Uma estratégia de vacinação para prevenir doenças infecciosas é a imunização com DNA. Esta consiste na administração direta de um fragmento de DNA circular (plasmídeo) que codifica uma proteína específica imunogénica. O objetivo é que a expressão dessa proteína seja realizada pelas células hospedeiras e que sejam reconhecidas pelo sistema imunológico do hospedeiro (Ray, 1997; Doe *et al.*, 1996).

As vacinas de DNA são mais estáveis, económicas, fáceis de fabricar e seguras no manuseio, quando comparadas com as vacinas convencionais baseadas em proteínas (péptidos) destinadas a induzir respostas imunes adaptativas específicas ao antigénio (Prazeres & Monteiro, 2014). Algumas vacinas de DNA foram aprovadas por organizações como FDA (*Food and Drug Administration*) e USDA (*United States Department of Agriculture*) para uso veterinário (Atherton *et al.*, 2016; Dauphin & Zientara, 2007). A segurança geral das vacinas de DNA foi amplamente comprovada em vários ensaios clínicos, sublinhados pelo facto de que não se detetar nenhuma resposta imunitária (anticorpos) contra as componentes procarióticas da vacina de DNA e que os efeitos adversos são limitados a uma reatividade moderada no local da injeção (Fioretti *et al.*, 2013).

Kumar *et al.* (2007), desenvolveu uma vacina de DNA contra a bactéria *Vibrio anguillarum*, uma bactéria da família de Phdp, para perca-gigante (*Lates calcarifer*). Esta vacina é recomendada para ser administrada por injeção intramuscular em peixes com 10 g, com uma dose de 20 µg de DNA específico (2 µg/g de peixe). A taxa de mortalidade em peixes vacinados foi menor comparada com os peixes de controlo (vacinados com tampão fosfato-salino (PBS) e o plasmídeo sozinho), conferindo uma proteção com um valor de percentagem relativa de sobrevivência (RPS) de 55,6%. Os peixes vacinados também apresentaram menores lesões, no rim, fígado e baço, e uma percentagem menor de alterações histológicas, comparado com os peixes controlo.

## 1.4. Utilização de nanopartículas em vacinas

As nanopartículas podem ser utilizadas para potencializar a resposta imune das vacinas genéticas baseadas em vetores (DeLong & Curtis, 2017).

Nanopartículas (NPs) são estruturas ordenadas com dimensões compreendidas entre 1 e 1000 nm e que têm grande potencial para suplementar vacinas (Kelly *et al.*, 2019). As nanopartículas podem ser categorizadas como de base orgânica (por exemplo, nanopartículas de lípidos estruturados, nanopartículas poliméricas biodegradáveis e vetores virais), de base inorgânica ou uma combinação híbrida dos dois (Kitiyodom *et al.*, 2019).

As nanopartículas de base orgânica são biocompatíveis, biodegradáveis e relativamente fáceis de produzir (Zolnik *et al.*, 2010; Chiu *et al.*, 2009), melhorando a biodisponibilidade do antígeno *in vivo* e influenciando a resposta imune inata e adaptativa, incluindo a geração de células de memória, que são essenciais para o sucesso de uma vacina (Bolhassani *et al.*, 2014; Arama *et al.*, 2011).

O encapsulamento da vacina de DNA é uma estratégia adequada para entregar antígenos na superfície das mucosas com o objetivo de induzir imunidade, conseguindo a translocação para células que apresentem os antígenos no compartimento subepitelial (células dendríticas e macrófagos) para iniciação de respostas de células T citotóxicas, recrutamento de células T auxiliares e ativação de células assassinas naturais (NK) (Mutoloki *et al.*, 2015; Fuglem *et al.*, 2010). O antígeno administrado por via oral também pode ativar as células B e a produção de anticorpos via células CD4+, resultando em resposta imune humoral adaptativa (Embregts & Forlenza, 2016), gerando uma resposta imune mais forte (Zhao *et al.*, 2014; Nandedkar, 2009). A eficiência de uma vacina é verificada pela presença de anticorpos específicos para o patógeno-alvo. Além de proporcionarem a entrega da vacina de DNA, as NPs protegem o DNA da degradação enzimática, principalmente por parte de DNases e da degradação causada pelo baixo pH (Rivas-Aravena *et al.*, 2013; Mahapatro & Singh, 2011).

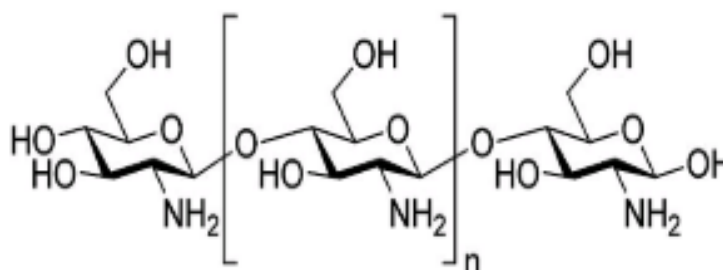
Para caracterizar nanopartículas há propriedades importantes a serem consideradas, como o tamanho/diâmetro médio (*Z-average*), o potencial zeta e o índice de polidispersidade (PDI). O tamanho médio e o PDI podem ser obtidos através da técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS) e o potencial zeta por mobilidade electroforética de partículas. O tamanho da partícula (*Z-average*) é definido como o diâmetro de uma esfera dura hipotética que se difunde da mesma forma que as nanopartículas que estão a ser medidas (Cho *et al.*,

2013). Este valor só é significativo se a amostra possuir apenas partículas esféricas e monodispersas, fazendo com que este parâmetro seja muito sensível a pequenas mudanças na amostra (Kumar, 2007). O índice de polidispersidade (Pdl) é um parâmetro adimensional utilizado para estimar a uniformidade média de uma solução coloidal de partículas. Quanto maior o valor de Pdl maior é a distribuição de tamanho entre partículas na amostra. Um valor alto de Pdl também pode significar agregação de nanopartículas (Clayton *et al.*, 2016). Finalmente, o potencial zeta é um parâmetro indicador da carga superficial da nanopartícula. Nesta medição é aplicado um campo elétrico em toda a amostra e é medida a mobilidade eletroforética das nanopartículas pela velocimetria Doppler. Estas medições dependem da força e valência dos íons que estão presentes em suspensão na amostra. Quanto maior for a força iônica e quantidade de íons de alta valência menor é o potencial zeta (Cho *et al.*, 2013).

Algumas macromoléculas naturais são utilizadas para a preparação de nanopartículas, tais como gelatina, alginato, quitosano e agarose. Estes são polímeros hidrofílicos (Calvo *et al.*, 1997).

#### 1.4.1. Nanopartículas de quitosano

O quitosano (Figura 4) é um polímero de hidratos de carbono modificado e preparado pela N-desacetilação parcial da quitina, um biopolímero natural derivado de crustáceos, insetos e alguns microrganismos. A desacetilação altera a conformação da cadeia e as propriedades eletrostáticas da quitina, fazendo com que haja um aumento da sua solubilidade e deixando grupos amina reativos ao longo da cadeia polimérica, pelo que se podem obter derivados com características específicas pela adição de diferentes moléculas nessas zonas. Este composto possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, hemostáticas e antivirais, e capacidade de inibir tumores, regenerar tecidos, curar lesões e ser um imunostimulante (Ghendon *et al.*, 2008; Davis, 2006; Oujii *et al.*, 2002).



**Figura 4** - Estrutura química de quitosano. Retirado de Mahapatro & Singh, 2011

As nanopartículas de quitosano têm sido utilizadas na preparação de vacinas de DNA (Zhao *et al.*, 2014). As vantagens da sua utilização em nanopartículas decorrem deste ser um biopolímero não tóxico, biocompatível e biodegradável, tendo também a vantagem na muco-adesividade que ajuda na aderência das partículas à membrana mucosa facilitando a entrega da vacina (Rao & Sharma, 1997; Takeuchi *et al.*, 1996), de poder facilmente modificar-se em formas e tamanhos desejados (Arca *et al.*, 2009), e ser facilmente excretado nos rins (Kannerstein *et al.*, 1977).

As vacinas de DNA, para peixes, encapsuladas em quitosano são viáveis e estáveis, devido à fácil complexação de DNA com quitosano devido à sua carga positiva. As micropartículas protegem o DNA encapsulado da degradação pela DNase (Kumar *et al.*, 2008) e das forças de atrito (Tian *et al.*, 2008). O encapsulamento de DNA (que codifica proteínas imunológicas de agentes patogénicos) em nanopartículas de quitosano fornece um alto nível de proteção em peixes contra os respetivos patógenos (Rivas-Aravena *et al.*, 2013). Estas nanopartículas podem, também, abrir reversivelmente as junções herméticas das células epiteliais, melhorando o transporte de antigénios paracelulares através das superfícies epiteliais da mucosa (Dodane *et al.*, 1999; Artursson *et al.*, 1994).

Um dos sistemas de entrega à base de quitosano para aplicação oral são as nanopartículas de quitosano-tripolifosfato (CS-TPP) pois possuem fácil preparação e são seguras tanto para encapsular péptidos e proteínas (Xu & Du 2003), como plasmídeos de DNA (Csaba *et al.*, 2009). A segurança e eficácia das nanopartículas de CS-TPP também foram demonstradas para a entrega oral de vacinas de DNA contra patógenos bacterianos e virais de peixes (Vimal *et al.*, 2014; Vimal *et al.*, 2012).

## 1.5. Plasmídeo de DNA

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossómicos, com forma circular ou linear, encontrados em muitos microrganismos nos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eucaryota* (Shintani *et al.*, 2015). São considerados a principal força motriz da evolução dos procariotas devido à sua capacidade de colonizarem e se replicarem em células procariotas, podendo migrar entre populações, tornando-os em agentes potentes de transferência lateral de DNA (Wein & Dagan, 2020).

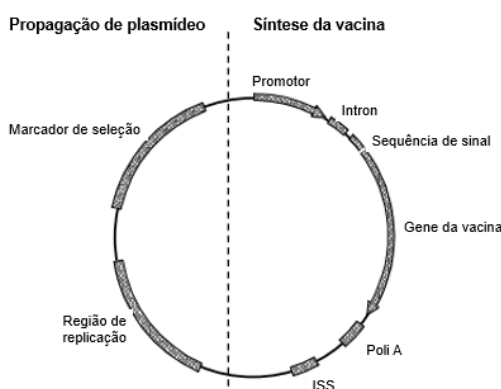
Os plasmídeos são bastante importantes, não só na evolução microbiana como também na sua utilização como vetores para a engenharia genética e aplicações em biotecnologia,

biologia sintética e medicamentos (Wein & Dagan, 2020). Juntamente com as enzimas de restrição, os plasmídeos foram uma das principais ferramentas moleculares no desenvolvimento da clonagem de DNA e de DNA recombinante (Russo, 2003; Cohen *et al.*, 1973).

A utilização de plasmídeos de DNA para imunização proporcionou imunidade protetora em alguns modelos animais, sendo considerada uma estratégia útil para vacinas (Sedegah *et al.*, 1994; Ulmer *et al.*, 1993). Antígenos produzidos em células hospedeiras após imunização intramuscular ou intradérmica com DNA iniciam respostas imunes humorais e celulares (Ulmer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993).

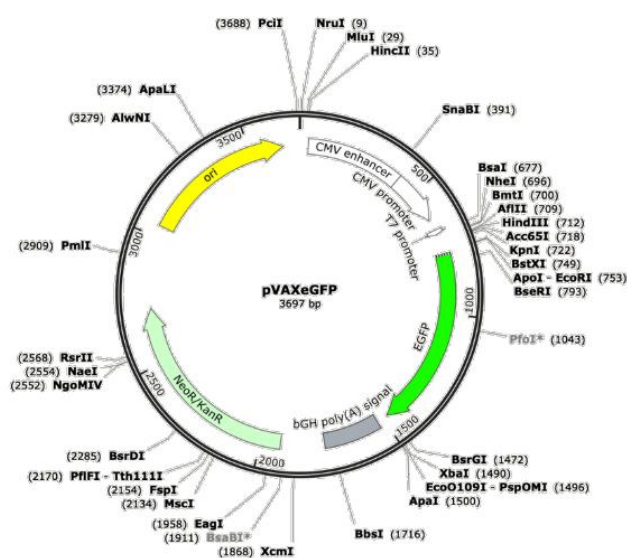
As vacinas de DNA podem ser desenhadas tendo como base os plasmídeos que transferem genes que codificam, por exemplo, proteínas que são capazes de ativar o sistema imunológico (Ferraro *et al.*, 2011). Estas vacinas podem ser profiláticas, que são administradas para prevenir a doença-alvo, ou terapêuticas, para induzir o sistema imunológico a combater a doença (Prazeres & Monteiro, 2014).

O vetor de um plasmídeo típico é uma molécula de DNA covalentemente fechada derivada de plasmídeos naturais (Prazeres, 2011). As vacinas de DNA plasmídico (pDNA) combinam uma unidade para propagação no hospedeiro microbiano e uma outra que conduz a síntese da vacina nas células eucariotas, como se pode observar na Figura 5. Para a produção de DNA de plasmídeo estão presentes: uma região de replicação e um marcador de seleção. A unidade de expressão eucariótica inclui uma região promotora, *intron*, sequência de sinal, gene de vacina e um terminador transcricional (poli A) (Glenting & Wessels 2005).



**Figura 5** – Elementos genéticos de uma vacina de DNA plasmídico. Retirado de Glenting & Wessels, 2005

O vetor do plasmídeo comercial pVAX1LacZ foi utilizado como modelo de partida para a construção de um outro vetor plasmídico, o pVAX-GFP através da substituição do gene *lacZ* pelo gene da proteína verde fluorescente (GFP), obtido através do plasmídeo pFM20. Este vetor contém um promotor do citomegavírus humano (CMV), que permite a expressão da proteína recombinante desejada em células eucarióticas, um gene de resistência à canamicina (*Kan*) para seleção em *E. coli*, impedindo o crescimento de bactérias livres de plasmídeo durante a fermentação, uma origem de pMB1, um local de clonagem múltipla e um promotor T (local de preparação) (Azzoni *et al.*, 2007), como representado na Figura 6.



**Figura 6** – Mapa de pVAX-GFP e as respectivas enzimas de corte. Obtido pelo software Snapgene

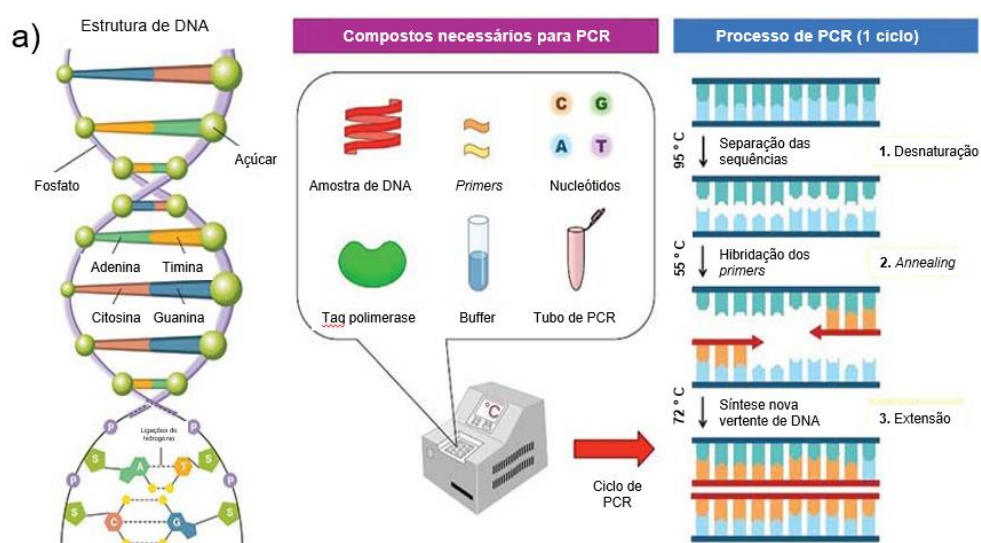
A proteína GFP foi inicialmente isolada de uma água-viva (*Aequorea victoria*) (Shimomura *et al.*, 1962) e pode ser expressa em peixes para determinar indiretamente a expressão da proteína-alvo pela detecção da fluorescência. Este método é utilizado para verificar se a proteína pretendida está a ser expressa corretamente (Philips, 2001).

## 1.6. Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica utilizada para amplificar um fragmento de DNA específico, a sequência-alvo. Existem outras técnicas de amplificação de DNA, mas esta é a mais utilizada (Kampke *et al.*, 2001).

A PCR começa com uma etapa de desnaturação utilizando uma temperatura mais alta (95°C), fazendo com que o DNA de cadeia dupla passe a DNA de cadeia simples. De

seguida, passa por uma etapa de *annealing* a temperaturas mais baixas (50-60°C), para que os *primers* se liguem ao DNA (hibridizem). Conclui-se a PCR com uma etapa a temperatura intermédia (72°C), para que haja uma extensão dos *primers*, em que uma nova sequência de DNA é sintetizada à custa de reagentes (nucleótidos) e da enzima Taq polimerase que catalisa a reação (Kampke *et al.*, 2001; Lodish *et al.*, 2000b) (Figura 7). Estas etapas são repetidas, normalmente, em 25 a 45 ciclos. Em cada ciclo o número de cópias da sequência desejada é duplicado (Kampke *et al.*, 2001).



**Figura 7** – Componentes necessários para a reação de PCR e etapas efetuadas durante esta técnica. Adaptado de <https://thebiologynotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>

A seleção dos oligonucleótidos iniciadores (*primers*) é um processo crítico para o sucesso geral de qualquer PCR. Sem um conjunto de *primers* funcionais não há formação do produto de PCR (Dieffenbach *et al.*, 1993).

### 1.6.1. Primers

Os *primers* funcionam em pares, o *primer forward* (do sentido 5' para 3') e o *primer reverse* (do sentido 3' para 5') (Kampke *et al.*, 2001). O seu *design* tem como objetivo obter o equilíbrio entre a especificidade e eficiência de amplificação. Os *primers* com pouca especificidade tendem a produzir produtos de PCR com nucleótidos extra, não relacionados e indesejáveis. Um par de *primers* eficientes permite amplificar uma sequência genética, teoricamente, de forma ótima, isto é, uma duplicação exata dessa mesma sequência para cada ciclo de PCR (Dieffenbach *et al.*, 1993).

Existem vários critérios para a escolha e a construção de *primers* tais como: o seu comprimento, a temperatura de *melting* e a percentagem do conteúdo de citosinas/guaninas presentes (C/G%). O comprimento dos oligonucleótidos deve estar compreendido entre as 18 e 24 bases. Quanto maior for o comprimento do *primer* menor será a sua especificidade. *Primers* pequenos, com 15 bases ou menos são úteis para certas técnicas, como por exemplo o mapeamento de genomas simples. A percentagem de guaninas e citosinas deve estar compreendida entre 40% e 60%, sendo 50% o ideal, pois esta influência a temperatura de *melting* ( $T_m$ ), que se deve situar entre 54°C e 62°C. Pode ser estimada a partir da equação:  $T_m = 4(G/C\%) + 2(A/T\%)$ . A diferença entre os valores de  $T_m$  entre os pares de *primers* deve ser inferior a 5°C pois com uma diferença de temperaturas superiores a probabilidade de serem menos específicos e menos eficientes aumenta (Dieffenbach *et al.*, 1993).

## 2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de vacinas de DNA contra a bactéria Gram-negativa *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, para administração por injeção intraperitoneal, em peixes de aquacultura. Para tal, pretende-se clonar os genes da proteína de membrana recetora de piscibactina, FrpA, e de fragmentos com elevado potencial imunológicos desta proteína no vetor pVAX-GFP para induzir a expressão da proteína e/ou dos péptidos imunogénicos.

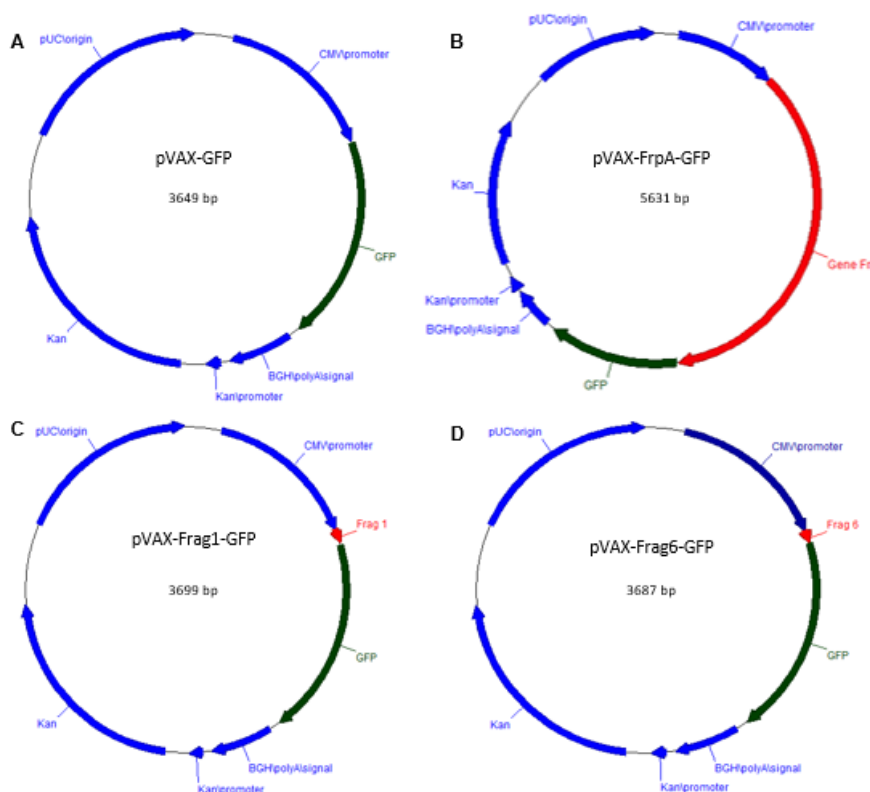
De forma a verificar a eficácia das vacinas de DNA desenvolvida, robalos juvenis serão vacinados e após o período de imunização infetados com Phdp. A percentagem relativa de sobrevivência e produção de uma resposta imunitária específica (anticorpos) serão analisados para determinar o sucesso das vacinas desenvolvidas.

### 3. Metodologia

Todos os procedimentos relativos a 3.1. Desenho e construção molecular de plasmídeos codificantes de antígeno e 3.2. Desenvolvimento das vacinas de DNA foram elaborados no iBB-IST, Lisboa, Portugal. Todos os procedimentos relativos a 3.3. Avaliação da eficácia das vacinas de DNA foram elaborados no edifício MARE IPLeiria, Peniche, Portugal.

#### 3.1. Desenho e construção molecular de plasmídeos codificantes de antígeno

Da sequência da proteína FrpA, com a utilização de análises bioinformáticas pode determinar-se quais os péptidos com potencial imunogénico (fragmento 1 (Frag1) e fragmento 6 (Frag6)). Para a construção de plasmídeos codificantes de antígeno utilizou-se um plasmídeo previamente construído, pVAX-GFP, no qual se clonou um gene da proteína alvo, FrpA de Phdp, ou seu fragmento determinado como codificante de péptido imunogénico. Na Figura 8 é possível observar as construções finais desejadas.



**Figura 8** - Plasmídeos codificantes de antígeno, a partir de um plasmídeo construído anteriormente, pVAX-GFP (A), utilizando a sequência da proteína FrpA (B), o fragmento 1 (C) e o fragmento 6 (D). Estes dois fragmentos foram selecionados da sequência original de FrpA, tal como descritos no procedimento 3.1.1. Análises Bioinformáticas

### 3.1.1. Análises Bioinformáticas

Começou por utilizar-se a ferramenta *Basic Alignment Search Tool* (BLAST) no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para pesquisar sequências da proteína FrpA e realizar alinhamentos de forma a selecionar a sequência proteica a utilizar. A sequência primária da proteína-alvo selecionada, a proteína de membrana recetora da piscibactina, FrpA, foi obtida no banco de dados do NCBI (WP\_082212545.1).

A análise bioinformática foi realizada com o objetivo de escolher um ou mais fragmentos (péptidos) hidrófilos e expostos, isto é, com maior potencial imunogénico, e com um menor potencial de agregação, devido ao tamanho da proteína FrpA ser relativamente elevado (660 aminoácidos). Esta análise foi efetuada utilizando a sequência inserida em formato FASTA no *Immune Epitope Database* (IEDB) (<http://tools.immune-epitope.org/bcell/>), sendo possível observar a existência epitopos (pequenas porções de antigénio com potencial de gerar a resposta imune), acessibilidade, flexibilidade, antigenicidade e previsão de hidrofília.

Para a previsão do epitopo foram utilizados dois métodos: previsão de epitopos *BepiPred* e previsão de epitopos *BepiPred 2.0*. Em relação à pesquisa de antigénios de interesse, os métodos escolhidos foram: a previsão de acessibilidade de superfície de epitopos de Emini, a previsão de flexibilidade de Karplus & Schulz, a antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar e, por último, a previsão de hidrofília de Parker.

Utilizou-se o *software* Pred-TMBB (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/input.jsp>) com o objetivo de examinar a representação da proteína 2D e avaliar as regiões da proteína que estão previstas interagir com o exterior da célula que apresenta antigénio. Por último, utilizou-se o servidor NetSurfP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>) que prevê a acessibilidade à superfície e estrutura secundária.

### 3.1.2. Desenho de *primers*

Após a seleção dos fragmentos mais imunogénicos efetuou-se o desenho de *primers* necessários para amplificar o gene da proteína FrpA e desenho das sequências dos fragmentos selecionados.

Os *primers* têm de cumprir certos critérios, como, cada *primer* deve ter 18 a 24 bases complementares, a percentagem de bases G/C deve ser de 40 a 60%, a temperatura de

*melting* tem de estar compreendida entre 50°C a 60°C e não pode existir mais de 5°C de diferença entre os *primers forward* e *reverse*, como explicado na Secção 1.6.1. *Primers*.

Alguns *primers* não cumpriram o critério das 18 a 24 bases complementares para que os outros critérios pudessem ser obedecidos. Houve necessidade de adicionar (i) um codão de iniciação (ATG) a alguns *primers* para que houvesse a iniciação da tradução e (ii) duas bases, no início da sequência, para que houvesse uma junção da proteína FrpA com GFP.

Utilizou-se o software *Tm Calculator* de *New England Biolabs* (NEB) (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) para estimar a temperatura ideal de *annealing* de cada conjunto de *primers*, a temperatura de *melting* da parte complementar, e as percentagens das bases G/C de cada *primer*.

Para construção do plasmídeo teórico e para confirmar cada *primer*, utilizou-se o software ApE. Para a confirmação do plasmídeo utilizou-se o programa ExPASy – *Translate tool* (<https://web.expasy.org/translate/>) onde se verificou se o plasmídeo seria traduzido tal como idealizávamos, resultando na proteína escolhida ou fragmentos da proteína escolhidos, juntamente com a tradução correta da proteína GFP.

### 3.1.3. Crescimento bacteriano de Phdp

A bactéria Phdp foi providenciada pelo centro de investigação MARE IPLeiria, Peniche, Portugal. Esta foi isolada de um surto em corvina (*Micropogonias undulatus*).

Em dois tubos de 15 mL, contendo cada um 5 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) suplementado com 2% de NaCl, inoculou-se a bactéria Phdp e deixou-se propagar *overnight* a 27°C. Posteriormente incubou-se a bactéria com uma densidade ótica (DO) de 0,1 em *Erlenmeyers* de 100 mL, contendo 20 mL do mesmo meio e mantendo as mesmas condições. Estabeleceu-se uma curva de crescimento da bactéria através da análise da DO da cultura por espectrofotometria a 600 nm. O processo foi repetido para recolher as células em  $\frac{3}{4}$  de fase exponencial. Conservaram-se células a -80°C, em criotubos de 1,5 mL com 100  $\mu$ L, com suplementação de 15% de glicerol.

