



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Mainara Adriane Tesser Kopp

**Análise da ação do paracetamol sobre os efeitos imunogênicos e reatogênicos
de uma nova vacina contra COVID-19 em modelo murino**

Florianópolis,
2024

Mainara Adriane Tesser Kopp

Análise da ação do paracetamol sobre os efeitos imunogênicos e reatogênicos de
uma nova vacina contra COVID-19 em modelo murino

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Orientador: Prof. Juliano Ferreira, Dr.
Coorientador: Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes, Dr.

Florianópolis,

2024

Kopp, Mainara Adriane Tesser

Análise da ação do paracetamol sobre os efeitos imunogênicos e reatogênicos de uma nova vacina contra COVID-19 em modelo murino / Mainara Adriane Tesser Kopp ; orientador, Juliano Ferreira, coorientador, Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes, 2024.

59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Hiperalgisia. 3. Proteínas S e N. 4. Desenvolvimento de Vacinas. 5. Hidróxido de Alumínio. I. Ferreira, Juliano. II. Mendes, Daniel Augusto Gasparin Bueno . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Mainara Adriane Tesser Kopp

Análise da ação do paracetamol sobre os efeitos imunogênicos e reatogênicos de uma nova vacina contra COVID-19 em modelo murino.

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Nara Lins Meira Quintão, Dra.
Instituição Universidade do Vale de Itajaí – UNIVALI

Prof. Fernando Spiller, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Prof. Juliano Ferreira, Dr.
Orientador

Florianópolis,
2024.

Este trabalho é dedicado aos jovens pesquisadores que, assim como eu, se aventuraram na jornada científica, compartilhando suas ideias, conhecimentos e paixões pela descoberta.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Juliano Ferreira, pela orientação durante a breve etapa do mestrado, agradeço sinceramente pela confiança, acolhimento, oportunidades e conhecimentos que fortaleceram a minha formação como cientista e ser humano. Você me inspira como professor e pesquisador.

À minha família, Antenor, Mari, Hérick, Maria e Márcia, expresso meu profundo agradecimento pelo apoio ao meu amor pela ciência. Mesmo nos momentos difíceis em que pensei em desistir, vocês estavam lá de alguma maneira para me ouvir, mesmo que à distância. Sabemos que muitas vezes não foi possível viajar para longe devido aos meus experimentos e aulas.

Agradeço às minhas colegas de laboratório, em especial à Roberta, pela amizade e por me ensinar e auxiliar nos meus experimentos, além dos momentos de desabafo, risadas e conversas. Obrigada, Ana, por compartilhar momentos divertidos e agradáveis, repletos de risadas e lanches. À Clarice, que veio de longe para o nosso laboratório, trazendo alegria e momentos únicos de divertimento e trocas de conhecimentos. Aos demais colegas que, em algum momento, fizeram parte do laboratório, contribuindo para a minha formação, assim como aqueles a quem tive a oportunidade de repassar meus conhecimentos. Agradeço imensamente aos amigos Weilher e Marcela, que me ajudaram em muitos momentos difíceis e compartilharam frustrações e vitórias.

Às minhas amigas Karollaine e Caroline, que estão comigo desde há muito tempo, ouvindo minhas reclamações e vibrando com as conquistas. À minha amiga Luisa, que sempre me apoiou, participou de todos os surtos e agora trilha sua jornada no mestrado e na segunda graduação, assim como eu. Obrigada a todos os meus amigos e conhecidos que, de alguma maneira, fizeram parte dessa jornada.

Quero expressar meu profundo agradecimento a Jonas, que sempre me inspirou a seguir a vida acadêmica como pesquisadora e professora. Sua passagem neste mundo foi tão breve em comparação ao que você tinha a oferecer às pessoas. Embora não esteja mais fisicamente presente, sua influência continua a guiar meu caminho acadêmico. Obrigada, Alice e Sergio, por todo apoio e carinho ao me receberem em sua família.

Ao Dr. Daniel Mendes e ao Prof. Dr. André Báfica, que aceitaram a minha ideia sobre esse tema e juntos conseguimos desenvolver uma pesquisa incrível, que agregou imensamente aos meus conhecimentos. À Eduarda, por me ajudar nos experimentos e compartilhar conhecimentos.