Procedeu-se também à repicagem da bactéria para placas sólidas com o objetivo de preservar a sua viabilidade por 1-2 semanas. Estas placas foram feitas com meio *Trypticase*

soy agar (TSA) com 2% de NaCl. Após dois dias de crescimento a 27°C foram armazenadas a 4°C.

### 3.1.4. Purificação de DNA genómico de Phdp

A purificação do DNA genómico (gDNA) da bactéria Phdp foi desempenhada com a utilização do *Wizard genomic purification kit* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), seguindo o protocolo, mas com uma pequena alteração. Estas frações purificadas de gDNA de Phdp foram armazenadas a 4°C, até utilização para amplificação do gene da FrpA (Secção 3.1.6.).

Após purificação quantificou-se a concentração de ácidos nucleicos, em ng/μL, de cada fração utilizando amostras de 1 μL no aparelho *NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer* (NanoDrop) (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, EUA). Esta purificação e concentração medida foi verificada também em eletroforese (condições descritas no Secção 3.1.4.1. Eletroforese).

#### 3.1.4.1. Eletroforese

Todas as eletroforeses utilizadas, relativas aos procedimentos 3.1. Desenho e construção molecular de plasmídeos codificantes de antígeno e 3.2. Desenvolvimento das vacinas de DNA, foram elaboradas com gel de agarose 1%, a 100 volts (V) ou 120 V durante 1 hora ou 1 hora e meia, dependendo da tina de eletroforese utilizada. O padrão de marcador molecular utilizado foi *NZYDNA Ladder III*, (NZYtech, Lisboa, Portugal), e as tinas de eletroforese (VWR, Radnor, Pensilvânia, EUA). Todos os géis foram corados com brometo de etídio, e observados com recurso a um sistema de visualização de géis com transiluminador ultravioleta *Eagle Eye* (Stratagene, San Diego, Califórnia, EUA).

### 3.1.5. Cultivo de *E. coli* e purificação do plasmídeo pVAX-GFP

Para o cultivo de *E. coli* DH5α já transformada com o plasmídeo pVAX-GFP recorreu-se a um inóculo criopreservado, do banco microbiano do BERG (*Bioengineering Research Group*) -iBB, em 5 mL de meio Luria Bertani (LB), num tubo de 15 mL, e cultivado a 37° C *overnight*.

A purificação de pVAX-GFP foi efetuada utilizando o *High pure plasmid isolation kit* (Roche, Basileia, Suíça). Após purificação verificou-se a concentração de cada preparação utilizando o *NanoDrop*. Esta purificação foi também verificada através da eletroforese. Estes

produtos purificados de pVAX-GFP foram armazenadas a 4°C, por alguns dias, até utilização posterior na Secção 3.1.7.

### 3.1.6. Amplificação do gene da FrpA

Para a amplificação do gene da proteína alvo utilizou-se uma amostra de gDNA purificado (Secção 3.1.4). Esta foi executada utilizando os *primers* desenhados anteriormente para esta proteína e o *kit KOD Hot Start Master Mix* (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Missouri, EUA) com recurso ao protocolo correspondente. Utilizou-se a concentração recomendada do gDNA de 100 ng. Na Tabela A I do Anexo estão presentes os volumes que foram utilizados.

Fez-se um gradiente de temperaturas entre 48 a 62°C a etapa de *annealing*, de forma a identificar qual a melhor temperatura para os *primers*. Amostras dos amplificadas consequentes foram verificadas através de eletroforese.

À etapa de desnaturação, feita a 95°C durante 10 segundos, seguiu-se a etapa de *annealing* com um gradiente de temperaturas, durante 10 segundos e, para finalizar, a etapa de extensão foi feita a 70°C durante 40 segundos. A duração da última etapa depende do tamanho total da proteína; como esta amostra tem aproximadamente 2000 nucleótidos utilizaram-se os 40 segundos recomendados pelo protocolo de *Marter mix*. Também se utilizou o número de ciclos recomendado, 40 ciclos.

Após determinar a temperatura de ótima de *annealing*, através da visualização do gel de agarose dos produtos da PCR obtidos, procedeu-se a mais uma PCR com a temperatura de *annealing* selecionada para amplificar a sequência da proteína alvo.

Todos os processos de PCR deste trabalho foram realizados no aparelho *Thermocycler T-Gradient ThermoBlock* (*Biometria*, Göttingen, Alemanha).

Observou-se mais do que uma banda nos géis de eletroforese e, por isso, foi necessário recortar a banda que corresponde à amostra desejada de forma a obter o gene alvo amplificado. Após o recorte a DNA da banda foi purificado com *NZYGelpure kit* (*NZYtech*, Lisboa, Portugal), seguindo o respetivo protocolo. Esta fração purificada foi armazenada a 4°C e confirmada utilizando, novamente, eletroforese.

Estas frações purificadas foram digeridas, com as condições referidas na Secção 3.1.7. Digestão do plasmídeo pVAX-GFP, com as enzimas de restrição NheI, e EcoRI com o objetivo de obter o fragmento relativo à sequência da proteína FrpA. Estas enzimas de restrição foram escolhidas tendo em conta: a sua localização de corte, isto é, estão situadas entre o intervalo de nucleótidos fora da região essencial do promotor *Multiple cloning site* (MCS), 637 e 762 bp; cortam o plasmídeo pVAX-GFP apenas uma vez; e cortam de maneira igual. Tanto as enzimas como os *buffers* utilizados são da marca *NZYtech* (Lisboa, Portugal).

### 3.1.7. Digestão do plasmídeo pVAX-GFP

Houve necessidade de verificar se o plasmídeo pVAX-GFP era de facto digerido pelas enzimas de restrição escolhidas, a NheI e a EcoRI. Para isto utilizaram-se os volumes que estão representados na Tabela II.

**Tabela II** - Componentes e volumes necessários para fazer a digestão de pVAX-GFP

Componentes	Volume (µL)
NheI e EcoRI	1
<i>Buffer (para cada um)</i>	2
pVAX-GFP	Y
H <sub>2</sub> O PCR	X

O volume de água (X) necessário para uma reação de PCR depende do volume que falta para se obter um volume final de solução de 20 µL; A quantidade de pVAX-GFP (Y), em µL, utilizada nesta reação, depende do valor de ng da amostra a ser utilizada, pois tem que se utilizar uma concentração final de 100 ng de pDNA

Utilizou-se o *Buffer Tango* para a NheI, o *Buffer H* para a digestão com EcoRI e o *Buffer MultiCore* para a digestão com as duas enzimas.

Fez-se uma digestão apenas com NheI, outra digestão com EcoRI e outra com as duas enzimas. Estas digestões foram feitas a 37°C durante 2 horas, confirmadas através de eletroforese e os produtos da digestão foram posteriormente armazenados a 4°C, durante alguns dias, até serem utilizados para a clonagem (Secção 3.1.9.).

### 3.1.8. Construção dos fragmentos 1 e 6

Os fragmentos genéticos 1 e 6, foram construídos utilizando sequências sintéticas. Criou-se uma sequência iniciadora *forward* e uma *reverse* para cada um dos fragmentos.

Ressuspendeu-se cada uma destas sequências e diluiu-se para a concentração de 100 µM. Seguiu-se então para a hibridação das sequências, utilizando volumes iguais de soluções das duas sequências (10 µL *forward* e 10 µL *reverse*). Efetuou-se um *annealing*, que começou na temperatura de 90°C e baixou 1°C por minuto até se alcançar os 4°C, no equipamento *T-Gradient (Thermocycler, Biometra)*. Armazenou-se cada um dos produtos alinhados a 4°C, durante alguns dias, até serem utilizados na clonagem com pVAX-GFP (Secção 3.1.9.).

### 3.1.9. Construção dos plasmídeos pVAX-FrpA-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP

Após o plasmídeo pVAX-GFP ser digerido com as enzimas de restrição escolhidas (Secção 3.1.7), o gene da FrpA ser amplificado, utilizando a PCR, nas condições anteriormente expostas (Secção 3.1.6.), e o alinhamento das sequências *forward* e *reverse* respetivas de fragmento 1 e 6 (Secção 3.1.8.), passou-se para a clonagem dos respetivos genes no vetor pVAX-GFP.

Prepararam-se células competentes em *E. coli* DH5α. Fez-se um pré-inoculo *overnight*, num tubo de 15 mL, com 5 mL de meio LB, a uma temperatura de 37°C, com rotação de 250 rpm. Incubou-se um *Erlenmeyer* com uma DO inicial de 0,1, e seguiu-se este crescimento, em iguais condições de cultura, até alcançar uma DO de 1. Centrifugou-se a suspensão celular, a 1000xg durante 10 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com 2 mL de tampão TSS (Meio LB, 100 mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 20% (m/v) PEG8000 e 10% (m/v) Sulfóxido de dimetilo (DMSO)). Prepararam-se assim 50 µL de células competentes que se armazenaram a -80°C.

Para a clonagem dos genes dos Frag1, Frag6 e FrpA juntaram-se num microtubo de 1,5 mL, 100 ng de pVAX-GFP digerido, 6 ng/µL de cada solução de construções genéticas, 2 µL de *buffer* de ligação e 1 µL de *T4 DNA ligase*. Preencheu-se com H<sub>2</sub>O estéril até alcançar um volume total de 20 µL. Desta mistura 10 µL foram incubados a temperatura ambiente durante 2 horas e os restantes 10 µL incubados a 4°C *overnight*.

Após as clonagens e a preparação das células competentes estarem concluídas, juntou-se 10 µL de cada uma das soluções de pVAX-GFP contendo os genes-alvo clonados com 50 µL de suspensão das células competentes, e procedeu-se a um choque térmico, incubando os microtubos em gelo durante 20 min e aquecendo-se a mistura a 42°C durante

1 minuto. Colocou-se a mistura em gelo novamente, durante 1 minuto, adicionou-se 1 mL de meio LB e incubou-se a 37°C durante 1 hora. Após choque térmico concluído, plaqueou-se em placas de *petri* com 100 µL, centrifugou-se a mistura restante, descartou-se o sobrenadante e plaqueou-se esse *pellet* noutra placa. Incubaram-se as placas a 37°C durante 24 horas. Estas placas foram preparadas com meio LB com 2% (m/v) agar e 30 ng/µL de *Kan*.

Após as 24 horas de incubação, escolheram-se 6 colónias da primeira placa, que se repicaram individualmente para 6 tubos de 15 mL com 5 mL de meio LB e 30 ng/µL de *Kan*. Incubaram-se orbitalmente *overnight* a 37°C com uma rotação de 250 rpm. No dia seguinte, mediu-se a DO das suspensões celulares, e purificaram-se os plasmídeos das células de cada cultivo com o *High pure plasmid isolation kit (Roche)*, seguindo o respetivo protocolo.

Após purificação, digeriu-se o pDNA, com as enzimas de restrição *NheI* e *EcoRI*, para verificar se se tinham, de facto, transformado as células com os plasmídeos pVAX-FrpA-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP. Esta digestão foi realizada com as mesmas condições referidas anteriormente (Secção 3.1.7.). Utilizaram-se 2 µg de pDNA da solução amostrada e 2 µL de cada solução de enzima. No caso de pVAX-FrpA-GFP, este ainda foi digerido com a enzima *AflIII*, utilizando 1 µg de plasmídeo e 1 µL de solução enzimática.

Depois da digestão, recorreu-se à eletroforese. Após confirmação do tamanho esperado dos fragmentos, sequenciaram-se estes plasmídeos (*STABVIDA*, Lisboa, Portugal), com os *primers* universais, *forward* CMV-F e *reverse* EGFP-CR. Os resultados da sequenciação foram comparados com as sequências teóricas anteriormente elaboradas com o *software* ApE e para a confirmação destes plasmídeos utilizou-se o programa ExPASy – *Translate tool*. Foram feitos bancos de todas as células transformadas com os plasmídeos conseguidos, em suspensão de meio LB suplementado com 15% de glicerol e uma DO de 2, que foram armazenados a -80°C.

## 3.2. Desenvolvimento das vacinas de DNA

### 3.2.1. Produção de pDNA

Em *Erlenmeyers* de 100 mL, contendo 30 mL de LB com *Kan*, a *E. coli* DH5α transformada, contendo os plasmídeos alvo (pDNA), foi cultivada a 37°C *overnight*, num incubador orbital, a 250 rpm.

No dia seguinte, inoculou-se com uma DO inicial de 0,1 um Erlenmeyer de 2000 mL com 500 mL de *Terrific Broth* (TB) com glicerol e *Kan*. Acompanhou-se o crescimento até alcançar uma DO (600 nm) aproximada a 5.

### 3.2.2. Lise alcalina e purificação primária de pDNA

Para a primeira etapa de purificação dos plasmídeos recorreu-se a uma lise alcalina. Começou-se por centrifugar a suspensão, descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* com tampão P1 (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM ácido etilenodiamino tetraacético, pH 8) até uma DO (600 nm) aproximada de 60. De seguida, o mesmo volume foi adicionado de tampão P2 (0,2 M hidróxido de sódio, 1% (w/v) dodecilsulfato de sódio) à suspensão e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente, para se dar a lise celular.

Para interromper a lise celular, neutralizando a mistura, adicionou-se tampão P3 (5 M solução de acetato / 3 M potássio (pH 5,0) preparada com acetato de potássio, ácido acético glacial e MilliQ-H<sub>2</sub>O) em volume igual aos tampões usados anteriormente e incubou-se em gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a mistura para remover os fragmentos celulares, o gDNA e as proteínas insolubilizadas. O sobrenadante foi transferido para outro micrtubulo, e os ácidos nucleicos no sobrenadante (pDNA, RNA e vestígios de gDNA) foram precipitados com 0,7 volumes de isopropanol puro durante 2 horas a 4°C em tubos de 50 mL. Centrifugou-se a suspensão de precipitados novamente e removeu-se o sobrenadante. Os *pellets* secaram *overnight* à temperatura ambiente.

No dia seguinte, os *pellets* foram ressuspensos com 1 mL de 10 mM Tris-HCl pH 8, e foi adicionado sulfato de amónio sólido à solução até uma concentração de 2,5 M, para induzir a precipitação das proteínas residuais. Incubou-se em gelo e centrifugou-se. Todas as centrifugações realizadas nesta Secção (3.2.2.) foram realizadas a 4°C a 6000xg.

### 3.2.3. Purificação de pDNA por HIC

A solução obtida no procedimento 3.2.2. foi purificada por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). Utilizou-se uma unidade de membrana adsorvente, *Sartobind® Phenyl Nano* de 3 mL (*Sartorius*, Gottingen, Alemanha). Esta coluna de membrana foi ligada a um sistema *ÄKTA purifier 10 FPLC* (*GE Healthcare*, Chicago, Illinois, EUA). A membrana possui grupos fenilo na sua superfície para a ligação do pDNA e impurezas igualmente

hidrofóbicas, que serão separadas com um perfil de eluição em degraus. Depois de equilibrar a membrana com o tampão de ligação (1,8 M de sulfato de amônio em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e o tampão de eluição foi Tris-HCl 10mM, pH 8,0), um volume de solução que continha pDNA foi injetada na coluna e fluiu durante 15 minutos com um caudal de 1 mL/min. A eluição foi realizada em quatro etapas com injeção de tampão de eluição a 15, 25, 35 e 100%. A condutividade e a Absorvância (Abs) de ultravioleta do eluato (260 nm), foram monitorizadas continuamente. Durante cada corrida, coletou-se o fluido efluente da coluna HIC em frações de 1,5 mL em microtubos de 2 mL com um coletor de frações. Este procedimento foi repetido três vezes por plasmídeo. Por fim, as frações foram mantidas a 4°C até às etapas de concentração e dessalinização por diafiltração (Secção 3.2.4.).

### 3.2.4. Concentração e dessalinização por diafiltração

As frações selecionadas obtidas a partir do procedimento 3.2.3. foram combinadas, concentradas e dessalinizadas com PBS utilizando sistemas de ultrafiltração centrífuga *Vivaspin® Turbo 15* de 15 mL (*Sartorius*), com membrana de 50kDa de exclusão molecular nominal. As soluções foram concentradas por centrifugação utilizando um rotor basculante por 20 minutos a 3.220xg e os permeados foram descartados. Em seguida, para dessalinizar, diafiltrou-se o volume retido no módulo usando 15 mL de PBS sob iguais condições de centrifugação, sempre descartando o permeado. Este passo foi repetido quatro vezes. A solução de pDNA concentrada, dessalinizada e purificada foi recuperada do módulo com uma micropipeta e armazenada num microtubo de 1,5 mL. Posteriormente, a concentração de pDNA foi medida no *Nanodrop* e a qualidade do pDNA purificado foi avaliada numa eletroforese em gel de agarose 1%. O pDNA purificado foi armazenado a 4°C para posterior utilização (Secções 3.2.5. e 3.2.7.).

### 3.2.5. Junção dos adjuvantes

Ambos os adjuvantes de vacinação, Montanide ISA 763 A VG e Montanide Gel 02 PR, foram gentilmente oferecidos pela empresa *Seppic* (Courbevoie, França) e autoclavados antes de serem utilizados. O PBS utilizado também foi esterilizado.

Para preparar as soluções com Montanide Gel 02 PR, antes de autoclavar adicionaram-se 8068 µL de PBS ao volume deste adjuvante comercial que seria necessário para a vacina (Tabela III). Após autoclavagem arrefeceu-se rapidamente a mistura e adicionaram-se 904 µL da solução que continha pDNA (1650 µg) e 1 mL de PBS estéril. Agitou-se intensamente,

recorrendo a um agitador magnético, durante 60 minutos. A proporção volumétrica utilizada foi 10% de adjuvante:90% de solução de pDNA. Os volumes de adjuvante, de PBS e de pDNA estão expostos na Tabela III.

**Tabela III** - Volumes utilizados para a preparação da emulsão de adjuvante Montanide Gel 02 PR com pDNA

Plasmídeo	M pDNA (µg)	V pDNA (µL)	V PBS (µL)	V adjuvante (µL)	V total (µL)
pVAX-Frag6-GFP	1650	904	8068	988	9881

M pDNA: Massa de plasmídeo necessária para obter uma massa final de 0,174 µg/µL no preparado; V pDNA: volume que é necessário para obter a M pDNA necessária; V PBS: Volume de PBS utilizado na preparação da emulsão; V adjuvante: Volume de adjuvante utilizado para respeitar a proporção 90% pDNA:10% Adjuvante; V total: Volume total da emulsão

Para o Montanide ISA 763 A VG, foi necessário recorrer a alguns testes para perceber qual o melhor método. Começou-se por preparar 3 soluções idênticas, de 20 mL, contendo 70% adjuvante: 30% PBS. No sonicador *SONOPULE Ultrasonic homogenizers (Bandelin, Berlin, Alemanha)*, para a primeira amostra (1) deu 1 pulso de ultrassons (45 segundos) com amplitude de 50%, para a segunda amostra (2) utilizou-se as mesmas condições, mas com 2 pulsos, com pausa de 15 segundos entre eles, e na terceira amostra (3) utilizaram-se as mesmas condições, porém 3 pulsos, intercalados por pausa de 15 segundos. Observaram-se diferenças nas soluções sonicadas a nível da viscosidade, havendo uma diminuição da viscosidade consoante o número de pulsos. Prosseguiu-se com as condições que foram utilizadas para a terceira amostra (3) para a preparação das amostras com adjuvante. Os volumes de adjuvante, de PBS e de pDNA utilizados estão expostos na Tabela IV.

**Tabela IV** - Volumes utilizados para as preparações das emulsões de adjuvante Montanide ISA 763 A VG com pDNA

Plasmídeo	M pDNA (µg)	V pDNA (µL)	V PBS (µL)	V adjuvante (µL)	V total (µL)
pVAX-GFP	1505	2600	364	6916	9881
pVAX-Frag1-GFP	1505	572	2392	6916	9881
pVAX-Frag6-GFP	1505	356	2608	6916	9881

M pDNA: Massa de plasmídeo necessária para obter uma massa final de 0,174 µg/µL no preparado; V pDNA: volume que é necessário para obter a M pDNA necessária; V PBS: Volume de PBS utilizado na preparação da emulsão; V adjuvante: Volume de adjuvante utilizado para respeitar a proporção 30%pDNA: 70% Adjuvante; V total: Volume total da emulsão

Prepararam-se as soluções de Montanide ISA 763 A VG anteriormente, juntando 364 µL de PBS ao volume de adjuvante indicado na Tabela IV e utilizando as condições anteriormente descritas no sonicador. Juntou-se o restante volume de PBS (572 µL para o

plasmídeo pVAX-Frag1-GFP e 356  $\mu\text{L}$  para o plasmídeo pVAX-Frag6-GFP) às respectivas soluções de pDNA. As emulsões foram armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  para serem utilizadas na imunização de robalos juvenis para avaliação da eficácia da vacina (Secção 3.3.1). A mistura entre Montanide ISA 763 A VG com as soluções de pDNA foi realizada minutos antes da vacinação, utilizando vórtice durante 10 minutos.

### 3.2.6. Síntese e caracterização de nanopartículas de quitosano-TPP

Tanto o quitosano como o TPP utilizados são da marca *Acros Organics*. Começou-se por dissolver o quitosano de cadeia longa (MW=100,000-300,000) *overnight*, a  $37^{\circ}\text{C}$  e com agitação orbital a 250 rpm. Esta solução de quitosano foi preparada com a concentração de 3 mg/mL numa solução aquosa com 0,5% (v/v) de ácido acético glacial (pH 3,5).

No dia seguinte, adicionou-se à solução de quitosano uma solução de TPP, gota a gota, à temperatura ambiente e sob uma agitação suave e constante. A solução de TPP foi preparada anteriormente, com uma concentração de 0,75 mg/mL em MiliQ-H<sub>2</sub>O. Deixou-se a suspensão coloidal formar-se sob agitação constante durante 30 minutos e então armazenou-se a  $4^{\circ}\text{C}$ , até à sua caracterização e propensão para encapsular pDNA (Secção 3.2.7). Tanto a solução de quitosano como a água MiliQ-H<sub>2</sub>O foram filtradas previamente com um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro.

Para caracterizar as nanopartículas, o diâmetro hidrodinâmico médio-Z (tamanho), o potencial zeta (indicador da carga na superfície) e o índice de polidispersidade (PDI; índice de distribuição de tamanhos) foram medidos usando o equipamento *Zetasizer*. Todas as medições foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando soluções filtradas (para não interferir nas medidas), e todas as formulações foram analisadas em triplicado. As condições mantiveram-se sempre que o processo era executado.

### 3.2.7. Encapsulamento de pDNA

Para encapsular o pDNA, a suspensão coloidal de CS-TPP e a solução de pDNA foram previamente aquecidas, separadamente, a  $55^{\circ}\text{C}$ . De seguida, misturaram-se rapidamente as seguintes proporções: 500  $\mu\text{L}$  de nanopartículas CS-TPP, 488  $\mu\text{L}$  de PBS e 12  $\mu\text{L}$  de solução com pDNA (15,8  $\mu\text{g}$ ) e foi agitado, em vórtice, durante 30 segundos. Incubou-se esta suspensão coloidal durante 30 minutos, para estabilizar os poliplexos.

O tamanho, o potencial zeta e o PDI foram medidos novamente usando o *Zetasizer* e as condições descritas anteriormente.

### 3.3. Avaliação da eficácia das vacinas de DNA

Este estudo foi realizado sob a supervisão de uma especialista credenciada, em ciência de animais de laboratório, pela Autoridade Veterinária Portuguesa (seguindo as recomendações da categoria C da FELASA), de acordo com as diretrizes sobre proteção de animais utilizados para fins científicos (Diretiva Europeia 2010/63/EU).

#### 3.3.1. Desenho experimental

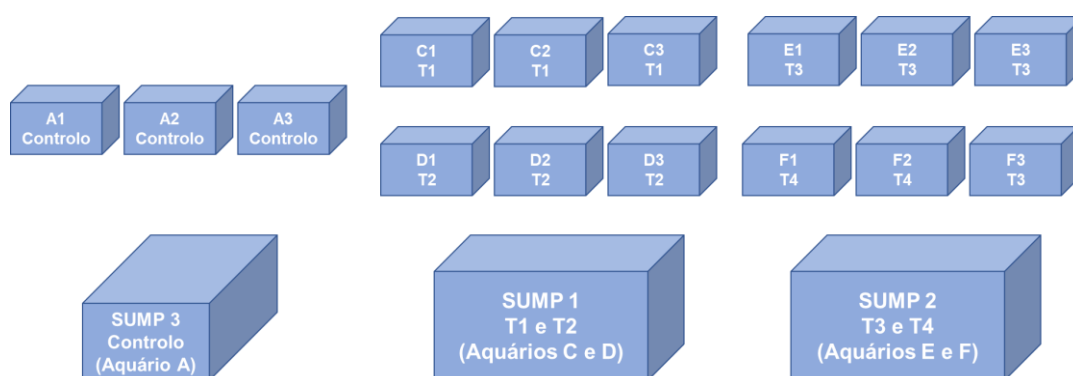
Para avaliar a eficácia das vacinas desenvolvidas foram vacinados juvenis de robalos (*Dicentrarchus labrax*), com peso médio inicial aproximado de 15 g, adquiridos na aquacultura *Nasharyba* (Coimbra, Portugal) e transportados para o edifício Cetemares (Peniche, Portugal). Foram utilizados no total 390 peixes.

Distribuíram-se os peixes aleatoriamente por 15 aquários de 20 L, ficando uma densidade aproximada por aquário de 6,5 kg/m<sup>3</sup> (26 robalos em cada aquário, exceto num dos tanques que conteve apenas 21). A aclimatização destes peixes durou 2 semanas, a uma temperatura média de 19±0,5°C, alimentados todos os dias, duas vezes por dia, com ração, *ad libitum* (até à saciedade) com ração seca (*Sparos*, Olhão, Portugal). O valor médio de oxigénio dissolvido foi de 7,14±0,22 mg/L (ppm), o pH foi mantido a 8,30±0,1 e salinidade a 32±0,2 ppt.

#### 3.3.2. Imunização dos peixes

Os peixes não foram alimentados nas 24 horas antes da imunização e de amostragens. Todos os indivíduos foram previamente pesados para que a administração da vacina fosse feita consoante o seu peso, garantindo que todos os peixes fossem vacinados com a mesma dose (valores de volume administrado a cada peixe nas Tabelas A II e A III, do Anexo). A vacinação foi realizada com seringas 1 mL *Norm-Ject* e com agulhas hipodérmicas 25G-0,5x16 mm *MicroTip*. Antes da vacinação i.p., os peixes foram colocados e mantidos num balde com uma solução de 2-*fenoxietanol* (0,5 mL/L) até estarem anestesiados. Após injeção foram mantidos em baldes com água bem aerificada até recuperarem. Após recuperação foram transferidos para os respetivos tanques.

Os peixes nos aquários A1, A2 e A3 foram injetados com 120 µL de PBS (controle), os peixes nos aquários C1, C2 e C3 foram vacinados com plasmídeo pVAX-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG (T1), os robalos nos aquários D1, D2 e D3 foram vacinados com vacina contendo pVAX-Frag1-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG (T2), os juvenis nos aquários E1, E2 e E3 foram vacinados com vacina contendo pVAX-Frag6-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG (T3), os indivíduos nos aquários F1, F2 e F3 foram vacinados com vacina contendo pVAX-Frag6-GFP com adjuvante Montanide Gel 02 PR (T4), conforme o esquema exposto na Figura 9. A vacinação foi realizada a temperatura ambiente. A dose das vacinas foi de 1,2 µg pDNA/g<sub>peixe</sub>.



**Figura 9** - Aquários utilizados para imunização. Cada aquário de 20 litros contém 26 peixes. Feitos em triplicado. Controle - Peixes vacinados com PBS; T1 – Peixes vacinados com pVAX-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; T2 – Peixes vacinados com pVAX-Frag1-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; T3 – Peixes vacinados com pVAX-Frag6-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; T4– Peixes vacinados com pVAX-Frag6-GFP com adjuvante Montanide Gel 02 PR; SUMP – Sistemas de recirculação de águas utilizados para cada tratamento; Aquários enumerados com letras e cada número simboliza uma divisória

Durante os 30 dias de ensaio de imunização, os indivíduos foram alimentados duas vezes por dia *ad libitum*. A mortalidade foi registada e observou-se o comportamento dos indivíduos. Foram efetuadas rotinas diárias de limpeza, como sifonagem dos tanques e limpeza das lâs de vidro. Medições dos parâmetros da qualidade da água foram realizados diariamente, para temperatura e salinidade, e semanalmente para nitritos e amónia. Foram efetuadas trocas de água dos sistemas sempre que necessário.

Cada tratamento continha um sistema de recirculação de água, constituído por um filtro mecânico, de lã de vidro, e filtros biológicos, as biobolas.

Nas Tabela A II e A III, do Anexo, estão presentes os valores exatos administrados a cada peixe para cada tanque correspondente a cada tratamento, em triplicado.

### 3.3.3. Infeção com *Photobacterium damselae* subs. *piscicida*

Trinta dias após vacinação (Li *et al.*, 2013), os peixes foram transportados para a sala de contaminação e divididos, em triplicado, em dois grupos, peixes “infetados” e “não infetados” para cada tratamento.

Utilizaram-se aquários 60 litros com três divisórias, ficando 20 litros em cada divisória do aquário, respeitando uma densidade de 11,5 kg<sub>peixe</sub>/m<sup>3</sup> por aquário que se manteve à temperatura de 25°C, durante 2 semanas. Colocaram-se 10 peixes por divisória, dando no total 30 peixes infetados e 30 peixes não infetados, para cada um dos tratamentos, como é possível observar na Tabela V. Os aquários foram enumerados com letras e cada número simboliza a divisória. Garantiu-se que não houvesse mistura de peixes infetados e não infetados.

**Tabela V** – Aquários usados na infeção com Phdp para cada grupo de “Infetados” e “Não infetados”

Tratamentos	Aquários	Não Infetados	Infetados
T1 – Vacina pVAX-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG	C1	I1	E1
	C2	I2	E2
	C3	I3	E3
T2- Vacina pVAX-Frag1-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG	D1	F1	J1
	D2	F2	J2
	D3	F3	J3
T3 – Vacina pVAX-Frag6-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG	E1	D1	A1
	E2	D2	A2
	E3	D3	A3
T4- Vacina pVAX-Frag6-GFP com adjuvante Montanide Gel 02 PR	F1	G1	B1
	F2	G2	B2
	F3	G3	B3
Controlo - PBS	A1	C1	H1
	A2	C2	H2
	A3	C3	H3

A infeção foi feita com Phdp C4. A bactéria foi cultivada em *Marine Agar* durante cerca de 24 horas, recolheram-se as células assepticamente e efetuaram-se diluições com PBS alcançando uma concentração de 2,4x10<sup>6</sup> UFC/mL. Os volumes injetados i.p. em cada peixe neste desafio de infeção foram calculados (cerca de 100 µL) de forma a administrar 1,2x10<sup>5</sup> UFC/g<sub>peixe</sub>.

Para detetar a presença de Phdp em órgãos de peixes moribundos extraiu-se DNA do rim, fígado e baço de 4 peixes moribundos e prosseguiu-se para uma purificação, utilizando *DNeasy Blood & Tissues kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do protocolo. A extração de DNA da bactéria foi feita através do método clássico *boiling*.

Após a extração do DNA, realizou-se uma PCR para detetar a presença da bactéria nos órgãos dos peixes. Nesta análise foram utilizados dois genes, o RNA ribossomal 16S (16S rRNA) e o *Putative penicillin-binding protein 1A (Pbp)*. Na Tabela VI estão representados os primers utilizados para amplificar os respetivos fragmentos.

**Tabela VI** – Primers utilizados para amplificação de cada gene, 16S rRNA e Pbp

Genes	Primers	Sequências	Referência
16S rRNA	Forward	5'-GCTTGAAGAGATTTCGAGTGTGCCT-3'	Osorio <i>et al.</i> , 1999
	Reverse	3'-CCACCTCGCGGTCTTGCT-5'	
Pbp	Forward	5'-CGACTCAACTACAGATCACCCAGTCA-3'	Amagliani <i>et al.</i> , 2009
	Reverse	3'-GTGCGGCCTAAATTCGACGA-5'	

Cada reação consistiu em 1x de *NZYTaq II Green Master Mix* (Nzytech, Portugal), 0,5 mM de cada *primer*, 1 ml de DNA e água MiliQ até perfazer 20 ml de reação. As condições de PCR foram 4 min a 95°C, seguindo-se 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 55°C e 20s a 72°C, e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os resultados obtidos foram visualizados através de gel de agarose (1,5%), corado com RedSafe 1x (*Intron*, EUA) (Figura A 1, do Anexo).

### 3.3.4. Colheitas de sangue e tratamento das amostras

Antes de fazer a imunização efetuou-se uma colheita de sangue (amostragem 0 (A0)), onde foi retirado sangue a 10 peixes. Após administração da vacina, procedeu-se a uma amostragem intermédia, após 15 dias (A1) e outra ao final de 30 dias (A2). Nestas duas amostragens, foi retirado sangue a dois peixes por aquário.

Para estas amostragens, anestesiaram-se os peixes, como descrito anteriormente, e recolheu-se o sangue da veia caudal com uma seringa não heparinizada, igual à utilizada na vacinação. Após a colheita de sangue, colocou-se num microtubo de 1,5 mL e deixou-se o sangue coagular, incubando *overnight* a 4°C. Após incubação retirou-se o coágulo por centrifugação e obteve-se o soro (sobrenadante). As amostras de soro foram mantidas a -80°C até serem utilizadas nos ensaios de ELISA indireto (Secção 3.3.5).

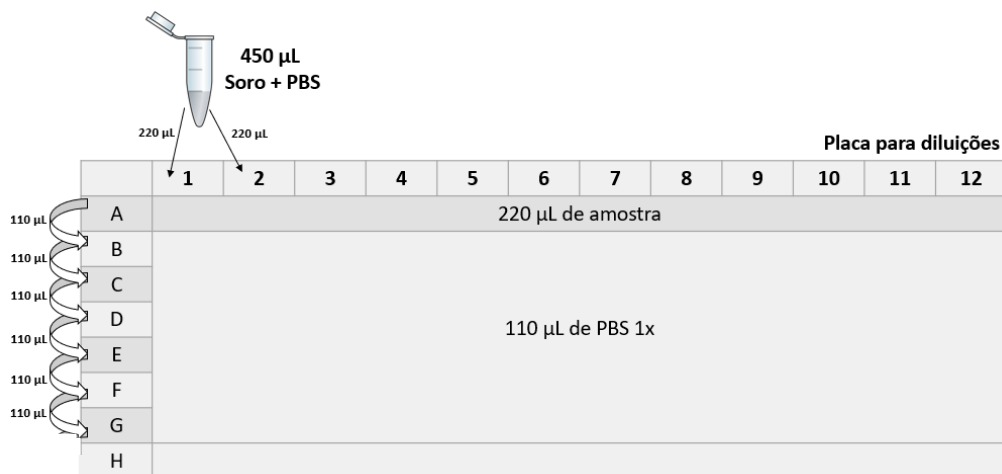
### 3.3.5. ELISA indireto

Em todos os ensaios ELISA efetuados neste trabalho foram utilizadas microplacas de 96 poços, PS, *F-bottom, clear, microlon, high binding* (*Greiner bio-one*, Kremsmunster, Áustria), ref: 655061. O anticorpo utilizado foi *Anti-sea bass IgM MAb*, e o anticorpo conjugado foi *Anti-mouse IgG HRP* (*Aquatic Diagnostics Ltd*, Scotland, UK).

Utilizou-se uma placa para cada tratamento, sendo que se usaram 6 placas para a A1 e 6 placas para A2. A exceção foi feita com a A0, soro de peixes antes de serem vacinados, havendo apenas 2 amostras em duplicado, 2 *pools*, cada uma com soro de 5 peixes.

Para cada ensaio ELISA utilizou-se um procedimento de três dias. No primeiro dia adicionam-se 100 µL/poço de suspensão da bactéria Phdp C4 (placa *Marine agar* recente) com 10<sup>8</sup> UFC/mL, na placa de ELISA e incubou-se a 4°C *overnight*. No segundo dia lavou-se a placa 3x com Tampão *Low Salt Wash Buffer* (LSWB) (0.02M Tris, 0.38M NaCl e 0.05% Tween 20). Adicionou-se 250 µL/poço de tampão de bloqueio (3% (m/v) de leite em água destilada) e incubou-se a temperatura ambiente. Passadas 2 horas, lavou-se novamente 3x com tampão LSBW. Adicionaram-se 100 µL/poço das respetivas diluições de amostras a analisar, previamente preparadas, e incubou-se a placa *overnight* a 4°C. Na última linha (H) adicionaram-se 100 µL/poço de PBS, para que este servisse como controlo negativo.

As diluições foram preparadas numa outra microplaca. Começou-se por preparar as diluições das amostras (1:32) em microtubos de 1,5 mL. Nos poços adicionou-se 110 µL/poço de PBS, exceto na primeira linha (A), onde se adicionou 220 µL/poço das amostras diluídas em duplicados, e na última linha (H), ficando esta vazia. Misturou-se com cuidado a primeira linha (A) e retirou-se 110 µL/poço da linha A para a próxima linha (B). Repetiu-se este processo até à última linha (G), como esta representados na Figura 10.



**Figura 10** – Procedimento para obter a placa com diluições. Sendo a linha A amostras duplicadas diluídas de 1:32 e as restantes linhas (até G) diluições sucessivas. A linha H corresponde ao controlo negativo

No terceiro dia começou-se por lavar a placa 5x com tampão *High Salt Wash Buffer* (HSWB) (0.02M Tris, 0.5M NaCl e 0.1% Tween 20) (armazenado a 4°C anteriormente), depois adicionaram-se 100 µL de anticorpo primário e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação lavou-se novamente a placa 5x com HSWB e adicionou-se 100 µL de anticorpo conjugado. Incubou-se mais 1 hora e depois voltou-se a lavar a placa 5 x com HSWB. Em todas as series de 5 lavagens, na quinta incubou-se a placa durante 5 minutos à temperatura ambiente antes de prosseguir o processo. Adicionaram-se 100 µL de substrato da peroxidase, recomendado pelo fabricante, nos poços e incubou-se a placa no escuro durante 10 minutos. Para parar a reação, adicionaram-se 50 µL de solução STOP (2 M ácido sulfúrico) e efetuou-se a leitura da placa no leitor das Abs dos poços de microplacas, ao comprimento de onda de 450 nm.

### 3.3.5.1. Tratamento de dados do ELISA

Começou-se por subtrair aos valores de DO (450 nm) obtidos dos ensaios de ELISA indireto a média do controlo negativo de cada placa respetivamente. Apenas se considerou os valores de absorvância correspondente á diluição 1:32. Descartou-se os valores negativos, considerando-os 0. Procedeu-se a média por placa, que correspondia a cada tratamento e construiu-se um gráfico, presente na Secção 4.6.

É possível observar os valores médios de absorvância inicialmente obtidos por tratamento e das diversas diluições na Tabela A IV do Anexo.

### 3.3.6. Cálculo do RPS

Após a infecção registou-se, diariamente, a mortalidade e duas semanas depois da infecção, efetuou-se o cálculo da percentagem relativa de sobrevivência a partir da seguinte equação (Amend, 1981):

$$RPS = 1 - \frac{\% \text{ Mortalidade de peixes imunizados}}{\% \text{ Mortalidade de peixes controlo}} \times 100$$

**Equação 1** – Cálculo da percentagem relativa de sobrevivência

Para calcular a percentagem de mortalidade dos peixes recorreu-se à equação:

$$\% \text{ Mortalidade} = \frac{N^{\circ} \text{ de peixes que morreram}}{N^{\circ} \text{ de peixes iniciais}} \times 100$$

**Equação 2** – Cálculo da percentagem de mortalidade

### 3.3.7. Análise estatística

Foi efetuada uma análise estatística, utilizando o *software* IBM SPSS *Statistics* 27. Para os dados do ensaio dos ELISAs, começou-se por verificar a normalidade, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov ( $N > 30$ ), e como  $p < 0,05$ , seguiu-se para testes não paramétricos, fez-se a análise ao teste Kruskal-Wallis e comparações por método Pairwise de tratamentos.

Para os dados do RPS, começou-se também por verificar a normalidade, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov ( $N > 30$ ), e as amostras dividiram-se. Até ao quarto dia, como  $p < 0,05$ , seguiu-se para testes não paramétricos, fez-se a análise ao teste Kruskal-Wallis e comparações por método Pairwise de tratamentos. Após o quarto dia  $p > 0,05$ , logo seguiu-se para análise de ANOVA 2 ways. Verificou-se que havia diferenças entre tratamentos e, por isso, recorreu-se ao teste de Bonferroni.

## 4. Resultados e Discussão de Resultados

### 4.1. Análises Bioinformáticas

Começou-se a análise bioinformática utilizando a ferramenta *Basic Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology* (NCBI). É uma das ferramentas de bioinformática mais populares de busca e alinhamento de sequências. O BLAST utiliza sequências de nucleótidos e/ou proteínas em formato FASTA e fornece informações estatísticas sobre cada alinhamento, tornando as informações mais valiosas (Boratyn *et al.*, 2013; Camacho *et al.*, 2009).

Para esta análise, a proteína escolhida foi FrpA (WP\_082212545.1). Segundo o resultado do BLAST, para além de ter um alinhamento como *Photobacterium damsela*, como era de se esperar, esta proteína apresenta também valores de alinhamento superiores com outras espécies de *Photobacterium* como *Photobacterium indicum*, *frigidiphilum* e *profundum*, com espécies de *Vibrios*, tais como *Vibrio parahaemolyticus*, *mediterranei*, *coralliilyticus*, *neptunius*, *ostreicida* e *Salinivibrio sp.*, e também outra espécie de bactéria apareceu neste alinhamento, *Shewanella psychrophila*. Todas estas bactérias são gram-negativas, proteobactérias e têm a capacidade de produzir sideróforos. Estes sideróforos podem ser diferentes de espécies para espécies. No caso das bactérias *Photobacterium*, estas produzem um sideróforo denominado como piscibactina, que é transportado pela proteína FrpA (Figura 1 da Secção 1). Espécies de *Vibrionaceae* podem produzir outros sideróforos, como anfibactinas, deferroaxaminas, trivanchrobactinas, ocrobactinas e outras mais. No caso de *Vibrio parahaemolyticus*, um patógeno humano, este produz um sideróforo chamado vibrioferrina. Espécies de *Shewanella* produzem sideróforos conhecidos como avaroferrina (Thode *et al.*, 2018).

Como referido anteriormente, a análise bioinformática foi realizada com o objetivo de escolher fragmentos (péptidos) potencialmente mais imunogénicos que a proteína FrpA integral. Um fragmento ideal deve cumprir vários critérios. Um dos critérios mais importantes é o comprimento destes fragmentos. O péptido deve possuir um comprimento compreendido entre 10 a 20 aminoácidos. Sequências de aminoácidos acima destes valores podem produzir anticorpos que não reconhecem a proteína, com especificidade suficiente, e sequências com péptidos abaixo destes valores podem não reconhecer a proteína com afinidade suficiente. Por outro lado, péptidos com um comprimento maior que 20 aminoácidos podem fornecer uma boa resposta imunológica e uma estrutura secundária com maior semelhança à da proteína alvo (Trier *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2016).

Para que ocorra uma ligação entre os epitopos e os anticorpos, estes devem estar à superfície da proteína, isto é, devem ter uma maior acessibilidade e serem hidrofílicos. As regiões hidrófilas estão presentes na superfície e as regiões hidrofóbicas estão dentro da estrutura da proteína, com difícil acessibilidade (Lee *et al.*, 2016; Lodish *et al.*, 2000a). Estes parâmetros foram analisados, como referido anteriormente, através do IEDB, com o método de previsão de acessibilidade de superfície de epitopos de Emini e previsão de hidrofília de Parker. Estes resultados podem ser observados na totalidade na Tabela A V e A IV e as suas representações gráficas estão disponíveis na Figura A 2 e A 3 do Anexo, respetivamente. Um fator essencial a ser considerado é também a agregação, pois, em anticorpos, quando há um núcleo hidrófobo na proteína as suas moléculas tendem a agregar-se porque esta região contribuirá para a estabilização das interações terciárias (van der Kant *et al.*, 2017). Para a escolha de um fragmento ideal, a probabilidade de agregação deve ser minimizada. Este parâmetro foi verificado com o *software* AGGRECAN, em que os *hot spots* são os locais onde existe maior probabilidade de agregação, logo, os fragmentos escolhidos não podem estar incluídos nestes. Pode observar-se os resultados na Figura A 4 do Anexo. Com o *software* Pred-TMBB, foi verificada a localização dos fragmentos da proteína FrpA, isto é, se no espaço extracelular. Estes resultados podem ser verificados na Figura A 5, do Anexo. Na Tabela VII mostram-se as sequências escolhidas e consideradas como mais antigénicas, sendo estas as sequências que preenchem os requisitos necessários, anteriormente descritos. Nenhuma destas sequências escolhidas tem probabilidade de agregação.

**Tabela VII - Comparação entre os fragmentos mais promissores**

Possíveis sequências (A)	Comprimento (10-20 aa) (B)	Epitopos		Acessibilidade superficial (> 1) (E)	Zonas com Flexibilidade (> 1.007) (F)	Antigenicidade e (> 1.012) (G)	Hidrofília (> 2.027) (H)
		BepiPred (C)	BepiPred 2.0 (D)				
(1) 160-175	Sim	15/16 (93%)	15/16 (93%)	13/16 80% - VS	Sim TDS	10/16 (60%)	Sim
(2) 168-186	Sim	15/19 (78%)	3/19 (11%)	13/19 66% - VS	Sim	6/19 (28%)	Sim TDS
(3) 263-276	Sim	11/14 (77%)	14/14 (100%)	6/14 38% - VS	Sim	3/14 (15%)	Sim TDS
(4) 258-276	Sim	11/19 (55%)	14/19 (73%)	11/19 55% - VS	Sim TDS	3/19 (11%)	Sim TDS
(5) 314-327	Sim	14/14 (100%)	5/14 (31%)	6/14 38%	Sim TDS	8/14 (54%)	Sim TDS
(6) 402-416	Sim	12/15 (79%)	12/15 (79%)	12/15 79% - VS	Sim TDS	7/15 (43%)	Sim TDS - VS

B, F e H: cumprimento ou não do critério; C e D: relação de epitopos existentes/número de aa total da sequência e a respetiva percentagem; E: aminoácidos acessíveis/número de aa total da sequência e a respetiva percentagem; G: número de aa com antigenicidade/número de aa total da sequência e a respetiva percentagem; TDS: todos os fragmentos preenchem o critério; VS: valores superiores comparados com as outras sequências; aa: aminoácidos

Com o *software* NetSurfP foi possível observar a estrutura secundária dos fragmentos mais promissores (possível observar na Figura A 6, do Anexo) e a análise completa da sequência da proteína FrpA (Figura A 7, do Anexo). Os fragmentos 1 e 6 demonstraram os melhores resultados imunológicos, em relação aos outros fragmentos, e correspondem a fragmentos de pequeno comprimento. Decidiu-se então mandar sintetizar estes dois fragmentos, na empresa STABVIDA, em duas sequências *forward* e *reverse*, como pode ser observado na Tabela VIII.

**Tabela VIII** - Sequências de nucleótidos nos fragmentos sintetizados

Fragmento	Primers	Sequências (5'- 3')
1	Forward	CTAGCATGAAGAAGGCGACTGATCAAAACCTAGCGTCTGGTGGTGTCACTTACAGCGCG
	Reverse complement	AATTCGCGCTGTAAGTGACACCACCAGACGCTAGGTTTTGATCAGTCGCCTTCTTCATG
6	Forward	CTAGCATGAGGATTGACAGCTATCAATCAGATAAGTCCGAAAACGTTATCTCTGCG
	Reverse complement	AATTCGCAGAGATAACGTTTTCGGACTTATCTGATTGATAGCTGTCAATCCTCATG

Azul: sequência de corte das enzimas utilizadas (NheI para *Forward* e EcoRI para *Reverse*); Verde: codão de iniciação adicionado

Procedeu-se ao desenho dos *primers* para a proteína FrpA, seguindo os critérios já referidos anteriormente. Desenharam-se dois *primers*, um *primer forward* e um *reverse*. Foram adicionados aminoácidos no início do *primer forward* e *reverse* para que haja uma estabilização deste. Houve também necessidade de juntar mais dois nucleótidos para que não haja alteração da proteína GFP quando se juntar a sequência da proteína pretendida e os fragmentos escolhidos. Na Tabela IX é possível observar estes *primers*.

**Tabela IX** - *Primers* da sequência da proteína

Primers	Sequências	Percentagem G/C (C)	Temperatura de melting (°C) (D)	Diferença de TM entre primers inferior a 5°C (E)
Forward	AAAGCTAGCATGTACAGGAACAGTTTC	39%	56	Sim
Reverse complement	TTTGAATTCGCCACTCTAGCTTCATATT	39%	54	

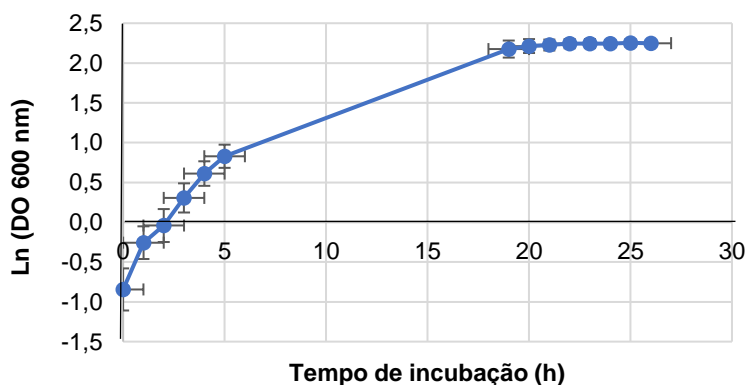
C, D e E: Critérios que têm de se obedecer para ser considerado um *primer* ideal. Laranja: aminoácidos adicionados para que haja uma melhor aderência da enzima de restrição (não contam para o cálculo do comprimento); Azul: sequência de corte das enzimas utilizadas (NheI para *Forward* e EcoRI para *Reverse*); Verde: sequência de proteína; As temperaturas de melting (TM) e as percentagens G/C foram calculadas através do software NEB

Segundo os critérios, mencionados anteriormente: a percentagem de G/C deve estar compreendida entre 40% e 60%, sendo 50% o ideal; a temperatura de *melting* deve estar compreendida entre 54°C e 62°C; e a diferença de TM entre primers deve ser inferior a 5°C (Dieffenbach et al., 1993). Quanto à percentagem de G/C estes valores estão muito próximos de 40% (39%), as temperaturas de *melting* estão compreendidas entre os valores indicados e a diferença entre temperaturas de *melting* é inferior a 5°C (2°C), podendo ser considerados *primers* ideais. Quanto ao comprimento, este também está compreendido nos valores indicados, entre 18 e 24 bases, não contando com a parte a laranja pois não existe emparelhamento destas bases na sequência.

## 4.2. Crescimento bacteriano de Phdp

As curvas de crescimento podem ser descritas por modelos matemáticos, contudo são utilizados para descrever o comportamento de microrganismos sob diferentes condições físicas ou químicas, como temperatura e pH (Zwietering *et al.*, 1990).

Para conhecer o comportamento da bactéria Phdp foi necessário recorrer ao desenho da sua curva de crescimento. Esta foi realizada com a monitorização da multiplicação da biomassa bacteriana através da DO (600 nm) do meio de cultivo. Na Figura 11, é possível observar a curva de crescimento de Phdp C4.



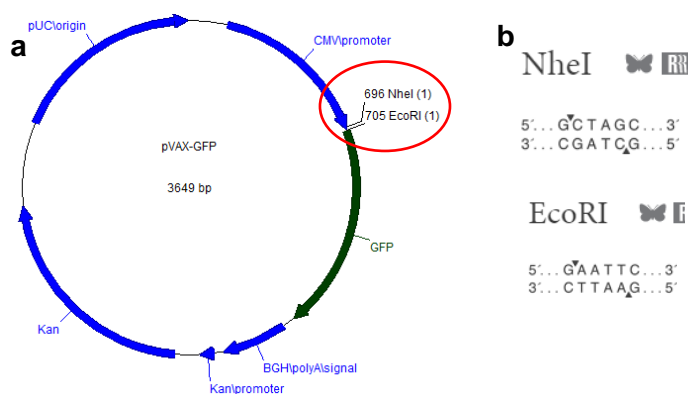
**Figura 11** - Curva de crescimento da bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em TSB suplementado com 2% NaCl, a 25°C, em incubador orbital a 250 rpm

Como se pode observar a cultura da Phdp não evidenciou uma fase lag. Tal pode ser explicado com o facto de o inóculo ter sido produzido em meio igual e em condições idênticas, não precisando as células de um tempo para se adaptar a novas condições, aquando da cultura monitorizada.

Num outro trabalho, a curva de crescimento de uma outra estirpe da Phdp foi semelhante. Alcançaram-se valores de concentração de biomassa muito idênticos, sendo que no presente estudo alcançou-se uma DO de aproximadamente 5,4 e no estudo de Nagano *et al.*, 2009, alcançaram uma DO de aproximadamente 5,6. Às 18 horas alcançou-se, em ambos os estudos, a fase estacionária. No outro estudo, foi utilizada a estirpe O82352. Fizeram um inóculo com o meio *Brain heart infusion broth*, suplementado com 1,5% NaCl, a 25°C com uma rotação de 100 rpm durante 16h. Depois inocularam os *Erlenmeyers*, com o mesmo meio, com as mesmas condições. Enquanto que a estirpe utilizada neste trabalho é C4, e o meio utilizado tanto para o inóculo como para o crescimento foi TSB suplementado com 2% NaCl e as condições foram 25°C todavia com uma rotação de 250 rpm. O comprimento de onda (c.d.o.) utilizado para medir a densidade ótica também foi diferente. Enquanto que neste outro estudo utilizaram um c.d.o. de 630 nm, neste trabalho utilizou-se um c.d.o. de 600 nm, porém, este pequeno desvio de 30 nm não deverá influenciar significativamente a dispersão da luz.