Aos professores Nara Quintão e José Santin, agradeço por aceitarem o convite para compor a banca e avaliar esta dissertação. Mas, principalmente, vocês foram responsáveis por me ensinar como fazer ciência desde a minha graduação. Receberam-me, acolheram-me e mostraram os caminhos que eu deveria seguir para me tornar uma cientista. Enfrentamos juntos as dificuldades, encontramos soluções, e vocês me ensinaram a não desistir diante dos resultados ruins. Ensinaram-me a enxergar a ciência por diferentes ângulos e moldaram-me como uma pessoa melhor. Vocês me inspiram de maneiras imensuráveis.

Expresso minha sincera gratidão por ter escolhido trilhar o caminho da pesquisa. A decisão de sair da zona de conforto em busca dos meus sonhos foi um marco significativo nesta jornada. Em retrospectiva, fico feliz por não ter desistido nos momentos difíceis, pois cada desafio enfrentado foi uma oportunidade de crescimento. O esforço e dedicação à ciência não apenas contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico, mas também para meu amadurecimento pessoal. Esta jornada não foi apenas sobre aquisição de conhecimento, mas sobre superar obstáculos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

Com a pandemia mundial de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, exigiu um rápido desenvolvimento de vacinas na tentativa de reduzir a taxa de mortalidade e morbidade. As vacinas induzem reações inflamatórias, conhecidas como reatogenicidade, que podem causar manifestações físicas como dor e febre. A administração de analgésicos antipiréticos, como o paracetamol, tornou-se comum para aliviar esses efeitos, mas estudos indicam que eles também podem alterar a imunogenicidade da vacina. O objetivo deste estudo foi verificar a possível ação do paracetamol sobre os efeitos imunogênicos e reatogênicos de uma vacina BCG recombinante (rBCG) em camundongos. O paracetamol ou seu veículo foram administrados na água de beber antes e durante a imunização com BCG ou rBCG e com Alum sem ou com proteína quimera em camundongos C57/Bl6. Foi evidenciado a produção significativa de anticorpos anti-proteína N, anti-RBD e anti-chimera em camundongos expostos a paracetamol (180 e 300 mg/kg/dia) e ao veículo no final do período de imunização de 42 dias. A administração dos agentes imunizantes induziram diversos comportamentos semelhantes à dor, como hiperalgesia e tigmotaxia, mas não alteraram o bem-estar dos animais tratados. O tratamento com paracetamol não foi capaz de reduzir os comportamentos semelhantes à dor induzidos pelos agentes imunizantes. O tratamento com paracetamol não alterou a reatogenicidade ou a imunogenicidade das vacinas rBCG/BCG em camundongos. Assim, na dose, na via de administração e nos tempos testados em nosso estudo, o uso de paracetamol não alterou a reatogenicidade ou a imunogenicidade da vacina rBCG/BCG em camundongos. Novos estudos com diferentes protocolos de administração e outros fármacos analgésicos devem ser realizados para melhorar a analgesia e o bem-estar animal em pesquisa não-clínica com imunizantes.

Palavras-chave: Hiperalgesia; Desenvolvimento de Vacinas; Hidróxido de Alumínio; proteínas S e N

ABSTRACT

The global COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus, has necessitated the rapid development of vaccines to reduce mortality and morbidity rates. Vaccines induce inflammatory reactions, known as reactogenicity, which can cause physical manifestations such as pain and fever. The administration of antipyretic analgesics such as paracetamol has become common to alleviate these effects, but studies indicate that they can also alter the immunogenicity of the vaccine.

The objective of this study was to examine the potential effects of paracetamol on the immunogenic and reactogenic responses of a recombinant BCG vaccine (rBCG) in mice. Paracetamol or its vehicle was administered in drinking water before and during immunization with BCG or rBCG, with or without Alum and with or without chimera protein, in C57/Bl6 mice. Significant production of anti-N protein, anti-RBD, and anti-chimera antibodies was observed in mice exposed to paracetamol (180 and 300 mg/kg/day) and the vehicle at the end of the 42-day immunization period.

The administration of immunizing agents induced several pain-like behaviors, such as hyperalgesia and thigmotaxis, but did not alter the overall well-being of the treated animals. Paracetamol treatment was unable to reduce pain-like behaviors induced by the immunizing agents. Moreover, paracetamol treatment did not alter the reactogenicity or immunogenicity of the rBCG/BCG vaccine in mice. Therefore, at the doses, route of administration, and times tested in our study, the use of paracetamol did not affect the reactogenicity or immunogenicity of the rBCG/BCG vaccine in mice. Further studies with different administration protocols and other analgesic drugs should be conducted to enhance analgesia and animal welfare in non-clinical research involving immunization agents.