#### 4.3. Construção de plasmídeos: pVAX-FrpA-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP

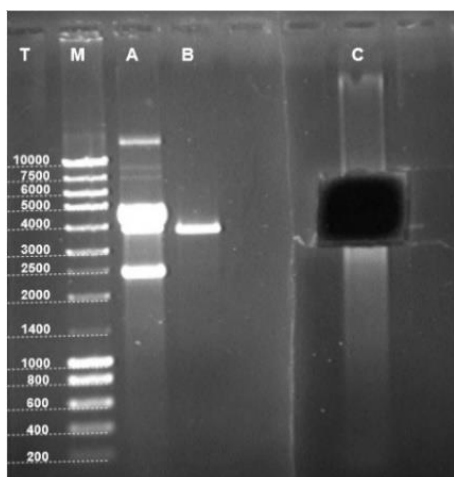
Após o cultivo de *E. coli* que albergava o plasmídeo pVAX-GFP, purificou-se o plasmídeo. Após purificação foi efetuada a sua digestão com duas enzimas de restrição, a NheI e a EcoRI. Na Figura 12 está a representação gráfica do local de corte destas enzimas, que por hidrólise do pVAX-GFP origina dois fragmentos: um com, aproximadamente (aprox.), 13 bp e outro com aprox. 3600 bp (a), e mostram-se as sequências de corte destas duas enzimas de restrição (nucleases) (b).



**Figura 12** – a) Representação do plasmídeo pVAX-GFP. Vermelho: locais de recorte das enzimas de restrição NheI e EcoRI. Obtido através do *software* ApE; b) Representação da sequência de corte das enzimas de restrição NheI e EcoRI

Houve necessidade de se recorrer a um gel de eletroforese para recortar a banda necessária, a banda com aprox. 3600 bp, posicionada horizontalmente entre as bandas de 3000 bp e 4000 bp do padrão *NZYDNA Ladder III* (Valor de tamanho referente a cada banda está presente na Figura A 8 do Anexo). A banda pequena de aprox. 13 bp não foi observada pois é bastante menor que o valor correspondente à última banda do padrão (200 bp). Na Figura 13 está exposto o gel de agarose que permitiu aferir a eficiência de digestão do plasmídeo (B).

Esta amostra digerida foi recortada (Figura 13 C) e purificada. As concentrações de DNA resultantes destas purificações, em ng/μL, estão apresentadas na Tabela X. A quantidade de pDNA no recorte era muito elevada e, por isso, foi repartida em 3 frações que foram purificadas individualmente. Após purificação juntou-se as amostras (*Pool*).



**Figura 13** – Eletroforese de pVAX-GFP digerido. T: Tamanho das bandas (bp); M: Padrão; A: pVAX-GFP não digerido; B: pVAX-GFP digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI. C: Corte da amostra B

**Tabela X** – Concentrações de frações purificadas de pVAX-GFP digerido e valores de Abs 260/280 e Abs 260/230

Frações	Concentração (ng/μL)	Abs 260/280	Abs 260/230
1	3,1	1,62	0,02
2	4,8	2,30	0,02
3	2,7	2,30	0,04
<b>Pool</b>	4,7	2,53	0,02

Frações 1, 2 e 3 foram obtidas através da purificação da banda recortada (Figura 13 c) do gel; *Pool*: junção das 3 frações obtidas

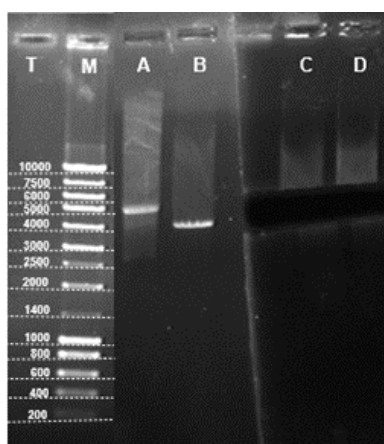
As relações de Abs 260/280 e 260/230 podem ser utilizadas para determinar a pureza de uma amostra de DNA genômico (gDNA). A Abs 260/280 avalia a contaminação proteica, e a relação de Abs 260/230 está relacionada com a contaminação por parte de fenóis, compostos aromáticos, péptidos e hidratos de carbono. Quanto maior forem os valores de ambas as medidas espectrofotométricas, maior será a qualidade de gDNA, isto é, mais pura estará a amostra. Os valores devem ser superiores a 1,8 e a 2, em relação à Abs 260/280 e Abs 260/230, respetivamente, para que o gDNA seja considerado puro (Nicklas & Buel, 2003).

Pode observar-se que a amostra *Pool* não demonstrou valores aceitáveis de razão de Abs de 260/230, ou seja, valores muito abaixo de 2, por isso, estas amostras podem conter contaminações significativas a nível de fenóis, compostos aromáticos, péptidos ou hidratos de carbono.

Estes valores podem ter sido influenciados pelo processo de purificação em si. Alguns dos reagentes, como *Binding Buffer*, *Wash Buffer* e *Elution Buffer* poderiam estar contaminados, devido à vasta utilização, podendo providenciar a contaminação. A incubação com *Binding Buffer* pode não ter sido realizada de modo eficiente. Um dos passos críticos, avisado pelo protocolo, é a colocação dos 50 µL de *Elution Buffer* no centro da coluna, e houve alguma dificuldade neste passo. O recorte do gel foi demasiado grande para a banda que se queria obter. Nesta técnica é necessária uma maior precisão para o recorte do gel. Então a fração recortada foi novamente analisada.

Na Figura A 9, do Anexo, a concentração e purificação do *pool* foram verificadas através da eletroforese. No gel é possível observar uma única banda (B) com aprox. 3600 bp, como esperado.

Todo este processo foi novamente repetido para obter mais quantidade de pVAX-GFP digerido. Utilizou-se o mesmo procedimento, o pVAX-GFP foi digerido, correu-se num gel, e posteriormente o plasmídeo foi recortado e purificado. Pode observar-se as concentrações destas purificações, em ng/µL, na Tabela XI, e os recortes efetuados, na Figura 14.



**Tabela XI** – Concentrações de amostras purificadas de pVAX-GFP digerido

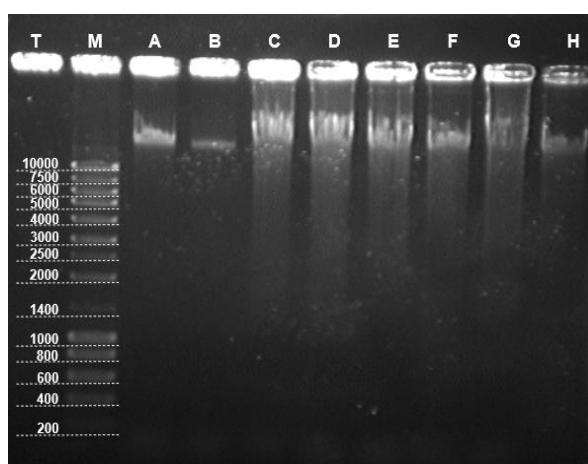
Frações	Concentração (ng/µL)	Abs 260/280	Abs 260/230
1	34,5	2,40	0,10
2	48,9	2,30	0,03

As frações 1, 2 foram obtidas através da purificação de uma banda recortada do gel da Figura 14

**Figura 14** – Eletroforese de pVAX-GFP digerido. T: Tamanho das bandas (bp); M: Padrão; A: pVAX-GFP não digerido; B: pVAX-GFP digerido com as enzimas de restrição NheI e EcoRI; C e D: Corte das bandas

Segundo os resultados da razão Abs 260/230, esta amostra poderia estar contaminada. Para a confirmação das concentrações e qualidade das amostras recorreu-se à eletroforese. O resultado foram duas bandas esperadas, nos 3600 bp.

Após o cultivo bacteriano, as células de Phdp foram lavadas, o seu gDNA extraído e purificado e a respetiva concentração, em ng/μL, foi medida. Estes concentrados de gDNA estão caracterizados na Tabela XII. As decorrentes frações purificadas de gDNA foram analisadas com a eletroforese, como se pode observar na Figura 15. A distinção de I e II apenas diz respeito à origem das frações, sendo I e II referentes a amostras recolhidas em *Erlenmeyers* diferentes, e cada um deles foi inoculado com uma colónia de Phdp diferente (I e II).



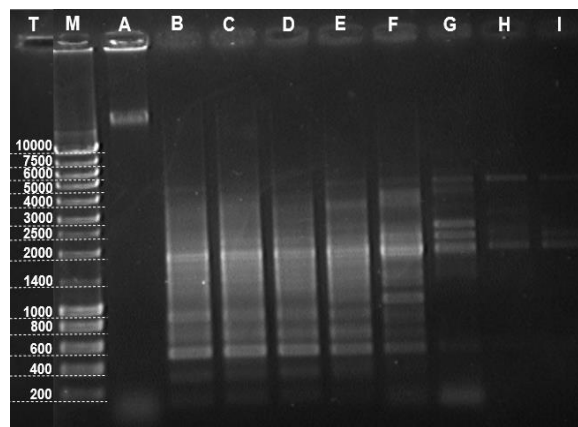
**Tabela XII** – Concentrações de frações purificadas de pVAX-GFP digerido e valores de Abs 260/280 e Abs 260/230

Fração	Concentração (ng/μL)	Abs 260/280	Abs 260/230
1I	449,8	1,96	1,35
2I	299,8	1,93	1,36
3I	662,5	2,02	1,69
4I	1449,0	1,71	0,95
1II	898,2	1,99	1,62
2II	983,3	2,02	1,86
3II	1111,9	2,03	1,85
4II	359,2	2,01	2,25

**Figura 15** – Eletroforese relativa às diversas frações de gDNA de Phdp. T: Tamanho das bandas (bp) de M; M: Padrão; A, B, C e D: Amostras gDNA purificadas relativas ao *Erlenmeyer* I, por ordem; E, F, G e H: Amostras purificadas relativas ao *Erlenmeyer* II, por ordem

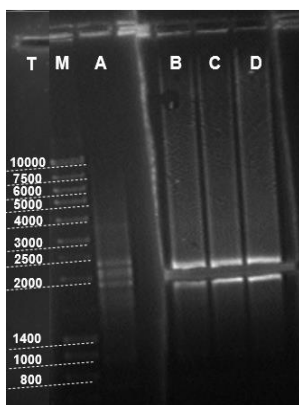
Segundo a Tabela XII, apenas a fração 4I poderia apresentar contaminações por proteínas (valor inferior a 1,8) e apenas a fração 4II estaria livre de contaminações por parte de péptidos e aminoácidos aromáticos. Porém, segundo o resultado da eletroforese, a fração que melhor resultado apresentou foi a 2I, pois é representada por uma banda única. Quanto ao tamanho esperado para as bandas no gel da Figura 15, seria superior a 10000 bp (informação retirada das sequências genómicas de cada estirpe de Phdp apresentadas no NCBI). Por isso, esperar-se-ia bandas num nível superior ao correspondente à primeira banda do padrão utilizado. Este facto comprovou-se.

O gradiente de temperatura do *annealing* para seleção da temperatura ótima pode ser observada na Figura 16. É possível observar que a banda mais intensa na área pretendida é correspondente à temperatura de *annealing* de 56,2°C (F), sendo esta considerada ótima.



**Figura 16** - Eletroforese referente às aos produtos da amplificação do gene da FrpA por PCR do gDNA de Phdp. T: Tamanho das bandas (bp) de M; M: Padrão; A: Amostra de 2I purificada; B, C, D, E, F, G, H e I: Amostras de PCR resultantes de diferentes temperaturas de *annealing*. As temperaturas foram de 48°C; 49,3°C; 51,5°C; 53,8°C; 56,2°C; 58,5°C; 60,7°C e 62°C, respetivamente e pela ordem indicada

Após selecionar a temperatura de *annealing*, procedeu-se a uma amplificação, por PCR, do gene FrpA baseado no extrato selecionado, o 2I. Esta PCR foi realizada com o objetivo de aumentar a quantidade da sequência de nucleótidos correspondente à proteína pretendida, FrpA, com aprox. 1983 bp, situando-se próxima à oitava banda da mistura padrão, com 2000 bp. Prosseguiu-se para a realização do mesmo procedimento utilizando uma maior quantidade de pDNA, fez-se novamente uma eletroforese e recortaram-se as bandas, correspondente aos poços B, C e D (Figura 17), para obter o gene com maior pureza. Posteriormente prosseguiu-se à purificação destes produtos. Obteve-se três frações, uma para cada banda recortada, porém como eram todas relacionadas à sequência da proteína pretendida, FrpA, juntaram-se as frações para se obter apenas uma (*Pool*). Os valores destas purificações estão expostos na Tabela XIII.



**Figura 17** – Eletroforese relativa aos produtos de amplificação de FrpA. T: Tamanho das bandas (bp) de M; M: Padrão; A: 10  $\mu$ l de amostra de FrpA; B, C e D: amostra A, com um maior volume e com o recorte feito para obter a banda pretendida

**Tabela XIII** – Concentrações e relações de Absorvância 260/280 e 260/230 de FrpA, de cada uma das frações purificadas

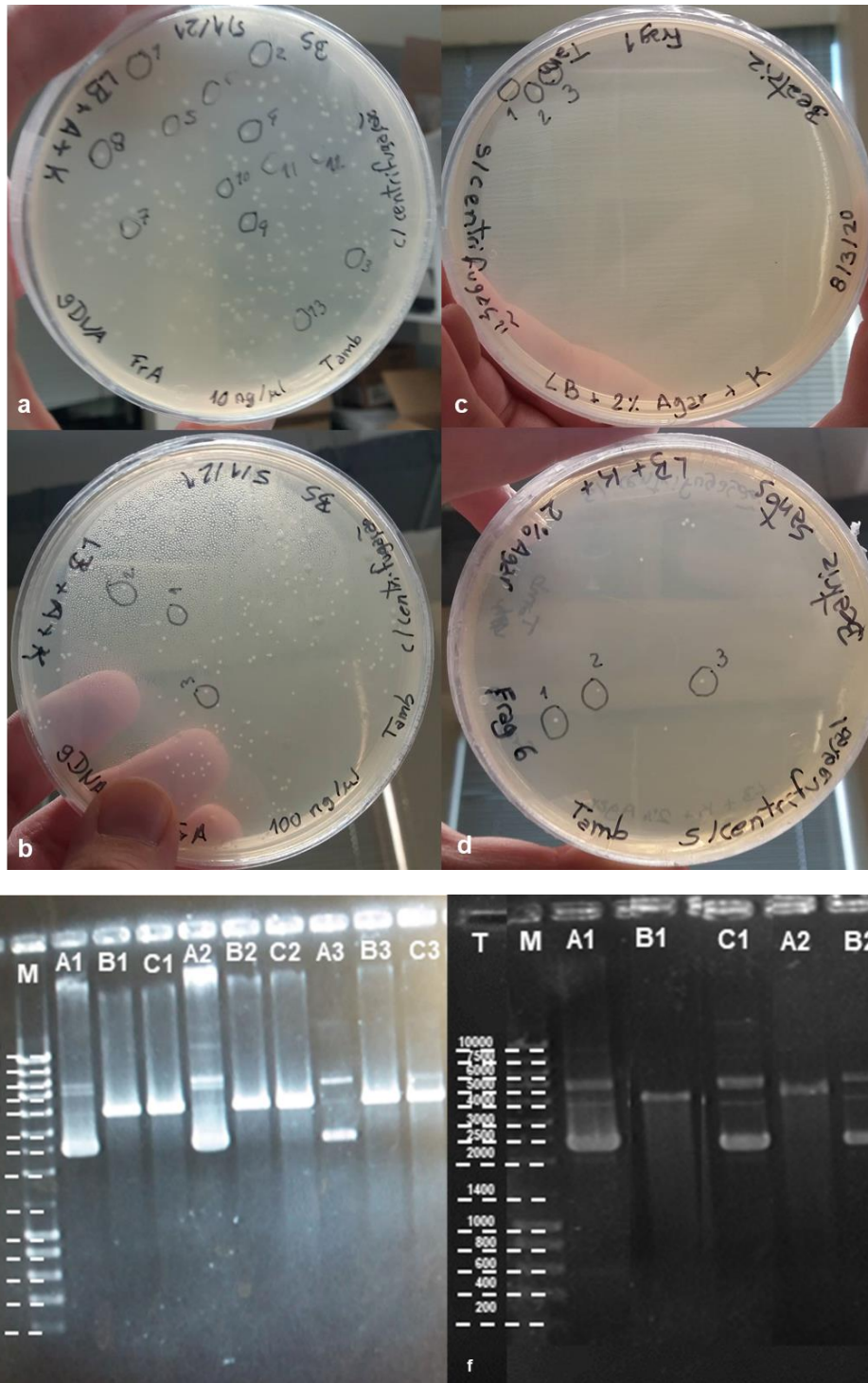
Frações	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Abs 260/280	Abs 260/230
1	6,3	1,52	0,21
2	7,8	1,68	0,13
3	7,6	1,58	0,10
<b>Pool</b>	8,1	1,65	0,15

As amostras 1, 2 e 3 foram obtidas através do recorte no gel, Figura 17 B, C e D, respetivamente; *Pool* é a junção dessas 3 frações

Quanto às concentrações, foram baixas em relação aos 100 ng/ $\mu$ L utilizados inicialmente para se realizar o PCR. Este resultado era esperado pois através do processo de purificação de bandas recortadas do gel perde-se material genómico. Quanto à purificação das amostras, segundo os valores de Abs 260/280 e Abs 260/230, estas amostras podem estar contaminadas não só com proteínas, mas também com fenóis, compostos aromáticos e hidratos de carbono.

A digestão destes produtos amplificados foi realizada com as duas enzimas de restrição já utilizadas anteriormente, a NheI e a EcoRI. A concentração do *pool*, referente à amplificação da sequência de FrpA, digerida e purificada deu origem a um produto com concentração de 12,4 ng/ $\mu$ L, uma relação de Abs 260/280 de 1,73 e Abs 260/230 de 1,70, valores superiores aos obtidos primeiramente. Prosseguiu-se para a clonagem com duas concentrações, 10 ng e 100 ng/ $\mu$ l, para as amostras de FrpA e 100 ng/ $\mu$ l, para as amostras dos fragmentos.

Após as sequências sintéticas serem alinhadas obteve-se os fragmentos 1 e 6. Estes fragmentos sofreram também clonagens, para haver uma junção destes com o pVAX-GFP digerido. De cada placa que resultou do choque térmico, de cada plasmídeo, foram escolhidas 3 colónias, e os respetivos plasmídeos foram purificados e digeridos. Recorreu-se à eletroforese para confirmar se alguma colónia escolhida continha os plasmídeos esperados (pVAX-FrpA-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP), como se pode observar na Figura 18.



**Figura 18** - Placas referentes a colônias com plasmídeos de pVAX-FrpA-GFP com 10 ng (a) e com 100ng (b), pVAX-Frag1-GFP (c) e pVAX-Frag6-GFP (d), com as colônias escolhidas; (e) Gel referente a duas colônias escolhidas de pVAX-Frag1-GFP; (f) Gel referente às três colônias escolhidas de pVAX-Frag6-GFP; T: Tamanho das bandas do Padrão; M: Padrão; A: amostras purificadas; B: amostras purificadas e digeridas com EcoRI; C: amostras purificadas e digeridas com NheI

Na Figura 18 podem observar-se placas resultantes do espalhamento de suspensão de *E. coli* “com centrifugação”, que contêm mais colónias que as outras pois estas placas resultaram de culturas mais concentradas. Quando se trata das colónias que contêm plasmídeos com os fragmentos, não existe grande possibilidade de várias combinações, isto é, ou a colónia tem os plasmídeos com os fragmentos, ou contém os plasmídeos sem fragmentos, ao contrário da placa com as colónias contendo FrpA. Existem muitas mais combinações possíveis e a probabilidade de escolher a colónia certa é menor. Por essa razão, foram escolhidas colónias da placa “sem centrifugação” para os plasmídeos com os fragmentos (1 e 6) e colónias da placa “com centrifugação” para o plasmídeo contendo FrpA.

Quanto ao tamanho das bandas esperadas nas eletroforeses dos plasmídeos com os fragmentos 1 e 6, os dois plasmídeos pretendidos têm o tamanho bastante semelhante, sendo que o plasmídeo pVAX-Frag1-GFP tem 3699 bp e o pVAX-Frag1-GFP tem 3687 bp. Esperar-se-ia que ao serem recortados com uma enzima de restrição (tanto com a NheI como com a EcoRI) a banda correspondente a estes dois plasmídeos ficaria situada entre as bandas 3000 bp e 4000 bp da mistura de padrão. Este facto comprovou-se com as três colónias escolhidas, de cada plasmídeo contendo os fragmentos, porém apenas se mandou sequenciar duas.

Após sequenciação algumas destas colónias demonstraram corresponder aos plasmídeos esperados, tais como as colónias 1 e 2 transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento 1 e as colónias 2 e 3 respeitantes ao fragmento 6. Utilizou-se o *software* ExPASy e verificou-se que ao traduzir as sequências recebidas do sequenciamento estas traduziam os péptidos esperados, tanto os aminoácidos relativos ao fragmento 6 como os aminoácidos relativos à sequência de GFP (o mesmo aconteceu com o fragmento 1). Estes resultados podem ser observados na Figura A 10 do Anexo.

Não foi possível obter colónias transformadas com pVAX-FrpA-GFP, durante o decurso do trabalho experimental. Este facto pode ter ocorrido por diversas razões, não só por haver uma baixa probabilidade de encontrar uma colónia correta nas placas, como explicado anteriormente, mas também à possibilidade de os *primers* utilizados não serem os ideais para a estirpe utilizada, dando origem a uma amplificação errada, a possibilidade de ter ocorrido uma contaminação no crescimento da bactéria Phdp, havendo uma amplificação de

outra sequência (não relacionada à proteína) e a escolha da banda amplificada ter sido a errada.

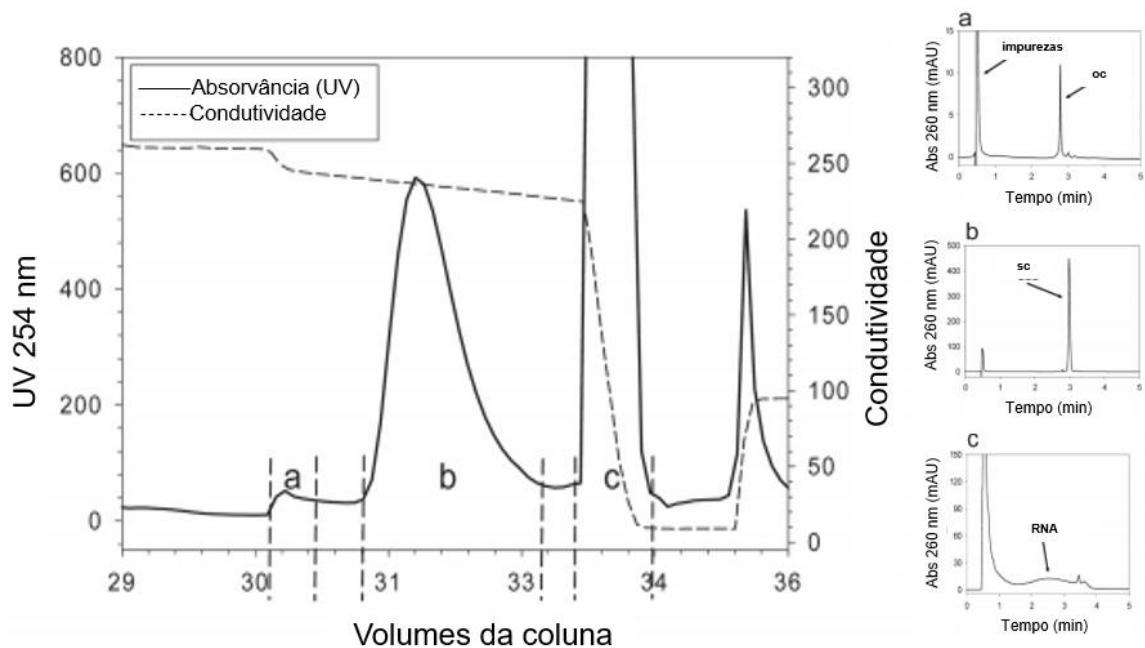
Os *primers* utilizados neste estudo foram realizados a partir da sequência obtida através da base de dados de NCBI (NZ\_MCFX02000016.1), e segundo o BLAST esta proteína tem alinhamento com as estirpes DI211 (KP100338.1) (100% de percentagem de alinhamento, AS-16-0540-1 (CP061857.1) e AS-16-0555-7 (CP061864.1) (90% de percentagem de alinhamento). Para além destas estirpes existem muitas mais, porém não mostram alinhamento com esta proteína. Visto que não se tem a certeza da sequência exata da proteína da estirpe utilizada neste trabalho, pode não ter acontecido um alinhamento total ou parcial com a sequência utilizada para obter os *primers*. Sem um conjunto de *primers* ideais não há formação do produto de PCR desejado (Dieffenbach *et al.*, 1993). Estes *primers* seguem todos os critérios, o que faz com que sejam considerados *primers* ideais. Porém se não forem utilizados na estirpe correta não haverá resultados esperados. No trabalho de Valderrama *et al.* (2019), utilizaram a estirpe DI21 e um *primer forward* muito semelhante, porém com um comprimento maior.

No resultado da PCR (Figura 17), existiam 3 bandas situadas próximas à oitava banda do padrão, com 2000 bp. A proteína pretendida, FrpA, tem aprox. 1983 bp. A primeira banda ampliada situava-se mais próxima à banda do padrão correspondente à de 2500 bp, a segunda banda (do meio) encontrava-se a aprox. da linha da banda do padrão correspondente a 2000 bp, e a terceira banda situava-se um pouco abaixo da banda do padrão de 2000 bp, porém também bastante próxima. Escolheu-se a segunda banda (do meio) por estar mais próxima do marcador de 2000 bp, porém também era possível que a banda de baixo fosse a amplificação que se desejava.

#### 4.4. Purificação de pDNA

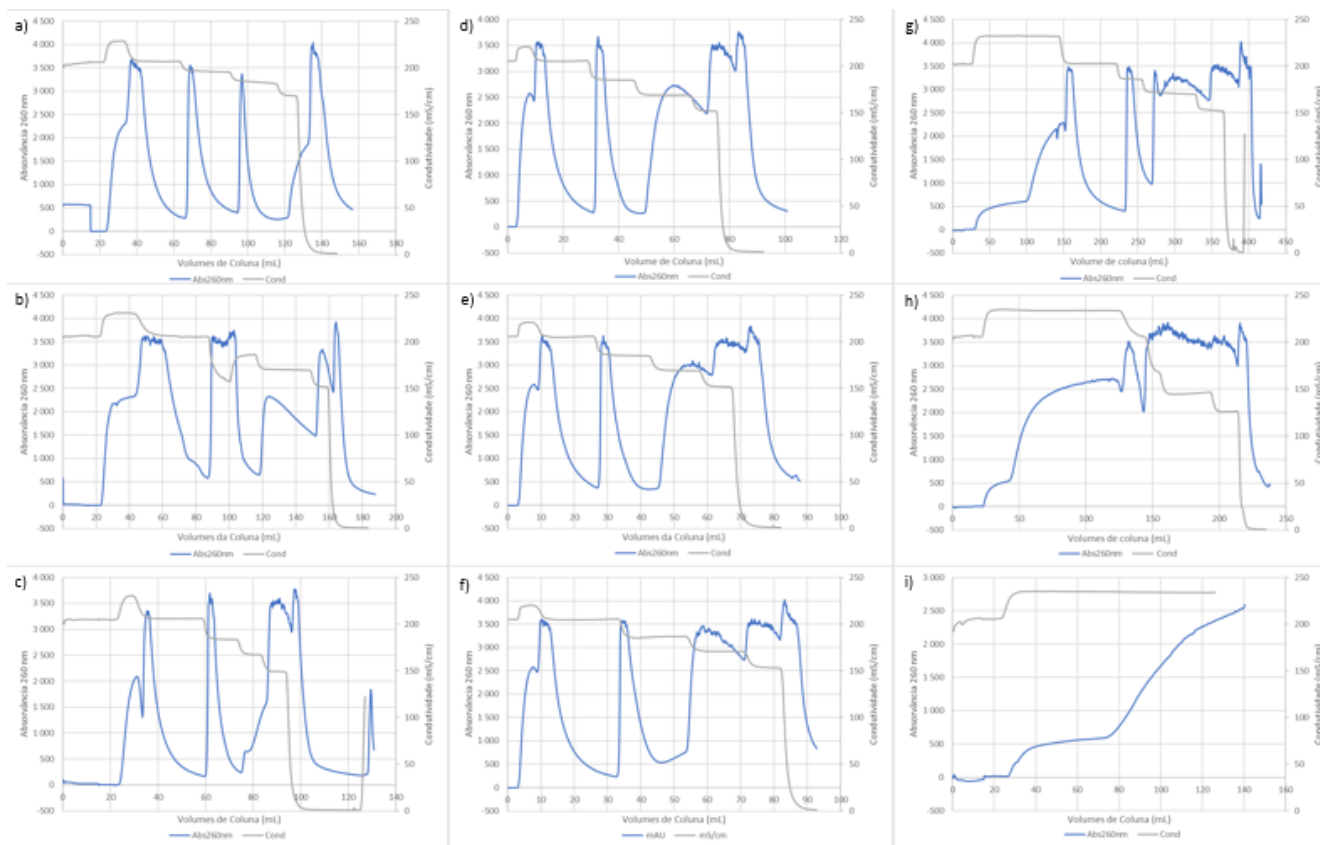
Após a lise celular das estirpes de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas, produziu-se 500 mL para purificação de pDNA. Utilizou-se a cromatografia por interação hidrofóbica para a purificação final dos plasmídeos. A remoção de contaminantes, como proteínas, RNA, endotoxina e gDNA, é possível devida a estes possuírem diferentes graus de hidrofobicidade (Diogo *et al.*, 2000). Esta separação baseia-se na interação das regiões hidrófobas presentes em macromoléculas na solução de carga com ligandos hidrófobos nas membranas cromatográficas (McCue, 2009).

Ao utilizar uma concentração de 2,5 M de sulfato de amónio é possível obter a separação entre impurezas não absorvidas (primeiro pico, escoamento), pDNA de círculo aberto (primeiro pico de eluição claro), pDNA superenrolado (segundo pico de eluição) e RNA (último pico de eluição) (Bo *et al.*, 2013; Raiado *et al.*, 2013), como é possível observar na Figura 19. O pDNA superenrolado (sc) é considerado mais eficaz na transferência de expressão génica comparada ao de círculo aberto (oc) (Cupillard *et al.*, 2005), resultando numa resposta imune mais eficaz. Porém, este facto já foi contrariado (Bergan *et al.*, 2000).



**Figura 19** – Perfis cromatográficos nas etapas de HIC. a) pico de escoamento contendo impurezas não hidrófobas e primeiro pico de HIC que contém pDNA de círculo aberto (oc); b) segundo pico de HIC que contém pDNA superenrolado (sc); c) RNA e outras impurezas. Adaptado de Urthaler *et al.*, 2005

Na Figura 20, em maior parte dos perfis cromatográficos resultantes de HIC, não houve diferença entre os dois picos, do oc e sc, e não se conseguiu distinguir onde um pico de oc acabava e onde o pico relativo ao sc começava, à exceção da primeira corrida com o pVAX-GFP (a).



**Figura 20** – Perfis cromatográficos de HIC de pDNA relativos a pVAX-GFP (a, b e c); pVAX-Frag1-GFP (d, e e f); e pVAX-Frag6-GFP (g, h e i). Absorvância a 260 nm (azul) e condutividade (cinzento) versus volume da coluna

Estes erros podem ser explicados por diversas razões. Existem três etapas bastante importantes após a lise alcalina e antes do HIC: precipitação de pDNA com isopropanol, redissolução do pDNA precipitado num tampão apropriado e precipitação de proteína, RNA e endotoxinas com sulfato de amónio (Trindade *et al.*, 2005). Nem sempre estes 3 requisitos foram mantidos. A precipitação de pDNA com isopropanol e a redissolução do pDNA foi sempre respeitada, porém, inadvertidamente, o tempo de precipitação de impurezas com sulfato de amónio nem sempre foi respeitado. Este último apenas foi respeitado na purificação do plasmídeo pVAX-GFP, atingindo melhores resultados comparando com os anteriores.

Outra razão provável é ter-se excedido a capacidade da membrana. O volume utilizado (cerca de 15 mL por corrida) e/ou a concentração de plasmídeo estaria possivelmente em demasia. Pode ser corrigido por utilizar menos volume em cada corrida, em futuras purificações.

Através da eletroforese foi possível observar que todas as amostras que originaram perfis de HIC não esperados ainda continham RNA. Foi necessário utilizar uma etapa extra em que se fez uma incubação de 15 minutos com RNase (5 mg/mL). Após a HIC todo o RNA deveria estar separado do pDNA, pois o RNA tem cadeia simples, tendo um alto caráter hidrófobo devido à exposição das suas bases, enquanto o pDNA apresentam baixa hidrofobia, porque as suas bases estão protegidas dentro da dupla hélice (Li *et al.*, 2005; Diogo *et al.*, 2001). Isto pode ser explicado pelo facto de que como não se respeitou o tempo necessário na etapa de precipitação de impurezas com sulfato de amónio, houve uma grande quantidade de RNA presente na amostra que foi utilizada no HIC e não houve capacidade, por parte da membrana da cromatografia, para interagir hidrofobicamente com toda a quantidade existente de RNA.

Após concentração e diafiltração dos lotes produzidos de plasmídeos pVAX-GFP, para ser utilizado como controlo, pVAX-Frag6-GFP e pVAX-Frag1-GFP, foram obtidas as quantidades expostas na Tabela XIV.

**Tabela XIV** – Valores de massa total obtida de cada plasmídeo

Plasmídeo	Massa total obtida (µg)	Volume total (µL)
pVAX-GFP	1505	2600
pVAX-Frag6-GFP	5318,1	2500
pVAX-Frag1-GFP	2104,4	800

Para que as concentrações das emulsões recebidas pelos peixes possuíssem a mesma concentração optou-se por ajustar os lotes ao do pVAX-GFP, que continha 1505 µg de plasmídeo, para as vacinas administradas por injeção.

O objetivo seria administrar uma dose de 2 µg  $pDNA/g$  peixe (Kumar *et al.*, 2007) porém, devido aos valores de massa obtidos após purificação serem inferiores aos necessários para atingir esta dose, teve de se utilizar uma dose de 1,2 µg  $pDNA/g$  peixe. Em outros trabalhos, em que testaram a eficiência de vacinas de DNA em trutas-arco íris, utilizaram uma dose inferior, 1,92  $pDNA/g$  peixe (Lorenzen *et al.*, 1998) e 0,125  $pDNA/g$  peixe (Corbeil *et al.*, 2000), como descrito na Tabela A VIII, do Anexo. No trabalho de Lorenzen *et al.* (1998) atingiram valores de RPS de 94% e 97%, dependendo do tratamento, e no estudo de Corbeil *et al.* (2000) obtiveram um valor de RPS de 50±3% por injeção intraperitoneal e 100% por injeção intramuscular.

#### 4.5. Síntese e Encapsulamento de Nanopartículas de CS-TPP

Num outro trabalho foram testados vários volumes e várias concentrações diferentes para a síntese de nanopartículas de CS-TPP. A amostra que demonstrou melhor resultados foi designada LC2 por ter usado quitosano de cadeia longa (LC) (Fonseca, 2020). A caracterização das nanopartículas resultante está exposta na Tabela XV.

**Tabela XV** – Valores de tamanho (*Z-average*), Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta, após síntese de nanopartículas de CS-TPP. Retirado de Fonseca, 2020

Nanopartículas	<i>Z-average</i> (d. nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
LC2	200	0,285	40±4

Esta formulação foi considerada a melhor devido ao facto de apresentar um dos menores diâmetros (200 nm), valor de PDI baixo, sendo este menor que 0,5 (padrão altamente monodisperso) e potencial zeta positivo, querendo dizer que as cargas superficiais das nanopartículas podem interagir com o pDNA, tendo este uma carga negativa.

O processo de Fonseca (2020), foi apenas otimizado para 1 mL de suspensão coloidal de nanopartículas, para uma quantidade de 15,8 µL pDNA. Neste trabalho era necessário 828 µL de pDNA, por isso, o processo de complexação foi repetido 53 vezes. Foi necessário fazer a junção de 6 soluções coloidais resultantes de 5 mL de quitosano (3 mg/mL) mais 2 mL de TPP (0,75 mg/mL). Os valores das medições destas 6 frações estão expostos na Tabela XVI.

**Tabela XVI** – Valores médios de tamanho (*Z-average*), Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta obtidos após síntese de nanopartículas de CS-TPP

Nanopartículas	<i>Z-average</i> (d. nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1	164,1	0,199	35
2	155,4	0,196	32
3	166,4	0,217	35
4	192,1	0,239	38
5	184,2	0,230	29
6	161,3	0,187	32

Em comparação com os dados exibidos anteriormente, foram obtidas nanopartículas com menores diâmetros, PDI e Potencial Zeta. Apesar do procedimento ter sido idêntico, existem fatores que não foram controlados, como a temperatura ambiente.

Nanopartículas usadas como veículo de entrega de fármacos, por definição, têm um diâmetro que varia de 10 a 1000 nm de (Mudshinge *et al.*, 2011). Todas as nanopartículas

sintetizadas neste trabalho se encontravam dentro destes valores, podendo ser consideradas, de facto, como nanopartículas.

Apesar de valores menores de índice de polidispersidade que 0,5 serem geralmente considerados aceitáveis, o intervalo entre 0,1 e 0,25 é melhor pois indica que a distribuição de tamanhos no conjunto de partículas é reduzida, significando também que em suspensão não são expectáveis impurezas particuladas nem agregados de nanopartículas (Cho *et al.*, 2013). Todos os resultados obtidos através das medições de PDI estão compreendidos no intervalo de 0,1 a 0,5, ao contrário do trabalho anterior de Fonseca (2020) utilizando o mesmo procedimento e as mesmas concentrações de quitosano e de TPP (0,285). Estes valores podem significar que a suspensão está quase monodispersa, sem impurezas particuladas e não existiu agregação das nanopartículas durante o processo de síntese.

Quanto aos valores de potencial zeta demonstraram ser menores quando comparados com o trabalho que foi utilizado como referência; porém, os valores continuaram positivos, podendo considerar que terão o mesmo efeito na encapsulação com pDNA, pois permitem que haja uma interação entre a superfície das nanopartículas (carga positiva) com o pDNA (carga negativa).

Fonseca (2020), após encapsulação do pDNA, obteve os seguintes resultados expostos na Tabela XVII para o plasmídeo pVAX-GFP.

**Tabela XVII** – Valores de tamanho (*Z-average*), Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta, após encapsulamento. Retirado Fonseca, 2020

Nanopartículas	Plasmídeo	<i>Z-average</i> (d. nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
LC2	pVAX-GFP (1)	171	0,172	41±4
	pVAX-GFP (2)	141	0,132	39±5

Utilizando o mesmo procedimento, e respeitando os volumes e concentrações, obtiveram-se os seguintes valores, expressos na Tabela XVIII. Apenas foram realizadas medições a uma amostra misturada com cada uma das soluções coloidais das nanopartículas.

**Tabela XVIII** - Valores médios de tamanho (*Z-average*), Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta, após encapsulamento obtidos

Nanopartículas	Solução com pDNA	<i>Z-average</i> (d. nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1	1	120	0,260	21
2	11	110	0,246	19
3	24	125	0,227	18
4	34	152	0,193	10
5	45	120	0,250	18
6	55	140	0,274	18

Ao adicionar a solução de pDNA com 15,8 µg à solução coloidal LC2, tanto o diâmetro como os valores de PDI das nanopartículas diminuíram, e os valores de potencial zeta mantiveram-se. Tanto no trabalho realizado por Fonseca (2020) quer neste trabalho houve uma diminuição do tamanho médio das nanopartículas com a adição de pDNA, como era esperado pois ao inserir um componente com carga negativa promove uma contração da cadeia de polímero carregada positivamente (Gaspar *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2002). Houve um aumento dos valores de PDI, ao contrário do trabalho de Fonseca (2020). Alguns destes valores continuaram abaixo do limite, é o caso das soluções coloidais feitas com nanopartículas 2,3, 4 e 5. Os valores das soluções coloidais que utilizaram as nanopartículas 1 e 6 demonstraram PDI maior que 0,25, porém menores que 0,5, sendo consideradas aceitáveis. Quanto á diminuição do potencial zeta esta pode ser explicada por não ter ocorrido uma competição do pDNA com o TPP, ao contrário do que aconteceu em trabalhos anteriores. Pode ter acontecido menor substituição do TPP por pDNA nas nanopartículas. Como tanto o TPP como o pDNA têm carga negativa, tal induziu uma diminuição do valor de potencial zeta.

Para verificar a eficiência de encapsulação deveria ter sido efetuado um gel de agarose, mas não foi possível devido a questões de tempo. Porém, como as nanopartículas cumprem todos os requisitos estabelecidos pelos distintos testes de qualidade, e a ligação foi realizada segundo Fonseca (2020), considerou-se que a encapsulação se realizou com uma eficiência aceitável.

#### 4.6. Avaliação da eficácia das vacinas de DNA

Os robalos foram vacinados por injeção intraperitoneal (i.p.) e foram efetuados cinco tratamentos, três tratamentos suplementados com adjuvante Montanide ISA 763 A VG, contendo os plasmídeos pVAX-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP, o quarto tratamento contendo o plasmídeo pVAX-Frag6-GFP suplementado com adjuvante Montanide Gel PR 02 e por último, os peixes de controlo, injetados com PBS estéril. Após

30 dias da vacinação os peixes foram infetados com Phdp C4 para avaliar a eficácia das vacinas estudadas.

Foi observada mortalidade no período de imunização, como se pode observar na Tabela XIX. Esta mortalidade acrescida ocorreu nos peixes vacinados com pVAX-GFP (T1) e pVAX-Frag1-GFP suplementadas com adjuvante Montanide ISA 763 A VG (T2), que partilhavam a mesma SUMP. Houve apenas 1 peixe que morreu nos tratamentos que continham o plasmídeo pVAX-Frag6-GFP suplementado tanto com Montanide ISA 763 A VG, como com Montanide Gel PR 02. Esta mortalidade representou 12% dos peixes vacinados com T1 e 26% dos peixes vacinados com T2.

**Tabela XIX –** Mortalidade registada em cada tanque durante o período após-vacinação

Tratamento	Percentagem de mortalidade (%)
Controlo (PBS)	0,00
T1 - Vacina pVAX-GFP com Montanide ISA 763 A VG	12,32
T2 - Vacina pVAX-Frag1-GFP com Montanide ISA 763 A VG	25,64
T3 - Vacina pVAX-Frag6-GFP com Montanide ISA 763 A VG	1,28
T4 - Vacina pVAX-Frag6-GFP com Montanide Gel PR 02	1,28

As mortes ocorridas durante o tempo de imunização não podem ser explicadas pelos fatores ambientais pois a temperatura manteve-se nos 18-19°C, sendo o intervalo de temperatura ótimo para *D. labrax* entre 20-25°C (Vinagre *et al.*, 2012), o pH foi mantido a aprox. 8, a salinidade a aprox. 32 ppt e os valores de oxigénio superiores a 80%, o que são valores normais de criação de robalos juvenis (Lemarié *et al.*, 2004), não fazendo com que sejam valores limitantes do crescimento nem propícios a mortalidade. Geralmente, os efeitos secundários do uso de adjuvantes são inevitáveis. Os peixes, vacinados com adjuvante Montanide ISA 763 A VG, perderam o apetite, alimentando-se muito menos comparando com peixes vacinados com o adjuvante Montanide Gel PR 02 e vacinados com PBS (controlo). Este facto pode ser explicado por existência de aderências e lesões causadas por injeção que levam a uma redução do consumo de ração e inibição do crescimento (Berg *et al.*, 2006), conseqüentemente levando a um aumento da mortalidade. No estudo de Li *et al.* (2020), ao estudarem diversos adjuvantes concluíram que o adjuvante Marcol 52 induzia proteção eficaz, bastante semelhante a outros adjuvantes como Montanide ISA 763 A VG, porém causava menos efeitos secundários, fazendo deste uma alternativa viável.

Tal como ocorrido no estudo de Spinos *et al.* (2017), foram observados macroscopicamente resíduos de adjuvante externos aos órgãos (Figura 21 a, circundado a vermelho) e gordura ao redor dos intestinos em alguns peixes sacrificados. No estudo de Xu *et al.* (2019), também se verificou que quando os peixes foram vacinados na cavidade peritoneal, o resíduo de adjuvante foi reduzindo gradualmente, sugerindo que o adjuvante poderia ser absorvido e metabolizado lentamente pelos peixes, esta redução de adjuvante também foi verificada, a olho nu, no estudo presente. Foi observado também uma bexiga natatória hiper-insuflada e fezes e intestinos verdes, exposto na Figura 21.

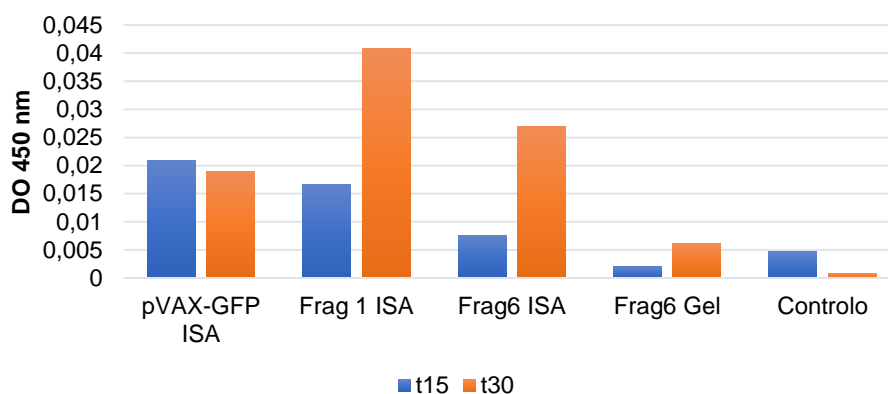


**Figura 21** - Robalos juvenis com a) bexiga natatória hiper-insuflada e resíduo de adjuvante externo aos órgãos (circundado a vermelho) e b) intestino com tonalidade verde, ao final de 30 dias após vacinação

A bexiga natatória dos peixes é um órgão hidrostático, regulador da flutuabilidade, que se desenvolve durante a ontogénese larval inicial a partir da parede dorsal do trato digestivo. A insuflação correta da bexiga natatória é essencial para o controle funcional da flutuabilidade, capacidade de natação e sucesso na alimentação (Peruzzi *et al.*, 2007). A maior parte dos peixes vacinados com vacinas suplementadas com Montanide ISA sofreram uma hiperinsuflação da bexiga natatória, diminuindo a capacidade de natação e o sucesso na alimentação. Esta pode ter sido uma das razões para explicar a mortalidade apenas nos peixes vacinados com este adjuvante. Não existe bibliografia que justifique este facto, porém pode ser um dos efeitos secundários deste adjuvante.

No estudo de Richards *et al.* (2003), também se verificou que os ratos vacinados oralmente com GFP produziam fezes verdes. Para verificar se de facto este evento se deve à tradução de GFP nos peixes vacinados com o adjuvante Montanide ISA seria necessário proceder a um ensaio de fluorescência. Se a proteína GFP for de facto traduzida, esta é excretada, sendo este facto possível. Se a proteína GFP está a ser traduzida então podemos considerar que toda a sequência está a ser traduzida, conferindo imunidade ao peixe.

Segundo os resultados do ensaio ELISA, os peixes injetados com vacinas suplementadas com adjuvante Montanide ISA desenvolveram anticorpos, ao contrário dos peixes vacinados com vacina suplementada com Montanide Gel, como é possível observar na Figura 22.

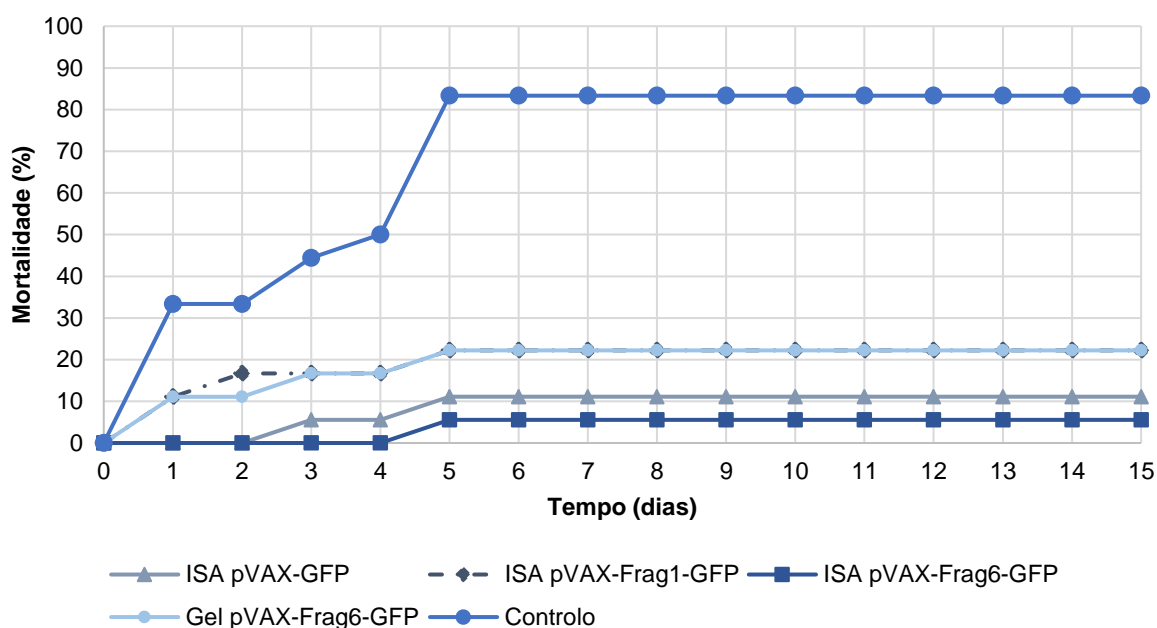


**Figura 22** – Anticorpos presentes no soro de peixes tratados com vacinas contendo pVAX-GFP, pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP, suplementadas com adjuvante Montanide ISA 763 A VG e adjuvante Montanide Gel 02 PR

Nenhum dos tratamentos apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Observou-se nos peixes tratados com a vacina Frag6 e Frag1 suplementada com Montanide ISA um aumento de anticorpos no período de tempo de t15 a t30, havendo um maior aumento nos peixes vacinados com a vacina contendo o Frag1; no entanto para os peixes vacinados com pVAX-GFP sofreram uma pequena diminuição, mas foi possível verificar alguma proteção. Houve um pequeno aumento de anticorpos quando utilizada a vacina Montanide Gel, porém não significativa. Segundo a análise estatística o tempo (t15 e t30) não influenciou nenhum dos valores de anticorpos ( $p > 0,05$ ).

O adjuvante Montanide ISA juntamente com o vetor pVAX-GFP estimulou o aparecimento de anticorpos, tal como nos estudos de Jaafar *et al.* (2015), e de Soltani *et al.* (2016). Estes investigadores sugeriram que o adjuvante induz uma estimulação do sistema inato e humoral com um aumento do número de células B que conduz a uma alta produção de IgM e de anticorpos. A presença de uma elevada quantidade de anticorpos permite a inativação mais rápida e imediata do patógeno durante a infeção proporcionando maior proteção.

Os peixes com pVAX-Frag6-GFP foram os que obtiveram uma menor mortalidade (Figura 23).



**Figura 23** – Mortalidade ao longo do período de infecção com Phdp

Não houve mortalidade de peixes não infectados, injetados com PBS e mantidos nas mesmas condições de infecção, querendo dizer que toda a mortalidade ocorrida é relacionada apenas com a infecção. Os resultados de PCR (Figura A 1, do Anexo) demonstram que ocorreu amplificação de ambos os genes significando que Phdp foi detetada nos órgãos amostrados, sugerindo que a bactéria terá sido o fator responsável pelo comportamento moribundo apresentado pelos peixes.

Não era esperado que houvesse mortalidade logo após as 24 horas de infecção, o que pode ser devido à dose do patógeno utilizada ser muito elevada para robalos. Segundo Mancuso & Zaccone (2016), o LD50 calculado para robalos com cerca de 25 g é de  $3,1 \times 10^7$  células/mL. Também no estudo de Do Vale *et al.* (2005), a dose de *Photobacterium damsela* subsp. piscicida utilizada na infecção de robalos foi de  $2.1 \pm 0.2 \times 10^7$  UFC. A dose de infecção utilizada neste trabalho foi maior.

OS valores de RPS após 2 semanas de infecção com Phdp podem ser observados na Tabela XX.

**Tabela XX** – Valores de RPS após 2 semanas de infecção

Tratamento	RPS (%)
Controlo (PBS)	0,0
T1 – Vacina pVAX-GFP com Montanide ISA	86,6
T2 – Vacina pVAX-Frag1-GFP com Montanide ISA	73,3
T3 – Vacina pVAX-Frag6-GFP com Montanide ISA	93,3
T4 – Vacina pVAX-Frag6-GFP com Montanide Gel	73,3

Obteve-se uma maior RPS nos peixes vacinados pVAX-Frag6-GFP suplementado com Montanide ISA (93%), seguido por peixes vacinados com pVAX-GFP suplementados com Montanide ISA (86%), e por fim, mas com resultados elevados também, peixes vacinados com pVAX-Frag1-GFP suplementado com Montanide ISA e peixes vacinados com pVAX-Frag6-GFP suplementado com Montanide Gel (73%). Ao utilizar o adjuvante Montanide ISA 763 A VG, o autor Xu *et al.*, 2019, obtiveram um RPS de 75% após 4 semanas, com a utilização de uma vacina de bactéria inativada contra *V. harveyi*. Existe uma vacina comercial, com o nome de ICTHIOVAC-LG LACTOCOCOSIS TRUCHA ([https://mri.cts-mrp.eu/human/downloads/ES\\_V\\_0171\\_001\\_FinalSPC.pdf](https://mri.cts-mrp.eu/human/downloads/ES_V_0171_001_FinalSPC.pdf)), que utiliza este mesmo adjuvante, destinada para trutas com cerca de 20g contra *Lactococcus garvieae* e confere um RPS superior a 75%. Comparando a uma vacina comercial contra *Photobacterium damsela* subs. *piscicida*, feita com bactérias inativadas, referida na Tabela I da Secção 1, foi possível obter valores de RPS semelhantes e superiores aos documentados por essa vacina (80 a 90%) (Magariños *et al*, 1994c). Comparando também com outro tipo de vacinas expostas na mesma Tabela foi possível observar que os valores de RPS neste estudo foram bastante superiores.

Apesar da vacina com pVAX-Frag6-GFP suplementada com Montanide Gel ter obtido um valor elevado de RPS (73%) isto não se refletiu nos valores de títulos de anticorpos. Não houve deteção de anticorpos nas placas de ELISA, em nenhum dos tempos de amostragem. Segundo a empresa *Seppic*, este adjuvante foi projetado para assegurar uma libertação lenta da vacina, devido às propriedades de adsorção do polímero, melhorando o recrutamento do sistema imunológico inato. Neste estudo, os peixes vacinados com este adjuvante não obtiveram títulos de anticorpos, porém de facto devem ter melhorado o sistema imunológico inato fazendo com que fosse possível a sobrevivência à infecção, conferindo na mesma a proteção eficaz.