Keywords: Hyperalgesia; Vaccine Development; Aluminum Hydroxide; S and N Proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de imunização.....	22
Figura 2: Esquema de tratamento com paracetamol e veículo	23
Figura 3: Período de avaliação da sensibilidade mecânica nos animais.....	25
Figura 4: Testes imunológicos.....	33
Figura 5: Avaliação da nidificação.....	34
Figura 6: Avaliação da sensibilidade mecânica (von Frey) e comportamento afetivo motivacional (CAM).....	38
Figura 7: Consumo de ração e líquidos durante testes comportamentais.....	40
Figura 8: Teste para avaliar distância percorrida e a velocidade média em Campo Aberto.....	43
Figura 9: Teste para avaliar mobilidade e imobilidade em Campo Aberto	45
Figura 10: Teste para avaliar número de entradas no quadrante central do Campo Aberto.....	47
Figura 11: Verificação da temperatura durante testes comportamentais	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES – Anti-inflamatórios Não Esteroides

ALUM – Hidróxido de Alumínio

APAP – Paracetamol

BCG – Bacilo de Calmette e Guérin

CAM – Comportamento Afetivo Motivacional

Chi – Proteína Chimera

COX – Ciclooxygenase

MERS – Síndrome Respiratória do Oriente Médio

rBCG – Bacilo de Calmette e Guérin recombinante

rBCG::qN45-206-S223-514 – Bacilo de Calmette e Guérin recombinante associado à proteína Chimera

SARS – Síndrome Respiratória Aguda Grave

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos Específicos	20
3 METODOLOGIA	20
3.1 Animais	20
3.2 Imunizantes e substâncias químicas	21
3.2.1 Bactérias, proteína quimérica e adjuvante	21
3.3 Imunização	22
3.4 Tratamento com Paracetamol	23
3.5 Avaliação de comportamentos relacionados à dor	24
3.5.1 Sensibilidade mecânica	24
3.5.2 Comportamento afetivo motivacional (CAM) relacionado à dor	26
3.5.3 Nidificação	26
3.5.4 Temperatura	27
3.5.5 Teste do Campo Aberto	27
3.6 Coleta de sangue	28
3.7 Testes imunológicos	29
3.7.1 ELISA	29
3.8 Análise estatística	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
4.1 Avaliações imunológicas	30
4.2 Nidificação	33
4.3 Avaliação de comportamentos relacionados à dor	34
4.4 Avaliação do consumo de ração e líquidos	39
4.5 Avaliação do campo aberto	41
4.5.1 Distância percorrida e velocidade média	41
4.5.2 Mobilidade e imobilidade	43
4.5.3 Tigmotaxia	46
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS	48
APENDICE A – AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA	58

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos, a humanidade tem enfrentado grandes epidemias de vírus patogênicos pertencentes à família Coronaviridae. Essas epidemias incluíram eventos significativos, como as epidemias de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) em 2002-2003 (Stadler *et al.*, 2003), a de Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012 (Mackay e Arden, 2015) e a pandemia COVID-19 que teve início em 2019 e continua a afetar o mundo (Cui, Li e Shi, 2019). Esses coronavírus caracterizam-se por provocar infecções respiratórias em mamíferos, embora os sintomas possam variar de acordo com o hospedeiro. Em seres humanos, ocorre comprometimento do trato respiratório e gastrointestinal, podendo evoluir para quadros mais graves, como pneumonia e broncopneumonia (Sharma, Ahmad Farouk e Lal, 2021).

O vírus SARS-CoV-2 possui algumas características que facilitam sua entrada nas células hospedeiras. A primeira delas é a presença de uma proteína espiculada conhecida como spike, localizada no envelope viral, que desempenha um papel crucial ao realizar a ligação vírus-hospedeiro (Jackson, Cody B. *et al.*, 2021). Essa proteína se liga ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) que estão presentes nas células humanas, por intermédio do domínio de ligação ao receptor (RBD). Essa interação é fundamental para a infecção pelo SARS-CoV-2 (Li, Wenhui *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2020). Além disso, a presença da proteína estrutural (N) também é relevante, pois desempenha uma função vital na replicação do vírus e estabilização do genoma viral, envolvendo o material genético (RNA) e formando a estrutura de nucleocapsídeo (Bai *et al.*, 2021; Jackson *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que o conhecimento detalhado das proteínas S, N e o domínio RBD é fundamental para a compreensão da biologia do vírus e tem se tornado um alvo interessante nas pesquisas, desenvolvimentos de vacinas e abordagens terapêuticas contra o COVID-19. O desafio contínuo é otimizar ainda mais a resposta imunológica induzida pelas vacinas, aumentando sua eficácia, durabilidade e capacidade de proteger contra variantes emergentes do vírus.