## 5. Conclusão e Perspetivas Futuras

O processo de construção dos plasmídeos foi difícil e moroso. Houve vários passos críticos, desde a escolha dos fragmentos, o desenho dos *primers*, o processo de clonagem e choque térmico e a escolha das colónias de *E. coli* DH5 $\alpha$  pretendidas que possivelmente continham o plasmídeo alvo. Porém, foi possível obter o plasmídeo pVAX-Frag1-GFP e pVAX-Frag6-GFP.

Um dos objetivos era construir também um plasmídeo com a sequência completa da proteína-alvo, pVAX-FrpA-GFP, porém não foi possível obter este vetor. Este facto pode ter ocorrido por diversas razões, como: haver uma baixa probabilidade de encontrar uma colónia correta nas placas, a possibilidade de ter ocorrido uma contaminação no crescimento da bactéria Phdp, havendo uma amplificação de outra sequência (não relacionada à proteína) e a banda escolhida para ser amplificada ter sido a incorreta.

Houve bastante dificuldade na purificação por HIC, obtendo-se gráficos bastante diferentes do que o suposto. A precipitação de pDNA com isopropanol e a redissolução do pDNA foi sempre respeitada, porém, inadvertidamente, o tempo de precipitação de impurezas com sulfato de amónio nem sempre foi respeitado, fazendo com que houvesse uma grande quantidade de RNA presente na amostra que foi utilizada no HIC. Este último apenas foi respeitado na purificação do plasmídeo pVAX-GFP, atingindo melhores resultados comparando com os anteriores. Outra razão provável é ter-se excedido a capacidade da membrana. O volume utilizado (cerca de 15 mL por corrida) e/ou a concentração de plasmídeo estaria possivelmente em demasia. Pode ser corrigido por utilizar menos volume em cada corrida, em futuras purificações.

Devido a estes erros no procedimento, obteve-se uma quantidade total de cada plasmídeo menor do que a esperada, sendo que só foi possível administrar 1,2  $\mu\text{g}$  pDNA/g<sub>peixe</sub>, em vez da dose pretendida de 2  $\mu\text{g}$  pDNA/g<sub>peixe</sub>.

Todas as nanopartículas sintetizadas neste trabalho, para serem utilizadas na encapsulação de DNA, encontravam-se dentro dos valores ótimos de tamanho, potencial zeta e PDI. O encapsulamento também foi considerado como sucesso. Estas nanopartículas foram utilizadas para outra dissertação de outra aluna e Mestrado de Aquacultura.

Houve alguma mortalidade nos peixes vacinados com pVAX-Frag1-GFP (T2) e pVAX-GFP (T1), vacinas suplementadas com o adjuvante Montanide ISA, durante o período de imunização. Chegou-se à conclusão de que esta mortalidade pode ter sido resultado de efeitos secundários do próprio adjuvante.

Estes peixes, vacinados com T1 e T2, perderam o apetite após serem vacinados, alimentando-se muito menos comparando com os peixes vacinados com a vacina suplementada com o adjuvante Montanide Gel (T4). Este facto pode ser explicado por ter ocorrido uma hiperinsuflação das bexigas natatórias. Foi observado nestes peixes que as suas bexigas natatórias estavam hiperinsufladas, isto faz com que haja uma diminuição da capacidade de natação e, conseqüentemente, do sucesso na alimentação. Não foi encontrada bibliografia que justifique este facto, porém pode ser um dos efeitos secundários deste adjuvante, seriam necessários mais estudos sobre estes.

Para que não houvesse estes efeitos secundários, poder-se-ia utilizar outro adjuvante, como Marcol 52, em que foi provado que produz uma proteção eficaz, bastante semelhante a outros adjuvantes como Montanide ISA, porém causou menos danos.

Observou-se também fezes e intestinos verdes em peixes vacinados com T1, T2 e T3 (pVAX-Frag6-GFP), vacinas suplementadas com Montanide ISA. Este facto pode ser explicado pela excreção da proteína GFP, porém seria necessário proceder a um ensaio de fluorescência para confirmar esta afirmação.

Com os resultados dos ensaios ELISA indireto, concluiu-se que houve um aumento de anticorpos nos peixes vacinados com vacinas suplementadas com o adjuvante Montanide ISA. A vacina com pVAX-Frag6-GFP suplementada com Montanide ISA obteve um maior valor de RPS (93%). Houve um aumento muito pequeno de valor de anticorpos no tratamento 4 (Vacina suplementada com Montanide Gel) comparativamente aos outros tratamentos suplementados com Montanide ISA, podendo ser explicado pelo próprio adjuvante Montanide ISA, induzir uma estimulação geral e alta de células B, produzindo uma alta produção de IgM, enquanto o adjuvante Montanide Gel melhora o sistema imunológico inato. Ao comparar com os resultados do RPS os peixes vacinados com Montanide Gel também demonstraram valores elevados de sobrevivência (73%), querendo dizer que, apesar de estimular mais o sistema imunológico inato e não o adaptativo conferiu a proteção desejada.

Tendo em conta que muitas vacinas comerciais contra bactérias conferem 75% de RPS, os valores obtidos neste trabalho foram bastante positivos.

Existem outros testes que se poderiam ter efetuado para verificar a eficiência destas vacinas. A bactéria Phdp tem a capacidade de retirar ferro a hemoglobinas, transportado pelo sideróforo piscibactina, que por sua vez é transportado pela proteína FrpA. A Phdp é uma proteína de membrana fixa na superfície externa, logo a vacina fará com que o hospedeiro destrua o agente infetante (por exemplo por fagocitose) não havendo maneira da bactéria retirar o ferro aos hospedeiros, mantendo-os saudáveis. Logo uma das maneiras de verificar a eficiência dos peixes seria verificar a quantidade de ferro no peixe, e a quantidade de hemoglobinas, com a contagem total de células sanguíneas e quantificação de hemoglobinas no sangue (utilizando o leitor de placas).

Em trabalhos futuros, utilizaria mais dois controlos, peixes vacinados apenas com os adjuvantes, Montanide ISA 763 A VG e Montanide Gel 02 PR, e mais um controlo positivo, peixes vacinados com alguma vacina comercial, com RPS e valores de títulos de anticorpos já estudados, para que haja uma melhor comparação.

## 6. Referências Bibliográficas

- Acosta, F., Galarreta, C. M. R., Ellis, A. E., Díaz, R., Gómez, V., Padilla, D., & Real, F. (2004). Activation of the nitric oxide response in gilthead seabream after experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(5), 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.09.010>
- Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Na, J., Bravo, J., Grasso, V., & Real, F. (2009). Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*, 32(6), 535–541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01023.x>
- Amagliani, G., E. Omiccioli, F. Andreoni, R. Boiani, I. Bianconi, R. Zaccone, M. Mancuso, and M. Magnani. 2009. “Development of a Multiplex PCR Assay for *Photobacterium Damsela* Subsp. *Piscicida* Identification in Fish Samples.” *Journal of Fish Diseases* 32(8):645–53. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01027.x.
- Andreoni, F., Amagliani, G., & Magnani, M. (2016). Selection of vaccine candidates for fish pasteurellosis using reverse vaccinology and *in vitro* screening approach. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1404, pp. 181–192). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3389-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3389-1_12)
- Andreoni, F., Boiani, R., Serafini, G., Amagliani, G., Dominici, S., Riccioni, G., Zaccone, R., Mancuso, M., Scapigliati, G., & Magnani, M. (2013). Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine*, 31(5), 820–826. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.064>
- Arama, C., Giusti, P., Boström, S., Dara, V., Traore, B., Dolo, A., Doumbo, O., Varani, S., & Troye-Blomberg, M. (2011). Interethnic differences in antigen-presenting cell activation and TLR responses in malian children during *Plasmodium falciparum* Malaria. *PLoS ONE*, 6(3), e18319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018319>
- Arca, H. Ç., Günbeyaz, M., & Şenel, S. (2009). Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. *Expert Review of Vaccines*, 8(7), 937–953. <https://doi.org/10.1586/na.09.47>
- Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Diaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C., Magariños, B., Toranzo, A. E., & Moriñigo, M. A. (2005). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28(1), 33–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00597.x>
- Artursson, P., Tuulikki, L., Davis, S. S., & Illum, L. (1994). Effects of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). In *Pharmaceutical Research* (Vol. 11, Issue 9, pp. 1358–1361). <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1018967116988>
- Athanasopoulou, F., & Bitchava, K. (2010). Main pathological conditions in Mediterranean marine finfish culture. *Recent Advances in Aquaculture*, 149–201.
- Atherton, M. J., Morris, J. S., McDermott, M. R., & Lichty, B. D. (2016). Cancer immunology and canine malignant melanoma: A comparative review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 169, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.11.003>
- Austin, B., & Austin, D. A. (1989). *Bacterial fish pathogen: Disease in farmed and wild fish*.
- Azzoni, A. R., Ribeiro, S. C., Monteiro, G. A., & Prazeres, D. M. F. (2007). The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *The Journal of Gene Medicine*, 9(5), 392–402. <https://doi.org/10.1002/jgm.1031>
- Bakopoulos, V., Adams, A., & Richards, R. H. (1995). Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases*, 18(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb01260.x>

- Bakopoulos, V., Nikolaou, I., Kalovyryna, N., Amirali, E., Kokkoris, G., & Spinos, E. (2015). Prevention of fish photobacteriosis. Comparison of the efficacy of intraperitoneally administered commercial and experimental vaccines. *Mediterranean Marine Science*, 16(2), 385. <https://doi.org/10.12681/mms.1051>
- Baptista, T., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (1996). First occurrence of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* [*Pagrus aurata*]). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16(3), 92–95. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19962213541>
- Barnes, A. C., Dos Santos, N. M. S., & Ellis, A. E. (2005). Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Developments in Biologicals*, 121(9), 75–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962471>
- Berg, A., Rødseth, O., Tangerås, A., & Hansen, T. (2006). Time of vaccination influences development of adhesions, growth and spinal deformities in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69(2–3), 239–248. <https://doi.org/10.3354/dao069239>
- Bergan, D., Galbraith, T., & Sloane, D. L. (2000). Gene transfer *in vitro* and *in vivo* by cationic lipids is not significantly affected by levels of supercoiling of a reporter plasmid. *Pharmaceutical Research*, 17(8), 967–973. <https://doi.org/10.1023/A:1007531405796>
- Bo, H., Wang, J., Chen, Q., Shen, H., Wu, F., Shao, H., & Huang, S. (2013). Using a single hydrophobic-interaction chromatography to purify pharmaceutical-grade supercoiled plasmid DNA from other isoforms. *Pharmaceutical Biology*, 51(1), 42–48. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.703678>
- Bolhassani, A., Javanzad, S., Saleh, T., Hashemi, M., Aghasadeghi, M. R., & Sadat, S. M. (2014). Polymeric nanoparticles. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(2), 321–332. <https://doi.org/10.4161/hv.26796>
- Bonin, R. F., Chapeaurouge, A., Perales, J., Da Silva, J. G., Do Nascimento, H. J., Assef, A. P. D. C., & Senna, J. P. M. (2014). Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 8(11–12), 916–923. <https://doi.org/10.1002/prca.201300133>
- Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T. L., Matten, W. T., McGinnis, S. D., Merezhuk, Y., Raytselis, Y., Sayers, E. W., Tao, T., Ye, J., & Zaretskaya, I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W29–W33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt282>
- Boukhalfa, H., & Crumbliss, A. L. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals*, 15(4), 325–339. <https://doi.org/10.1023/A:1020218608266>
- Brazeau, M. D., & Friedman, M. (2015). The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrates. *Nature*, 520(7548), 490–497. <https://doi.org/10.1038/nature14438>
- Brumbaugh, A. R., Smith, S. N., & Mobley, H. L. T. (2013). Immunization with the yersiniabactin receptor, FyuA, protects against pyelonephritis in a murine model of urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 81(9), 3309–3316. <https://doi.org/10.1128/IAI.00470-13>
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917–1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical Research*, 14(11), 1431–1463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1012128907225>

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, *10*(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Chiu, C.-C., Moore, P. B., Shinoda, W., & Nielsen, S. O. (2009). Size-dependent hydrophobic to hydrophilic transition for nanoparticles: A molecular dynamics study. *The Journal of Chemical Physics*, *131*(24), 244706. <https://doi.org/10.1063/1.3276915>
- Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*, *10*(6), 2093–2110. <https://doi.org/10.1021/mp300697h>
- Clayton, K. N., Salameh, J. W., Wereley, S. T., & Kinzer-Ursem, T. L. (2016). Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, *10*(5), 054107. <https://doi.org/10.1063/1.4962992>
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(11), 3240–3244. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240>
- Corbeil, S., Kurath, G., & LaPatra, S. E. (2000). Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: Efficacy of various routes of immunisation. *Fish & Shellfish Immunology*, *10*(8), 711–723. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0286>
- Costa, J. Z., McCarthy, Ú., Perez, O., Ramos, E., Rodriguez, M., Monterroso, O., & Riera, R. (2017). Occurrence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in sea-sage farmed meagre (*Argyrosomus regius*) in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Thalassas: Na International Journal of Marine Sciences*, *33*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s41208-017-0022-5>
- Csaba, N., Köping-Höggård, M., & Alonso, M. J. (2009). Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *382*(1–2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.028>
- Cupillard, L., Juillard, V., Latour, S., Colombet, G., Cachet, N., Richard, S., Blanchard, S., & Fischer, L. (2005). Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine*, *23*(16), 1910–1916. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.018>
- Dauphin, G., & Zientara, S. (2007). West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*, *25*(30), 5563–5576. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.005>
- Davis, S. S. (2006). The use of soluble polymers and polymer microparticles to provide improved vaccine responses after parenteral and mucosal delivery. *Vaccine*, *24*(SUPPL. 2), S7–S10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.102>
- Del Castillo, C. S., Jang, H. B., Hikima, J.-I., Jung, T. S., Morii, H., Hirono, I., Kondo, H., Kurosaka, C., & Aoki, T. (2013). Comparative analysis and distribution of pP9014, a novel drug resistance IncP-1 plasmid from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *42*(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.02.027>
- DeLong, R. K., & Curtis, C. B. (2017). Toward RNA nanoparticle vaccines: Synergizing RNA and inorganic nanoparticles to achieve immunopotentiality. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *9*(2), e1415. <https://doi.org/10.1002/wnan.1415>
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, *23*(4), 566–573. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.965.1253&rep=rep1&type=pdf>
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A., Monteiro, G. A., Martins, S. A. M., Ferreira, G. N. M., & Prazeres, D. M. F. (2000). Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology and Bioengineering*, *68*(5), 576–583. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000605\)68:5<576::AID-BIT13>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000605)68:5<576::AID-BIT13>3.0.CO;2-5)

- Diogo, M. M., Ribeiro, S. C., Queiroz, J. A., Monteiro, G. A., Tordo, N., Perrin, P., & Prazeres, D. M. F. (2001). Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *The Journal of Gene Medicine*, 3(6), 577–584. <https://doi.org/10.1002/jgm.218>
- Do Vale, A., M. T. Silva, N. M. S. Dos Santos, D. S. Nascimento, P. Reis-Rodrigues, C. Costa-Ramos, A. E. Ellis, and J. E. Azevedo. 2005. "AIP56, a Novel Plasmid-Encoded Virulence Factor of *Photobacterium damsela* Subsp. *Piscicida* with Apoptogenic Activity against Sea Bass Macrophages and Neutrophils." *Molecular Microbiology* 58(4):1025–38. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04893.x.
- Dodane, V., Khan, M. A., & Merwin, J. R. (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *International Journal of Pharmaceutics*, 182(1), 21–32. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00030-7)
- Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenziger, J., & Walker, C. M. (1996). Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), 8578–8583. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8578>
- Elkamel, A. A., Hawke, J. P., Henk, W. G., & Thune, R. L. (2003). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(2), 175–183. <https://doi.org/10.1577/H03-006>
- Embregts, C. W. E., & Forlenza, M. (2016). Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 118–137. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.024>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Molecular Immunology*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(71\)90063-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(71)90063-0)
- Fernandez-Alonso, M., Alvarez, F., Estepa, A., Blasco, R., & Coll, J. M. (1999). A model to study fish DNA immersion vaccination by using the green fluorescent protein. *Journal of Fish Diseases*, 22(3), 237–241. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00161.x>
- Ferraro, B., Morrow, M. P., Hutnick, N. A., Shin, T. H., Lucke, C. E., & Weiner, D. B. (2011). Clinical applications of DNA vaccines: Current progress. *Clinical Infectious Diseases*, 53(3), 296–302. <https://doi.org/10.1093/cid/cir334>
- Fioretti, D., Iurescia, S., & Rinaldi, M. (2013). Recent advances in design of immunogenic and effective naked DNA vaccines against cancer. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 9(1), 66–82. <https://doi.org/10.2174/1574891X113089990037>
- Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrg2703>
- Fonseca, C. A. (2020). *Development of an oral pDNA vaccine against Vibrio species*. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa
- Fuglem, B., Jirillo, E., Bjerkås, I., Kiyono, H., Nochi, T., Yuki, Y., Raida, M., Fischer, U., & Koppang, E. O. (2010). Antigen-sampling cells in the salmonid intestinal epithelium. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(7), 768–774. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.02.007>
- Fukuda, Y., & Kusuda, R. (1981). Acquired antibody against pseudotuberculosis in yellowtail. *Fish Pathology*, 15(3–4), 263–269. <https://doi.org/10.3147/jsfp.15.263>
- Gaspar, V. M., Sousa, F., Queiroz, J. A., & Correia, I. J. (2011). Formulation of chitosan–TPP–pDNA nanocapsules for gene therapy applications. *Nanotechnology*, 22(1), 015101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/1/015101>

- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 139–144. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-1-139>
- Ghendon, Y., Markushin, S., Krivtsov, G., & Akopova, I. (2008). Chitosan as an adjuvant for parenterally administered inactivated influenza vaccines. *Archives of Virology*, 153(5), 831–837. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0047-4>
- Glenting, J., & Wessels, S. (2005). Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*, 5, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-26>
- Guo, J.-J., Huang, M.-Y., Hong, J.-W., Chuang, Y.-C., Chou, R.-L., Lee, Y.-H., & Chen, T.-I. (2015). The efficacy of inactivated *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* combined with levan/alum as vaccine against photobacteriosis in Cobia, *Rachycentron canadum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(5), 549–556. <https://doi.org/10.1111/jwas.12216>
- Hanif, A., Bakopoulos, V., Leonardos, I., & Dimitriadis, G. J. (2005). The effect of sea bream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(4), 345–361. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.12.009>
- Harper, C., & Wolf, J. C. (2009). Morphologic effects of the stress response in fish. *ILAR Journal*, 50(4), 387–396. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.387>
- Håstein, T., Gudding, R., & Evensen, Ø. (2005). Bacterial vaccines for fish: An update of the current situation worldwide. *Developments in Biologicals*, 121, 55–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962470>
- Hayashi, Y., Ullner, M., & Linse, P. (2002). A Monte Carlo study of solutions of oppositely charged polyelectrolytes. *The Journal of Chemical Physics*, 116(15), 6836–6845. <https://doi.org/10.1063/1.1460859>
- Hnasko, R. (2015). *ELISA: Methods and Protocols*. Vol. 1318. Humana Press.
- Ho, L.-P., Chang, C.-J., Liu, H.-C., Yang, H.-L., & Lin, J. H.-Y. (2014). Evaluating the protective efficacy of antigen combinations against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* infections in cobia, *Rachycentron canadum* L. *Journal of Fish Diseases*, 37(1), 51–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01424.x>
- Ho, L.-P., Lin, J. H.-Y., Liu, H.-C., Chen, H.-E., Chen, T.-Y., & Yang, H.-L. (2011). Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.11.029>
- Jaafar, R. M., Chettri, J. K., Dalsgaard, I., Al-Jubury, A., Kania, P. W., Skov, J., & Buchmann, K. (2015). Effects of adjuvant Montanide™ ISA 763 A VG in rainbow trout injection vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 47(2), 797–806. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.023>
- Janssen, W. A., & Surgalla, M. J. (1968). Morphology, physiology, and serology of a Pasteurella species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology*, 96(5), 1606–1610. <https://doi.org/10.1128/JB.96.5.1606-1610.1968>
- Kampke, T., Kieninger, M., & Mecklenburg, M. (2001). Efficient primer design algorithms. *Bioinformatics*, 17(3), 214–225. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.3.214>
- Kannerstein, M., Churg, J., McCaughey, W. T. E., & Hill, D. P. (1977). Papillary tumors of the peritoneum in women: Mesothelioma or papillary carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 127(3), 306–314. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(77\)90475-6](https://doi.org/10.1016/0002-9378(77)90475-6)

- Kawakami, H., Shinohara, N., Fukuda, Y., Yamashita, H., Kihara, H., & Sakai, M. (1997). The efficacy of lipopolysaccharide mixed chloroform-killed cell (LPS-CKC) bacterin of *Pasteurella piscicida* on Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 154(2), 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00044-6)
- Kelly, H. G., Kent, S. J., & Wheatley, A. K. (2019). Immunological basis for enhanced immunity of nanoparticle vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 18(3), 269–280. <https://doi.org/10.1080/14760584.2019.1578216>
- Kitiyodom, S., Yata, T., Yostawornkul, J., Kaewmalun, S., Nittayasut, N., Suktham, K., Surassmo, S., Namdee, K., Rodkhum, C., & Pirarat, N. (2019). Enhanced efficacy of immersion vaccination in tilapia against columnaris disease by chitosan-coated “pathogen-like” mucoadhesive nanovaccines. *Fish & Shellfish Immunology*, 95, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.064>
- Kumar, S. R., Ahmed, V. P. I., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Babu, V. S., & Hameed, A. S. S. (2008). 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*, 25(1–2), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.12.004>
- Kumar, S. R., Parameswaran, V., Ahmed, V. P. I., Musthaq, S. S., & Hameed, A. S. S. (2007). Protective efficiency of DNA vaccination in Asian seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(2), 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.005>
- Kusuda, R., & Hamaguchi, M. (1988). The efficacy of attenuated live bacterin of *Pasteurella piscicida* against Pseudotuberculosis in Yellowtail. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 8(3), 50.
- Lee, B.-S., Huang, J.-S., Jayathilaka, L. P., Lee, J., & Gupta, S. (2016). Antibody production with synthetic peptides. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1474, pp. 25–47). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6352-2_11)
- Lemarié, G., Dosdat, A., Covès, D., Dutto, G., Gasset, E., & Person-Le Ruyet, J. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229(1–4), 479–491. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00392-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00392-2)
- Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2007). Heme, na iron supply for vibrios pathogenic for fish. *BioMetals*, 20(3–4), 615–626. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9053-8>
- Li, J., Tang, L., Li, S., Li, G., & Mo, Z. (2020). The efficacy and side-effects of oil-based adjuvants emulsified *Vibrio anguillarum* bivalent inactivated vaccine in turbot (*Scophthalmus maximus*) under production mode. *Aquaculture*, 524(October 2019), 735259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735259>
- Li, L., Lin, S.-L., Deng, L., & Liu, Z.-G. (2013). Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in black seabream *Acanthopagrus schlegelii* Bleeker to protect from *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Fish Diseases*, 36(12), 987–995. <https://doi.org/10.1111/jfd.12032>
- Li, Y., Dong, X.-Y., & Sun, Y. (2005). High-speed chromatographic purification of plasmid DNA with a customized biporous hydrophobic adsorbent. *Biochemical Engineering Journal*, 27(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.06.011>
- Litman, G. W., Rast, J. P., & Fugmann, S. D. (2010). The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 10(8), 543–553. <https://doi.org/10.1038/nri2807>
- Liu, P.-C., Lin, J.-Y., & Lee, K.-K. (2003). Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology*, 43(6), 499–507. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310301>
- Lodish, H., Berk, A., & Zipursky, S. L. (2000a). Hierarchical structure of proteins. *Molecular Cell Biology*, 4th editio. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21581/>

- Lodish, H., Berk, A., & Zipursky, S. L. (2000b). *Polymerase chain reaction: Na alternative to cloning* (4th ed.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21541/>
- López-Dóriga, M. V., Barnes, A. C., Dos Santos, N. M. S., & Ellis, A. E. (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology*, *146*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-21>
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J., Wu, T., & Davis, H. (1998). Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, *8*(4), 261–270. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0134>
- Magariños, B. (1996). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogenesis*, *21*(4), 289–297. <https://doi.org/10.1006/mpat.1996.0062>
- Magariños, B., Noya, M., Romalde, J. L., Pérez, G., & Toranzo, A. E. (1994) na. Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, *14*, 120–122.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1994) (a). Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(1), 180–186. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.1.180-186.1994>
- Magariños, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1994) (b). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(8), 2990–2998. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.8.2990-2998.1994>
- Magariños, B., Romalde, J. L., Noya, M., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1996) (b). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters*, *138*(1), 29–34. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00076-6](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00076-6)
- Magariños, B., Romalde, J. L., Santos, Y., Casal, J. F., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1994) (d). Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. *Aquaculture*, *120*(3–4), 201–208. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90078-7)
- Magariños, B., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (1996) (a). Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annual Review of Fish Diseases*, *6*(1), 41–64. [https://doi.org/10.1016/S0959-8030\(96\)90005-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8030(96)90005-8)
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, *20*(2), 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Mahapatro, A., & Singh, D. K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, *9*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-55>
- Mancuso, M., and R. Zaccone. 2016. “Detection of Specific Antibody Levels against Photobacterium Damsela Subsp. Piscicida in Sea Bass during Experimental Challenge.” *Journal of Marine Biology and Aquaculture* *2*(2):1–5. doi: 10.15436/2381-0750.16.1148.
- Matsuura, Y., Terashima, S., Takano, T., & Matsuyama, T. (2019). Current status of fish vaccines in Japan. *Fish & Shellfish Immunology*, *95*, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.031>
- McCue, J. T. (2009). Chapter 25: Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463, Issue C, pp. 405–414). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63025-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63025-1)
- Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., & Speilberg, L. (1996). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, *6*(5), 335–350. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0034>
- Mitchell, H. (1995). Choosing a furunculosis vaccine: Points to consider. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.*, *95*, 30–37. <http://search.proquest.com/docview/17006856?accountid=14656>

- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Morais, S., Aragão, C., Cabrita, E., Conceição, L. E. C., Constenla, M., Costas, B., Dias, J., Duncan, N., Engrola, S., Estevez, A., Gisbert, E., Mañanós, E., Valente, L. M. P., Yúfera, M., & Dinis, M. T. (2016). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 227–263. <https://doi.org/10.1111/raq.12091>
- Mudshinge, S. R., Deore, A. B., Patil, S., & Bhalgat, C. M. (2011). Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 19(3), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.04.001>
- Mutoloki, S., Alexandersen, S., & Evensen, Ø. (2004). Sequential study of antigen persistence and concomitant inflammatory reactions relative to side-effects and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following intraperitoneal injection with oil-adjuvanted vaccines. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(5), 633–644. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.10.002>
- Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2015). Oral vaccination of fish – Antigen preparations, uptake, and immune induction. *Frontiers in Immunology*, 6(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00519>
- Nagano, I., Inoue, S., Kawai, K., & Oshima, S. I. (2009). Repeatable immersion infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* reproducing clinical signs and moderate mortality. *Fisheries Science*, 75(3), 707–714. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0099-8>
- Nandedkar, T. D. (2009). Nanovaccines: Recent developments in vaccination. *Journal of Biosciences*, 34(6), 995–1003. <https://doi.org/10.1007/s12038-009-0114-3>
- Nicklas, J. A., & Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(8), 1160–1167. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1924-z>
- Noya, M., Magariños, B., & Lamas, J. (1995). Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. *Aquaculture*, 131(1–2), 11–21. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00353-P](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00353-P)
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Osorio, C. R., M. D. Collins, A. E. Toranzo, J. L. Barja, and J. L. Romalde. 1999. “16S RRNA Gene Sequence Analysis of *Photobacterium Damsela* and Nested PCR Method for Rapid Detection of the Causative Agent of Fish Pasteurellosis.” *Applied and Environmental Microbiology* 65(7):2942–46. doi: 10.1128/AEM.65.7.2942-2946.1999.
- Osorio, C. R., Rivas, A. J., Balado, M., Fuentes-Monteverde, J. C., Rodríguez, J., Jiménez, C., Lemos, M. L., & Waldor, M. K. (2015). A transmissible plasmid-borne pathogenicity island confers piscibactin biosynthesis in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 5867–5879. <https://doi.org/10.1128/AEM.01580-15>
- Ouji, Y., Yoshida-Terakura, A., Hayashi, Y., Maeda, I., Kawase, M., Yamato, E., Miyazaki, J.-I., & Yagi, K. (2002). Polyethyleneimine/chitosan hexamer-mediated gene transfection into intestinal epithelial cell cultured in serum-containing medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(1), 81–83. <https://doi.org/10.1263/jbb.94.81>
- Paulie, S., Perlmann, P., & Perlmann, H. (2006). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cell Biology, Four-Volume Set*, 1, 533–538. <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50065-4>
- Peek, L. J., Middaugh, C. R., & Berkland, C. (2008). Nanotechnology in vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(8), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.017>

- Pellizzari, C., Krasnov, A., Afanasyev, S., Vitulo, N., Franch, R., Pegolo, S., Patarnello, T., & Bargelloni, L. (2013). High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: Results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. *Fish & Shellfish Immunology*, *34*(5), 1269–1278. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.007>
- Peruzzi, S., Westgaard, J.-I., & Chatain, B. (2007). Genetic investigation of swimbladder inflation anomalies in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, *265*(1–4), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.029>
- Piazzon, M. C., Galindo-Villegas, J., Pereiro, P., Estensoro, I., Calduch-Giner, J. A., Gómez-Casado, E., Novoa, B., Mulero, V., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2016). Differential modulation of IgT and IgM upon parasitic, bacterial, viral, and dietary challenges in a perciform fish. *Frontiers in Immunology*, *7*(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00637>
- Pinto, D., Santos, M. A., & Chambel, L. (2015). Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, *41*(1), 61–76. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.794127>
- Plant, K. P., & LaPatra, S. E. (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, *35*(12), 1256–1262. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.007>
- Postle, K., & Larsen, R. A. (2007). TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *BioMetals*, *20*(3–4), 453–465. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9071-6>
- Prazeres, D. M. F. (2011). *Plasmid biopharmaceuticals: Basics applications and manufacturing*. John Wiley & Sons, Inc.
- Prazeres, D. M. F., & Monteiro, G. A. (2014). Plasmid biopharmaceuticals. *Microbiology Spectrum*, *2*(6), 1–18. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0022-2014>
- Pridgeon, J., & Klesius, P. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, *7*(048). <https://doi.org/10.1079/PAVSNR20127048>
- Quentel, C., & Vigneulle, M. (1997). Antigen uptake and immune responses after oral vaccination. *Developments in Biological Standardization*, *90*, 69–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9270836>
- Rao, S. B., & Sharma, C. P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*, *34*(1), 21–28. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199701\)34:1<21::AID-JBM4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199701)34:1<21::AID-JBM4>3.0.CO;2-P)
- Ray, N. (1997). Nanogram quantities of plasmid DNA encoding the rabies virus glycoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *Vaccine*, *15*(8), 892–895. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00281-2)
- Richards, H. A., Han, C.-T., Hopkins, R. G., Failla, M. L., Ward, W. W., & Stewart, C. N. (2003). Safety Assessment of Recombinant Green Fluorescent Protein Orally Administered to Weaned Rats. *The Journal of Nutrition*, *133*(6), 1909–1912. <https://doi.org/10.1093/jn/133.6.1909>
- Rivas-Aravena, A., Sandino, A. M., & Spencer, E. (2013). Nanoparticles and microparticles of polymers and polysaccharides to administer fish vaccines. *Biological Research*, *46*(4), 407–419. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400012>
- Rivas, A. J., Balado, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2011). The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid. *Infection and Immunity*, *79*(11), 4617–4627. <https://doi.org/10.1128/IAI.05436-11>
- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Na integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, *5*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0051-6>

- Romo, M. R., Pérez-Martínez, D., & Ferrer, C. C. (2016). Innate immunity in vertebrates: Na overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Russo, E. (2003). Special Report: The birth of biotechnology. *Nature*, 421(6921), 456–457. <https://doi.org/10.1038/nj6921-456a>
- Schalk, I. J., Mislin, G. L. A., & Brillet, K. (2012). Structure, function and binding selectivity and stereoselectivity of siderophore–iron outer membrane transporters. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 69, pp. 37–66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>
- Secombes, C. J. (2008). Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish & Shellfish Immunology*, 25(4), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.05.001>
- Secombes, C. J., & Ellis, A. E. (2012). The immunology of teleosts. In *Fish Pathology* (pp. 144–166). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118222942.ch4>
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P., & Hoffman, S. L. (1994). Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21), 9866–9870. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9866>
- Shah, S. Q. A., Cabello, F. C., L'Abée-Lund, T. M., Tomova, A., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Sørum, H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology*, 16(5), 1310–1320. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12421>
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3), 223–239. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, 6(March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
- Smith, N. C., Rise, M. L., & Christian, S. L. (2019). A comparison of the innate and adaptive immune systems in cartilaginous fish, ray-finned fish, and lobe-finned fish. *Frontiers in Immunology*, 10(October). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>
- Snieszko, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., & Boone, J. G. (1964). *Pasteurella sp.* from an epizootic of white perch (*Roccus Americanus*) in Chesapeake bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology*, 88(6), 1814–1815. <https://doi.org/10.1128/JB.88.6.1814-1815.1964>
- Soltani, M., Mokhtari, A., Mirzargar, S. S., Taherimirghaed, A., Zargar, A., Shafiei, S., & Hosseini-Shekarabi, S. P. (2016). Efficacy and immune response of intraperitoneal vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a *Yersinia ruckeri* bacterin formulated with Montanide™ ISA 763 AVG adjuvant. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 36(6), 225–236.
- Souto, A., Montaós, M. A., Rivas, A. J., Balado, M., Osorio, C. R., Rodríguez, J., Lemos, M. L., & Jiménez, C. (2012). Structure and biosynthetic assembly of piscibactin, a siderophore from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, predicted from genome analysis. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012(29), 5693–5700. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200818>
- Spinós, E., Kokkoris, G. D., & Bakopoulos, V. (2017). Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines. *Aquaculture*, 471, 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.017>
- Swain, P., Nayak, S. K., Sasmal, A., Behera, T., Barik, S. K., Swain, S. K., Mishra, S. S., Na, A. K., Das, J. K., & Jayasankar, P. (2014). Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 2491–2502. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1674-4>

- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T., & Kawashima, Y. (1996). Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive Chitosan-Coated liposomes. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 13, Issue 6, pp. 896–901). <https://doi.org/10.1023/A:1016009313548>
- Thim, H., Villoing, S., McLoughlin, M., Christie, K., Grove, S., Frost, P., & Jørgensen, J. (2014). Vaccine Adjuvants in Fish Vaccines Make a Difference: Comparing Three Adjuvants (Montanide ISA 763 A Oil, CpG/Poly I:C Combo and VHSV Glycoprotein) Alone or in Combination Formulated with an Inactivated Whole Salmonid Alphavirus Antigen. *Vaccines*, 2(2), 228–251. <https://doi.org/10.3390/vaccines2020228>
- Thode, S. K., Rojek, E., Kozłowski, M., Ahmad, R., & Haugen, P. (2018). Distribution of siderophore gene systems on a Vibrionaceae phylogeny: Database searches, phylogenetic analyses and evolutionary perspectives. *PLoS ONE*, 13(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191860>
- Thompson, F., Lida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Journal of Clinical Microbiology*, 68, 403–431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>
- Thune, R. L., Fernandez, D. H., Hawke, J. P., & Miller, R. (2003). Construction of a safe, stable, efficacious vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(1–2), 51–58. <https://doi.org/10.3354/dao057051>
- Thyssen, A., Grisez, L., Van Houdt, R., & Ollevier, F. (1998). Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(4), 1145–1151. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1145>
- Tian, J., Yu, J., & Sun, X. (2008). Chitosan microspheres as candidate plasmid vaccine carrier for oral immunisation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(3–4), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.002>
- Toranzo, A. E., Barja, J. L., & Hetrick, F. M. (1982). Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2, 43–45.
- Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1–4), 37–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.002>
- Trier, N., Hansen, P., & Houen, G. (2019). Peptides, antibodies, peptide antibodies and more. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6289. <https://doi.org/10.3390/ijms20246289>
- Trindade, I. P., Diogo, M. M., Prazeres, D. M. F., & Marcos, J. C. (2005). Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1082(2), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.079>
- Truper, H. G., & De' Clari, L. (1998). Taxonomic note: Erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) “in apposition.” *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2), 615–615. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-615>
- Tuševljak, N., Dutil, L., Rajić, A., Uhland, F. C., McClure, C., St-Hilaire, S., Reid-Smith, R. J., & McEwen, S. A. (2013). Antimicrobial use and resistance in aquaculture: Findings of a globally administered survey of aquaculture-allied professionals. *Zoonoses and Public Health*, 60(6), 426–436. <https://doi.org/10.1111/zph.12017>
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L., & Liu, M. A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 259(5102), 1745–1749. <https://doi.org/10.1126/science.8456302>
- Urthaler, J., Buchinger, W., & Necina, R. (2005). Improved downstream process for the production of plasmid DNA. *Acta Biochimica Polonica*, 52(3), 703–711.

- Valderrama, K., Balado, M., Rey-Varela, D., Rodríguez, J., Vila-Sanjurjo, A., Jiménez, C., & Lemos, M. L. (2019). Outer membrane protein FrpA, the siderophore piscibactin receptor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, as a subunit vaccine against photobacteriosis in sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology*, *94*(June), 723–729.
- Van der Kant, R., Karow-Zwick, A. R., Van Durme, J., Blech, M., Gallardo, R., Seeliger, D., Aßfalg, K., Baatsen, P., Compennolle, G., Gils, A., Studts, J. M., Schulz, P., Garidel, P., Schymkowitz, J., & Rousseau, F. (2017). Prediction and reduction of the aggregation of monoclonal antibodies. *Journal of Molecular Biology*, *429*(8), 1244–1261. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.014>
- Vimal, S., Majeed, S. A., Nambi, K. S. N., Madan, N., Farook, M. A., Venkatesan, C., Taju, G., Venu, S., Subburaj, R., Thirunavukkarasu, A. R., & Sahul Hameed, A. S. (2014). Delivery of DNA vaccine using chitosan–tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection. *Aquaculture*, *420–421*, 240–246.
- Vimal, S., Taju, G., Nambi, K. S. N., Majeed, S. A., Sarath Babu, V., Ravi, M., & Hameed, A. S. S. (2012). Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish. *Aquaculture*, *358–359*, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.012>
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., & Diniz, M. (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, *23*, 274–279.
- Wang, B., Ugen, K. E., Srikantan, V., Agadjanyan, M. G., Dang, K., Refaeli, Y., Sato, A. I., Boyer, J., Williams, W. V., & Weiner, D. B. (1993). Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(9), 4156–4160. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4156>
- Wein, T., & Dagan, T. (2020). Plasmid evolution. *Current Biology*, *30*(19), R1158–R1163. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.003>
- Xu, W., Jiao, C., Bao, P., Liu, Q., Wang, P., Zhang, R., Liu, X., & Zhang, Y. (2019). Efficacy of Montanide™ ISA 763 A VG as aquatic adjuvant administered with na inactivated *Vibrio harveyi* vaccine in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, *84*, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.024>
- Xu, Y., & Du, Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, *250*(1), 215–226. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00548-3)
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.-X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. J. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, *32*(3), 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>
- Zolnik, B. S., González-Fernández, A., Sadrieh, N., & Dobrovolskaia, M. A. (2010). Minireview: Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*, *151*(2), 458–465. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1082>
- Zorrilla, I., Balebona, M. C., Moríñigo, M. A., Sarasquete, C., & Borrego, J. J. (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, *22*(3), 167–172. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00157.x>
- Zou, J., & Secombes, C. J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, *5*(2), 23. <https://doi.org/10.3390/biology5020023>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(6), 1875–1881.

## 7. Anexos

**Tabela A I** – Concentrações de cada componente necessário para a reação de PCR

<b>Componentes</b>	<b>Volume para 1 reação (µL)</b>	<b>Concentração (mM)/ Massa total (ng)</b>
<b>10x Buffer</b>	2,5	
<b>25 mN MgSO<sub>4</sub></b>	1,5	1,5 mM
<b>H<sub>2</sub>O PCR</b>	X	
<b>dNTBs</b>	2,5	0,2 mM
<b>Primer forward</b>	0,75	0,3 mM
<b>Primers reverse</b>	0,75	0,3 mM
<b>gDNA</b>	Y	100 ng
<b>KOD</b>	0,5	
<b>Total</b>	25	

Sendo que o volume de água (X) necessário depende do volume de gDNA (Y) que é utilizado. Este volume a utilizar de Y depende da concentração (ng/µL) da amostra de gDNA

**Tabela A II - Valores de Peso, em gramas, e volumes, em  $\mu$ L de vacina administrada para cada peixe e cada tratamento**

Tratamento 1 (C1)			Tratamento 1 (C2)			Tratamento 1 (C3)			Tratamento 2 (D1)			Tratamento 2 (D2)			Tratamento 2 (D3)			Tratamento 3 (E1)			Tratamento 3 (E2)		
Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume
1	19	139	1	16	116	1	11	81	1	19,3	142	1	16,9	125	1	13,3	98	1	11,8	87	1	18,1	133
2	19,1	141	2	13,2	97	2	16,2	119	2	19,6	144	2	13,8	102	2	13,8	102	2	14,3	105	2	16,6	122
3	16,3	120	3	15,1	111	3	9	66	3	10,6	78	3	20,1	148	3	9,1	67	3	17,2	127	3	17,2	127
4	9,3	69	4	18,2	134	4	20,8	153	4	14,6	108	4	13,3	98	4	12,4	91	4	22,1	163	4	11,8	87
5	14,6	108	5	14	103	5	10,3	76	5	8,7	64	5	17,9	132	5	13,9	102	5	12,9	95	5	9,9	73
6	14,2	105	6	13,9	102	6	20	147	6	11	81	6	18,8	139	6	11,8	87	6	12,3	91	6	12,9	95
7	12,5	92	7	12	88	7	16,2	119	7	14,2	105	7	16,3	120	7	11,9	88	7	18,2	134	7	18,1	133
8	16	118	8	13,3	98	8	18,5	136	8	13,7	101	8	10,7	79	8	14,7	108	8	18,1	133	8	10,9	80
9	17,2	127	9	18,8	139	9	13,7	101	9	16,7	123	9	16,9	125	9	14,1	104	9	14	103	9	9,9	73
10	15,7	116	10	13,3	98	10	11,8	87	10	12,6	93	10	11,7	86	10	17,5	129	10	14,5	107	10	17,7	130
11	18,9	139	11	13,5	99	11	14,3	105	11	12,6	93	11	13,9	102	11	17,1	126	11	10,4	77	11	21,4	158
12	11,4	84	12	16,4	121	12	8,3	61	12	16,8	124	12	11,4	84	12	7,4	55	12	11,1	82	12	17,8	131
13	12,9	95	13	14,8	109	13	16,7	123	13	12	88	13	10,6	78	13	12,7	94	13	16,4	121	13	21,3	157
14	16,6	122	14	19,3	142	14	21,1	155	14	13,8	102	14	19,1	141	14	15,9	117	14	10,2	75	14	16,2	119
15	18,6	137	15	14,2	105	15	9,9	73	15	10,9	80	15	18,3	135	15	12,8	94	15	11,1	82	15	9	66
16	17,7	130	16	15,7	116	16	16,4	121	16	17,2	127	16	17,5	129	16	17,6	130	16	14	103	16	19,9	147
17	15,6	115	17	17,6	130	17	10,7	79	17	14,1	104	17	21	155	17	15,3	113	17	10,1	74	17	15,4	113
18	21,7	160	18	15,9	117	18	12,4	91	18	9,1	67	18	19,4	143	18	16,1	119	18	15,6	115	18	10	74
19	18,8	139	19	16,3	120	19	16,1	119	19	15,5	114	19	14,1	104	19	15	111	19	19,7	145	19	16,4	121
20	15,9	117	20	11,9	88	20	11	81	20	9	66	20	19,6	144	20	13,5	99	20	9,6	71	20	12,4	91
21	9,4	69	21	13,5	99	21	12,4	91	21	13,1	97	21	12,9	95	21	9,5	70	21	14,7	108	21	23,1	170
22	21	155	22	14,8	109				22	16,6	122	22	9,3	69	22	12,8	94	22	19,8	146	22	15,2	112
23	18,3	135	23	14,7	108				23	13	96	23	12,6	93	23	21	155	23	7,2	53	23	7,3	54
24	13,5	99	24	28,2	208				24	10,9	80	24	10,8	80	24	15,1	111	24	12,1	89	24	20,5	151
25	13,4	99	25	7,9	58				25	16,4	121	25	14,3	105	25	12	88	25	13,9	102	25	14,6	108
26	16,8	124	26	9,9	73				26	13,9	102	26	13,7	101	26	9,5	70	26	9,9	73	26	14,3	105

Tratamento 1: Vacina de pVAX-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; Tratamento 2: Vacina de pVAX-Frag1-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; Tratamento 3: Vacina de pVAX-Frag8-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; As letras e os números estão relacionados aos aquários correspondentes

Tabela A III – Valores de Peso, em gramas, e volumes, em µL de vacina administrada para cada peixe e cada tratamento (Continuação da Tabela A III)

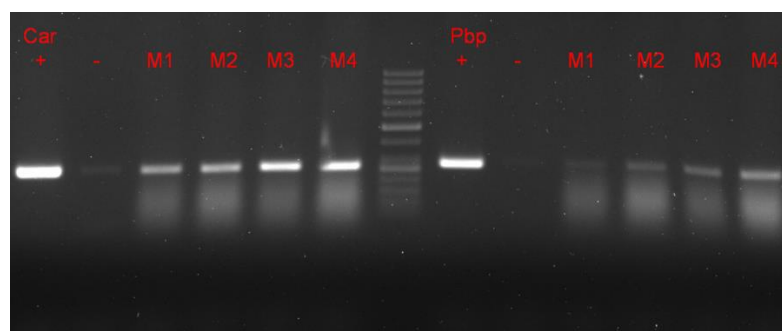
Tratamento 3 (E3)			Tratamento 4 (F1)			Tratamento 4 (F2)			Tratamento 4 (E3)			Controlo (A1)			Controlo (A2)			Controlo (A3)		
Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume	Peixe	Peso	Volume
1	14,3	105	1	16	118	1	18,5	136	1	14,8	109	1	20	120	1	17,7	120	1	16,6	120
2	14,7	108	2	15,7	116	2	13,3	98	2	18,3	135	2	13,4	120	2	18,5	120	2	13	120
3	23,5	173	3	10	74	3	13,6	100	3	15,6	115	3	10,8	120	3	15,8	120	3	13,9	120
4	14	103	4	19,2	141	4	9	66	4	12,7	94	4	12,7	120	4	20,7	120	4	18,6	120
5	15	111	5	15,7	116	5	16	118	5	17,3	127	5	15,3	120	5	9,8	120	5	9,9	120
6	13,4	99	6	9	66	6	21	155	6	15,2	112	6	13,2	120	6	13,6	120	6	17	120
7	12,5	92	7	16,3	120	7	14,6	108	7	14,9	110	7	23,8	120	7	13	120	7	9,1	120
8	13,6	100	8	13,8	102	8	20,6	152	8	16,2	119	8	19,5	120	8	15,3	120	8	13,7	120
9	16,1	119	9	15,5	114	9	15,3	113	9	14,1	104	9	16,7	120	9	12,5	120	9	23,7	120
10	17,7	130	10	13,2	97	10	7,5	55	10	20,1	148	10	10,6	120	10	13,4	120	10	20	120
11	14,8	109	11	10,2	75	11	15,3	113	11	14,8	109	11	18,1	120	11	10,8	120	11	17,7	120
12	16,5	122	12	18,4	136	12	12,5	92	12	16,5	122	12	19,4	120	12	13,6	120	12	14,9	120
13	22,3	164	13	15,7	116	13	13,9	102	13	14,3	105	13	11,2	120	13	18,9	120	13	17,5	120
14	17,1	126	14	18,7	138	14	13,2	97	14	15,8	116	14	9,4	120	14	23	120	14	12,6	120
15	16,7	123	15	19,5	144	15	19,8	146	15	19,9	147	15	13,9	120	15	18,2	120	15	20,7	120
16	13,9	102	16	15,5	114	16	14,3	105	16	18,7	138	16	8,9	120	16	13,4	120	16	16,6	120
17	15,8	116	17	14	103	17	16,8	124	17	15,4	113	17	12,2	120	17	18	120	17	16,2	120
18	24,5	181	18	19,2	141	18	15,1	111	18	15,9	117	18	14,7	120	18	10,1	120	18	14,5	120
19	15,3	113	19	15,5	114	19	15	111	19	10,5	77	19	20	120	19	14,9	120	19	18,5	120
20	16,1	119	20	14	103	20	12,3	91	20	10,3	76	20	8,8	120	20	18,3	120	20	17,1	120
21	7,2	53	21	10	74	21	16,4	121	21	14,8	109	21	17,7	120	21	21	120	21	12,6	120
22	10,4	77	22	12,8	94	22	11,7	86	22	9,4	69	22	13,4	120	22	16,1	120	22	10,7	120
23	26,4	195	23	17,5	129	23	12,7	94	23	14,8	109	23	11,7	120	23	16,2	120	23	13,4	120
24	12,4	91	24	16,3	120	24	13	96	24	14,8	109	24	11,9	120	24	16,9	120	24	12,9	120
25	15,4	113	25	15,1	111	25	12,6	93	25	18,3	135	25	14,2	120	25	19,2	120	25	13,6	120
26	14,1	104	26	13,6	100	26	20	147	26	12,7	94	26	14,9	120	26	13,2	120	26	14,6	120

Tratamento 3: Vacina de pVAX-Frag8-GFP com adjuvante Montanide ISA 763 A VG; Tratamento 4: Vacina de pVAX-Frag8-GFP com adjuvante Montanide Gel 02 PR; Controlo: PBS estéril; As letras e os números estão relacionados aos aquários correspondentes

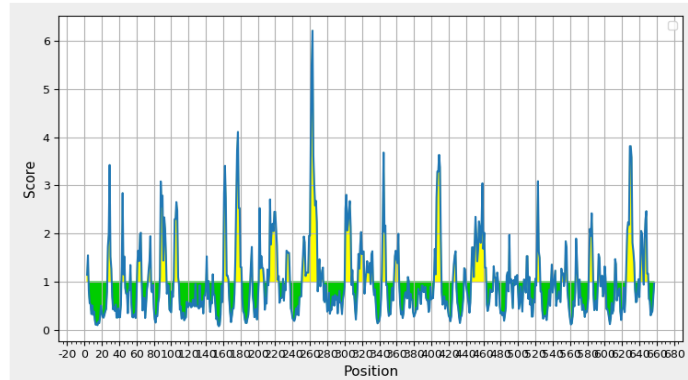
**Tabela A II** – Valores médios de absorvância obtidos dos Ensaio ELISA para cada tratamento, das várias diluições

Diluições	T1		T2		T3		T4		Controlo	
	t15	t30	t15	t30	t15	t30	t15	t30	t15	t30
<b>1:32</b>	0,0209	0,0189	0,0167	0,0409	0,0076	0,0270	0,0020	0,0062	0,0046	0,0008
<b>1:64</b>	0,0729	0,0175	0,0135	0,0324	0,0082	0,0255	0,0009	0,0033	0,0028	0,0008
<b>1:128</b>	0,0086	0,0139	0,0109	0,0269	0,0103	0,0281	0,0038	0,0034	0,0017	0,0009
<b>1:256</b>	0,0052	0,0085	0,0084	0,0169	0,0092	0,0244	0,0013	0,0023	0,0032	0,0011
<b>1:512</b>	0,0039	0,0066	0,0120	0,0155	0,0132	0,0171	0,0033	0,0017	0,0072	0,0019
<b>1:1024</b>	0,0026	0,0100	0,0041	0,0132	0,0112	0,0162	0,0008	0,0599	0,0021	0,0013
<b>1:2048</b>	0,0013	0,0053	0,0055	0,0127	0,0247	0,0088	0,0014	0,0017	0,0024	0,0011

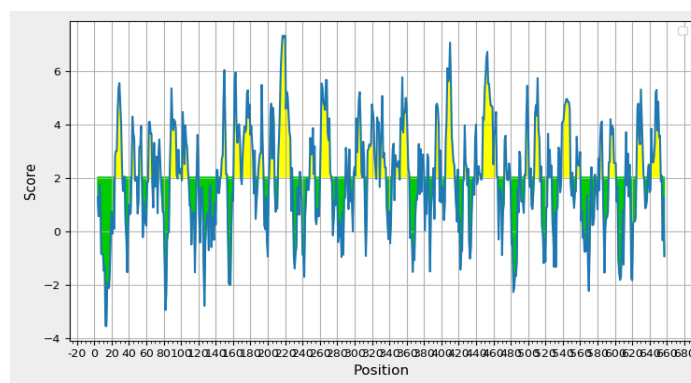
Nestes valores já está descontado o valor de controlo negativo. t15: 15 dias após-vacinação; t30: 30 dias após-vacinação. Os valores negativos foram substituídos por 0. T1: Vacina pVAX-GFP suplementada com Montanide ISA; T2: Vacina pVAX-Frag1-GFP suplementada com Montanide ISA; T3: Vacina pVAX-Frag6-GFP suplementada com Montanide ISA; T4: Vacina pVAX-Frag6-GFP suplementada com Montanide Gel.



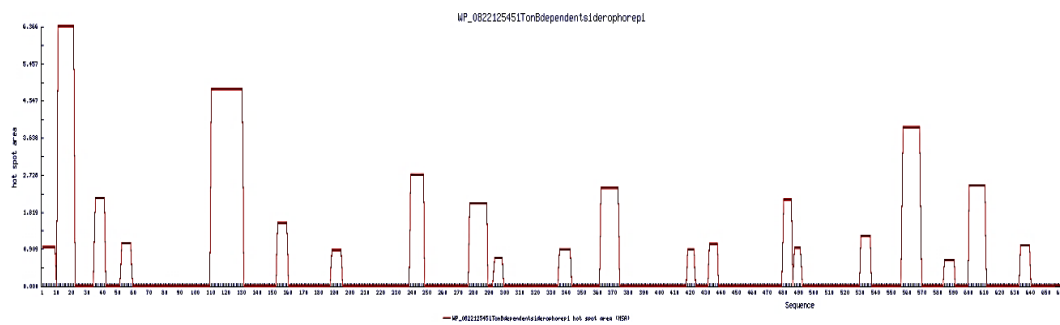
**Figura A 1** – Detecção de *Photobacterium damsela* subs. *piscicida* em órgãos de peixes moribundos, através da amplificação dos genes Car (269 bp) e Pbp (277 bp). M-marcador molecular (50 bp, ThermoFisher, EUA); (-) -controlo negativo; (+) -controlo positivo; M1-peixe moribundo 1; M2-peixe moribundo 2; M3-peixe moribundo 3; M4-peixe moribundo 4



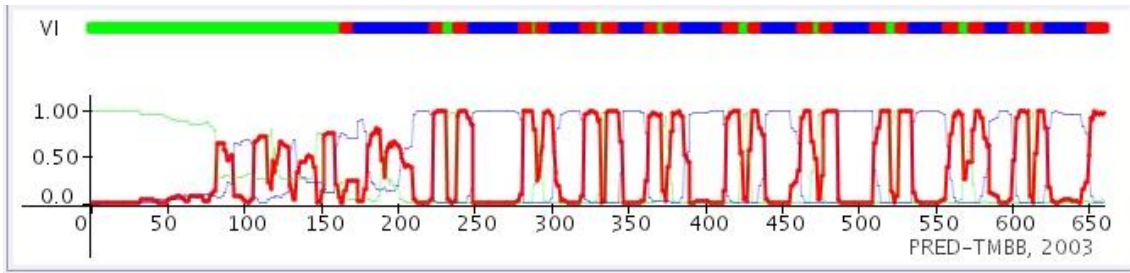
**Figura A 2** - Péptidos previstos para FrpA, usando escala de acessibilidade de superfície de Emini, retirado do *software* IEDB



**Figura A 3** - Péptidos previstos para FrpA, usando previsão de hidrofília de Parker, retirado do *software* IEDB



**Figura A 4** - Hot spots da proteína FrpA, utilizando o *software* AGGRESCAN



**Figura A 5** - Fragmentos da proteína FrpA que estão no espaço extracelular (a azul), na membrana transmembranar (a vermelho) e no espaço periplasmático (a verde). Obtido através do *software* PRED-TMBB

**Tabela A III** - Dados obtidos através do *software* IEDB (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) relativo à previsão de hidrofília de Parker, flexibilidade de Karplus & Schulz, existência de epítopos através de BepiPred e BepiPred-2.0, acessibilidade superficial de Emini e antigenicidade de Kolaskar e Tongaonkar

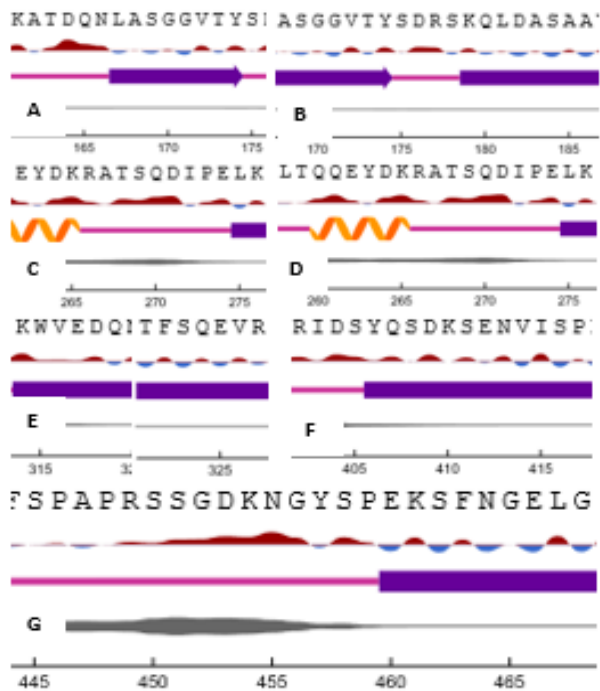
Possíveis seqüências (A)	Comprimento (B)	Epítopos		Acessibilidade superficial (> 1) (E)	Zonas com Flexibilidade (> 1.007) (F)	Antigenicidade (> 1.012) (G)	Hidrofília (> 2.027) (H)
		BepiPred (C)	BepiPred-2.0 (D)				
22-34	13	23-33	25-34	—	28-34;25-31 (1.015;1.027)	22-26 (1.089)	22-28; 26-32 (3.014; 5.557) *
59-80	22	63-66	64-71	—	64-70; 59-65 (1.017;1.073)	78-80 (1.014)	73-79; 60-67 (2.629; 4.1)
		78					
88-109	22	89-96	86-93	87-94 (1.439;2.79) *	103-109;100-106 (1.013;1.069)	103-109 (1.049)	92-98; 99-105 (2.114; 4.471)
		98-109	105-108	103-108 (2.301) *			
131-152	22	142-152	143-149	—	140-146;146-152 (1.01;1.118)	131-140 (1.068;1.14)	142-148; 146-152 (2.086; 4.957)
160-180	21	161-182	161-170	160-166 (2.741; 3408) *	169-175; 160-166 e 174-180 (1.01; 1.064)	—	168-174; 160-166 (2.8; 5.957) * <sup>1</sup>
				174-180 (3.72; 4.111) *			
<b>160-175</b>	16	161-175	161-170	160-166 (2.741; 3408) *	169-175; 160-166 (1.01; 1.064) *	166-175 (1.032;1.052)	168-174; 160-166 (2.8; 5.957)
				174-175 (3.72) *			
<b>168-186</b>	19	168-182	168-170	172-184 (1.305; 4.111) *	169-175; 175-181 (1.01; 1.075)	181-186 (1.1)	168-174 e 180-186; 174-180 (2.8; 5.286) *
199-210	22	203-210	200-210	201-207 (1.278; 1.534)	199-205; 202-208 (1.023; 1.065) *	199-201 (1.021)	199-205; 201-207 (2.429; 4.786)
<b>209-229</b>	21	209-226	209-225	213-224 (1.771; 2.454)	209-215; 211-217 (1.04; 1.088) *	—	209-215; 214-223 ( <b>2.729; 7.329</b> ) *
<b>263-276</b>	14	263-273	263-276	263-268 (3.02) *	266-271; 267-273 (1.101; 1.104)	275-276 (1.087)	270-276; 264-271 ( <b>2.057; 5.671</b> ) *
<b>258-276</b>	19	263-273	258-276	258-268 (1.958; 6.212) *	262-268 2 270-276; 267-273 (1.051; 1.104) *	275-276 (1.087)	270-276; 264-271 (2.057; 5.671) *
301-322	22	301	301-318	301-307 (2.062-2.197)	31-318; 316-322 (1.008; 1.071)	306-312 (1.023)	305-311;303-309 (2.2; 5.214)
		303-311		316-322 (1.744; 2.034)		310-316 (1.038)	
		314-322					
324--334	11	324-334	327-334	324-329 (1.431)	326-332; 328-334 (1.008; 1.019)	321-327	327-333; 324-331 (3.114; 4.086)
299-319	21	301	301-318	301-307 (2.062-2.197)	312-318; 301-308 (1.008; 1.035)	306-312 (1.023)	305-311; 303-308 (2.2; 5.214)
		303-311		316-319 (1.744)		310-316 (1.038)	
		314-319					

Os dados entre parêntesis nas áreas E, F, G, H e I correspondem aos *scores* mais baixos e mais altos da respetiva seqüência, para termos de comparação. Na parte E: \* os fragmentos que apenas têm aminoácidos acessíveis; na parte F estão representados os fragmentos com flexibilidade e aos respetivos *scores* mais altos e mais baixos e \* significa que todo o fragmento tem flexibilidade; na parte G: \* Fragmentos com mais antigenicidade. Na parte H: \* Sem zonas hidrófobas. \*<sup>1</sup> Apenas uma zona hidrófoba (167-173)

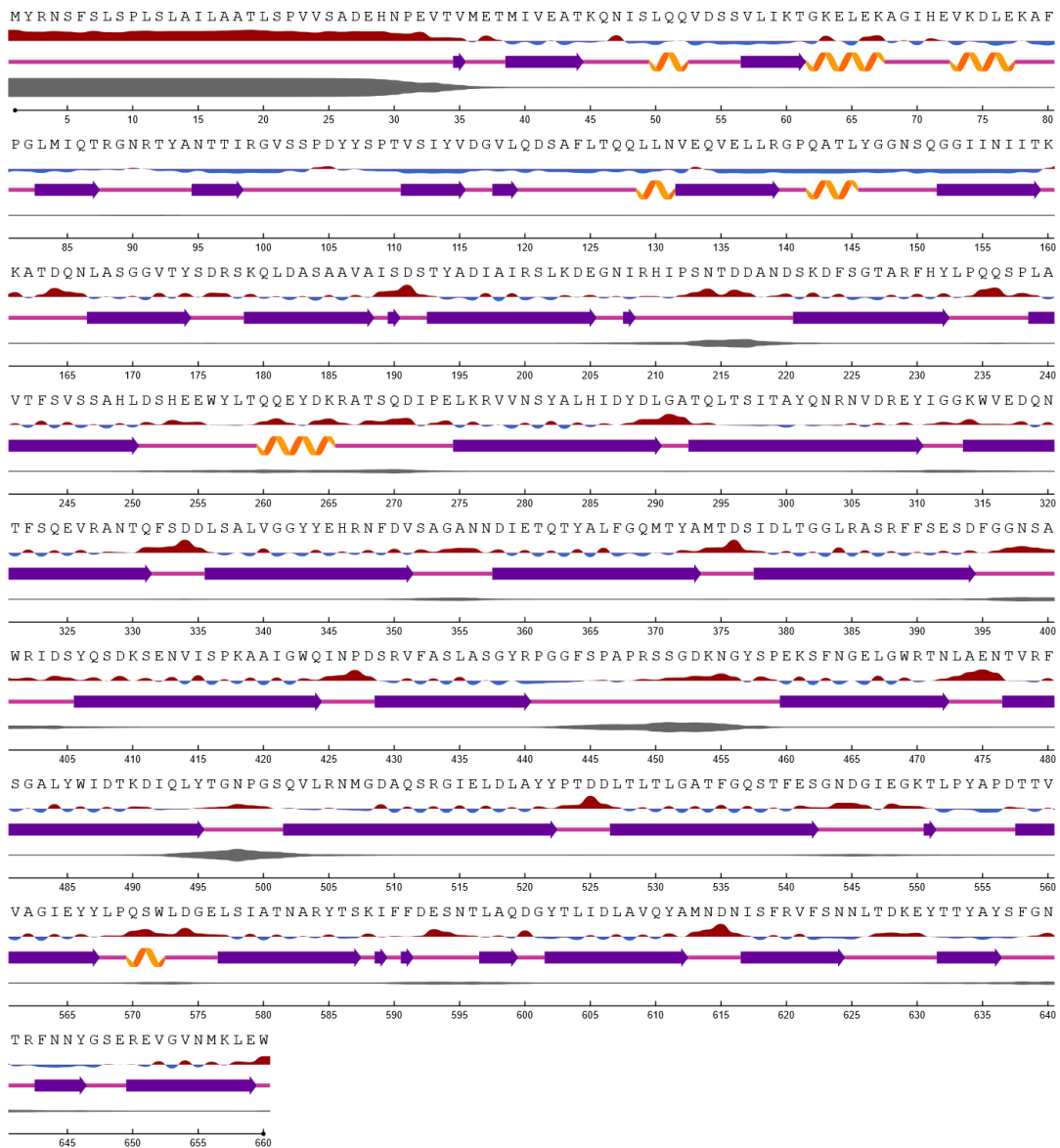
**Tabela A IV** - Dados obtidos através do software IEDB (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) relativo à previsão de hidrofília de Parker, flexibilidade de Karplus & Schulz, existência de epitopos através de BepiPred e BepiPred-2.0, acessibilidade superficial de Emini e antigenicidade de Kolaskar e Tongaonkar (Continuação da Tabela A V)

Possíveis sequências (A)	Comprimento (B)	Epitopos		Acessibilidade superficial (> 1) (E)	Zonas com Flexibilidade (> 1.007) (F)	Antigenicidade (> 1.012) (G)	Hidrofília (> 2.027) (H)
		BepiPred (C)	BepiPred-2.0 (D)				
314-329	16	314-329	314-318	316-322 (1.744; 2.034) *	323-329; 316-322 (1.013; 1.071) *	321-327 (1.019)	321-327; 317-323 (2.4; 4.757)
			327-329	324-329 (1.431)			
<b>314-327</b>	14	314-327	314-318	324-329 (1.431)	314-320; 316-322 (1.024; 1.071) *	321-328 (1.019; 1.041)	321-327; 317-323 (2.4; 4.757) *
343-361	19	350-361	346-360	357-361 (1.647)	352-361 (1.017; 1.057)	346-352 (1.015)	346-352; 352-358 (2.414; 5.771)
						349-355 (1.051)	
<b>402-416</b>	15	405-416	402-417	403-414 (1.153; 3.635) *	410-416; 407-413 (1.022; 1.096) *	410-416 (1.017)	410-416; 407-413 (3.114; 7.071) *
<b>403-413</b>	11	405-413	403-413	403-413 (1.153; 3.635) *	403-409; 407-413 (1.039; 1.096) *	—	403-409; 407-413 (4.157; 7.071) *
<b>445-468</b>	24	445-464	445-459	444-466 (1.099; 3.046) *	461-468; 448-454 (1.029; 1.121) *	445-451 (1.014)	461-468; 450-456 (2.043; 6.729) *
		468				457-463 (1.017)	
494-514	21	494-503	494-505	508-514 (1.534)	504-510; 496-502 (1.011; 1.106)	498-507 (1.019; 1.067)	498-504; 508-514 (2.057; 5.743)
		508-514	509				
494-504	11	494-503	494-504	495-500 (1.113)	504-510; 596-502 (1.011; 1.106)	498-501 (1.053)	498-504; 496-502 (2.057; 5.457) *
				497-502 (1.142)			
<b>504-514</b>	11	508-514	509	505-510 (1.052)	504-510; 508-514 (1.011; 1.068) *	—	504-510; 508-514 (2.229; 5.743) *
537-554	18	535-561	542-555	537-542 (1.36)	548-554; 541-547 (1.031; 1.096) *	—	548-554; 541-548 (2.2; 4.957)
				540-546 (1.079; 1.234)			
				548-554 (1.153; 1.275)			
<b>537-551</b>	15	537-551	542-551	537-542 (1.36)	544-550; 541-547 (1.05; 1.096) *	—	537-543; 541-548 (4.071; 4.957) *
				540-546 (1.079; 1.234)			
611- 632	22	626-633	612-614	611-616 (1.367)	621-627; 626-632 (1.023; 1.039)	615-624 (1.022; 1.088)	622-628; 624-630 (2.471; 4.786)
				623-632 (1.392; 3.815)		620-627 (1.023; 1.028)	
<b>623-634</b>	11	626-633	—	623-628; 627-633 (1.392; 3.815) *	628-634; 626-632 (1.022; 1.039) *	—	626-632; 627-633 (3.257; 5.314) *
640-655	16	643-652	640	647-652; 646-651 (1.169; 2.467)	643-649; 645-651 (1.023; 1.07)	648-655 (1.032)	641-647; 645-651 (2.571; 5.3) *
			642				
<b>644-653</b>	10	644-652	—	657-653; 646-651 (1.169; 2.467) *	644-650; 645-651 (1.05; 1.07) *	—	646-652; 644-650 (3.771; 5.3) *

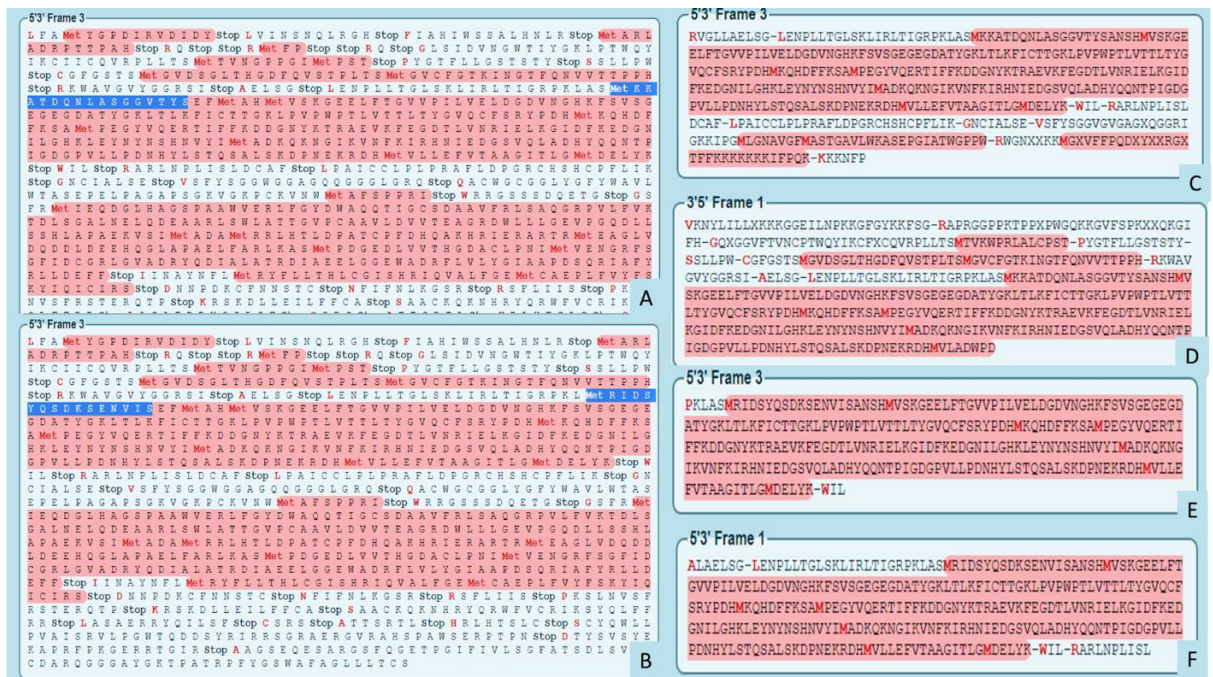
Os dados entre parêntesis nas áreas E, F, G, H e I correspondem aos scores mais baixos e mais altos da respetiva sequência, para termos de comparação. Na parte E: \* os fragmentos que apenas têm aminoácidos acessíveis; na parte F estão representados os fragmentos com flexibilidade e aos respetivos scores mais altos e mais baixos e \* significa que todo o fragmento tem flexibilidade; na parte G: \* Fragmentos com mais antigenicidade. Na parte H: \* Sem zonas hidrófobas. \*1 Apenas uma zona hidrófoba (167-173)



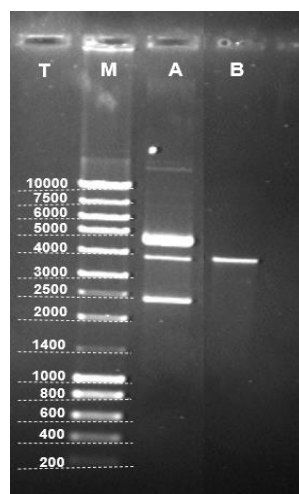
**Figura A 6** - Estruturas secundárias, acessibilidade de superfície relativa e desordem de cada um dos fragmentos. Sendo que A corresponde ao fragmento 1 (160-175), B ao fragmento 2 (168-186), C ao fragmento 3 (263-276), D ao fragmento 4 (258 a 276), E ao fragmento 5 (314-327), F ao fragmento 6 (402-416) e F ao fragmento 7 (445-468). Acessibilidade de superfície relativa: o vermelho está exposto e o azul está oculto, com limite de 25%. Estrutura secundária: Helix, Strand e Coil. Desordem: a espessura da linha é igual à probabilidade de resíduo desordenado. Existe uma maior desordem na parte que está mais exposta. Obtido através do software NetSurfP



**Figura A 7** - Representação gráfica de 660 previsões de resíduos em 1 sequência. Acessibilidade de superfície relativa: o vermelho está exposto e o azul está oculto, com limite de 25%. Estrutura secundária: *Helix*, *Strand*, *Coil*. Desordem: a espessura da linha é igual à probabilidade de resíduo desordenado. Obtido através do *software* NetSurfP



**Figura A 8** - Tradução das sequências esperadas nos plasmídeos, relativos a (A) pVAX-Frag1-GFP e (B) pVAX-Frag6-GFP; e tradução das sequências obtidas nos plasmídeos pelo sequenciamento, utilizando um *primer* universal *forward*, CMV-F, relativos a (C) pVAX-Frag1-GFP; e (E) pVAX-Frag6-GFP; e utilizando um *primer* universal *reverse*, EGFP-CR, relativo a (D) pVAX-Frag1-GFP; (F) pVAX-Frag6-GFP; Azul em (A) e (B): sequência relativa aos fragmentos 1 e 6, respectivamente. Obtido com o *software* ExPASy



**Figura A 9** - Eletroforese para confirmação da purificação de pVAX-GFP digerido. T: Tamanho das bandas (bp) de M; M: Padrão; A: amostras pVAX-GFP não digerido; B: pVAX-GFP digerido e purificado

5'3' Frame 3

```

L F A Met Y G P D I R V D I D Y Stop L V I N S N Q L R G H Stop F I A H I W S S A L H N L R Stop Met A R L
A D R P T T P A H Stop R Q Stop Stop R Met F P Stop Stop R Q Stop G L S I D V N G W T I Y G K L P T W Q Y
I K C I I C Q V R P L L T S Met T V N G P P G I Met P S T Stop P Y G T F L L G S T S T Y Stop S S L L P W
Stop C G F G S T S Met G V D S G L T H G D F Q V S T P L T S Met G V C F G T K I N G T F Q N V V T T P P H
Stop R K W A V G V Y G G R S I Stop A E L S G Stop L E N P L L T G L S K L I R L T I G R P K L A S Met Y R
N S F S L S P L S L A I L A A T L S P V V S A D E H N P E V T V Met E T Met I V E A T K O N I S L O O V D
S S V L I K T G K E L E K A G I H E V K D L E K A F P G L Met I Q T R G N R T Y A N T T I R G V S S P D Y
Y S P T V S I Y V D G V L Q D S A F L T Q Q L L N V E Q V E L L R G P Q A T L Y G G N S Q G G I I N I I T
K K A T D Q N L A S G G V T Y S D R S K Q L D A S A A V A I S D S T Y A D I A I R S L K D E G N I R H I P
S N T D D A N D S K D F S G T A R P H Y L P Q O S P L A V T F S V S S A H L D S H E E W Y L T Q O Q E Y D K
R A T S Q D I P E L K R V V N S Y A L H I D Y D L G A T Q L T S I T A Y Q N R N V D R E Y I G G K W V E D
Q N T F S O E V R A N T O F S D D L S A L V G G Y Y E H R N F D V S A G A N N D I E T O T Y A L F G Q Met
T Y A Met T D S I D L T G G L R A S R F F S E S D F G G N S A W R I D S Y Q S D K S E N V I S P K A A I G
W Q I N P D S R V F A S L A S G Y R P G G F S P A P R S S G D K N G Y S P E K S F N G E L G W R T N L A E
N T V R F S G A L Y W I D T K D I Q L Y T G N P G S Q V L R N Met G D A Q S R G I E L D L A Y Y P T D D L
T L T L G A T F G Q S T F E S G N D G I E G K T L P Y A P D T T V V A G I E Y Y L P O S W L D G E L S I A
T N A R Y T S K I F F D E S N T L A O D G Y T L I D L A V O Y A Met N D N I S F R V F S N N L T D K E Y T
T Y A Y S F G N T R F N N Y G S E R E V G V N Met K L E W E F Met A H Met V S K G E E L F T G V V P I L V
E L D G D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q
C F S R Y P D H Met K Q H D F F K S A Met P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E G D T L V
N R I E L K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I Met A D K Q R N G I K V N F K I R H N I E
D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H Met V L L E F V
T A A G I T L G Met D E L Y K Stop W I L Stop R A R L N P L I S L D C A F Stop L P A I C C L P L P R A F L
D P G R C H S H C P F L I K Stop G N C I A L S E Stop V S F Y S G G W G G A G Q Q G G L G R Q Stop Q A C
W G C G G L Y G F Y W A V L W T A S E P E L P A G A P S G K V G K P C K V N W Met A F S P P R I Stop W R R
G S S S D Q E T G Stop G S F R Met I E Q D G L H A G S P A A W V E R L F G Y D W A Q Q T I G C S D A A V F
R L S A Q G R P V L F V K T D L S G A L N E L Q D E A A R L S W L A T T G V P C A A V L D V V T E A G R D
W L L L G E V P G Q D L L S S H L A P A E K V S I Met A D A Met R R L H T L D P A T C P F D H Q A K H R I
E R A R T R Met E A G L V D Q D D L D E E H Q G L A P A E L F A R L K A S Met P D G E D L V V T H G D A C

```

Figura A 10 - Tradução da sequência esperada do plasmídeo relativo a pVAX-FrpA-GFP; Azul: sequência relativa a FrpA. Obtido com o software ExPASy

**Tabela A V –** Dosagens, tipos de vacina, espécies e condições utilizadas noutros estudos referentes a vários tipos de vacinas

Via de administração	Tipo de Vacina	Espécie	Dosagem utilizada	Tamanho do peixe (aprox.)	Condições utilizadas/observações	Referência Bibliográfica
Injeção intraperitoneal (i.p.)	Vacina de subunidade recombinante (Lipoproteína)	Robalo ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	10 µg ou 25 µg/ peixe	13,5 g	Imunização: 3 semanas, em tanques de 300 L T: 22 a 24°C Salinidade: 38‰ e pH: 7,8 Adjuvante: Freund completo Controlo: 100 µL de PBS 25 µg foram mais eficazes	Andreoni <i>et al.</i> , 2013
	Inativa (LPS misturado com bactéria morta por clorofórmio)	<i>Seriola quinqueradiata</i>	0,1 mL/peixe	20 e 25 g	Controlo: 0,1 mL de PBS T: 23 a 25 °C Sem adjuvante	Kawakami <i>et al.</i> , 1997
	Vacinas inativas (bivalentes e trivalentes) e vacinas inativadas (tetravalentes)	<i>Seriola lalandi</i> <i>Seriola Dumerili</i>	0,1 mL /peixe	<i>Lalandi</i> – 20 a 110 g <i>Dumerili</i> – 20 a 210 g	Adjuvante: Montanide ISA 763 A VG	Matsuura <i>et al.</i> , 2019
	Vacina da bactéria inativada	Truta arco-íris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	0,3 mL/peixe	100 g	Contra bactéria <i>Yersinia ruckeri</i> (Gram-negativa) Adjuvante: Montanide ISA 763 A VG T: 14°C Imunização: 2 semanas	Soltani <i>et al.</i> , 2016
Injeção intramuscular (i.m.)	Vacina de DNA	Perca-gigante ( <i>Lates calcarifer</i> )	20 µg (1 µg/µL) (2 µg / g peixe)	10 g	Bactéria: <i>Vibrio anguillarum</i> (Gram-negativa) T: 24°C Controlo: PBS estéril	Kumar <i>et al.</i> , 2007
	Vacina de DNA	Truta arco-íris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	0,1 µg (0,125 µg ou 0,05 µg/ g peixe)	0,8 ± 1,8 g	Tratamento para vírus da necrose hematopoiética infecciosa Adjuvante: 50 mL de PBS T: 12°C Imunização: 6 semanas	Corbeil <i>et al.</i> , 2000
	Vacina de DNA	Truta arco-íris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	25 ul de DNA (1,92 ug / g peixe)	13 g	Tratamento da doença VHS Adjuvante: PBS 10 mM e pH 7,2 Imunização: 52 dias	Lorenzen <i>et al.</i> , 1998
Vacinação oral	Vacina de DNA (CpG de DNA da bactéria <i>Vibrio anguillarum</i> )	Dourada ( <i>Sparus aurata</i> )	0,02 mL/ peixe	20 g	Ensaio T2: Contra Phdp; Administrada durante 5 dias, com 5 dias de descanso e novamente 5 dias de tratamento; Passado 15 dias foi dado um reforço (por imersão); T: superior a 18°C e inferior a 26°C.	Piazzon <i>et al.</i> , 2016
	Vacina de DNA	Perca-gigante ( <i>Lates calcarifer</i> )	1 mL/ g de ração	10g	Contra <i>Vibrio anguillarum</i> ; Utilização de nanopartículas de quitosano; T: 24°C Imunização: 21 dias	Kumar <i>et al.</i> , 2008