A vacinação desempenha um papel fundamental na prevenção e no controle de doenças infecciosas, sendo considerada uma das intervenções de saúde pública mais eficazes já desenvolvidas (Jiang *et al.*, 2023; Rey-Jurado *et al.*, 2018). Uma das vacinas mais seguras do mundo, a BCG, amplamente utilizada na prevenção da

tuberculose grave, principalmente em crianças. Desenvolvida por Calmette e Guérin (1921) e introduzida no Brasil em 1925 (Benévolo-de-Andrade *et al.*, 2005), a BCG é um exemplo de como a imunização pode contribuir para a saúde pública.

Ao ser administrada, as vacinas tradicionais podem conter diversas partículas de um microrganismo na forma inativada ou atenuada, que desencadeiam uma resposta imunológica para reconhecer e combater agentes infecciosos específicos, sem desenvolver a doença no paciente e essa resposta é conhecida como imunogenicidade (Mahanty, Prigent e Garraud, 2015; Sethu *et al.*, 2012). Além disso, a antigenicidade também participa desse processo, o qual se refere à capacidade da estrutura molecular do antígeno de interagir com moléculas específicas do sistema imunológico, como os receptores dos linfócitos B e T e então desencadear uma resposta (Delves *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2022).

Algumas vacinas induzem reações inflamatórias conhecidas como reatogenicidade que é desencadeada pela resposta imune inata frente ao antígeno e/ou adjuvante administrado, que podem causar manifestações físicas como dor no local da injeção, inchaço, vermelhidão ou reações sistêmicas como febre, mialgia e dor de cabeça, esses sintomas surgem logo após a vacinação e geralmente perduram por até 48 horas (Hervé *et al.*, 2019; Pasquale, Di *et al.*, 2016). A reatogenicidade pode afetar a decisão da pessoa sobre receber vacinas, justamente por esses efeitos que podem deixá-la apreensiva, conseqüentemente, o sujeito pode negar a realização de doses reforços, o que reduz a cobertura vacinal na população (Pasi, Babu e Kallidoss, 2023).

As atuais vacinas para a COVID-19 representam um marco na luta contra a pandemia, por exemplo, a utilização de tecnologias inovadoras, como as vacinas da Pfizer-BioNTech e Moderna que utilizam o RNA mensageiro (mRNA) e as que foram baseadas em vetores virais como a AstraZeneca (Bernal *et al.*, 2021; Meo *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019). Entretanto, essas tecnologias muitas vezes apresentam características e limitações significativas (p.ex. a instabilidade de vacinas mRNA acaba dificultado o transporte e armazenamento) que impulsionam a pesquisa e o desenvolvimento de novas vacinas (Meo *et al.*, 2021).

A capacidade de uma vacina induzir uma resposta imunológica eficaz e duradoura é de suma importância durante a criação de um novo imunizante, principalmente quando surge preocupações quanto a imunogenicidade em determinados grupos de pessoas, como os idosos, imunocomprometidos e crianças

(Ghimire, 2015; Park, J. W. *et al.*, 2021). Então a eficácia pode ser reduzida em determinadas populações, o que destaca a necessidade de vacinas adaptadas pensando nessas pessoas (Sharif *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2022). Além disso, ainda não se tem dados concretos sobre a duração da imunidade conferida pelas vacinas desenvolvidas para a pandemia da COVID-19, bem como a capacidade de abranger as novas variantes do vírus.

Pensando nisso, o aperfeiçoamento de uma vacina já existente, como a BCG, pode oferecer uma abordagem promissora para enfrentar os desafios apresentados pelas atuais vacinas para o COVID-19. A BCG, amplamente estudada ao longo de muitos anos, demonstrou capacidade de induzir resposta imunológica robusta, especialmente na forma de imunidade treinada, ativando células inatas que secretam fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 β (IL-1 β) e citocinas (Gong *et al.*, 2021, 2022). Além disso, é possível utilizar modificação genética (BCG recombinante) para conferir a proteção heteróloga, ou seja, proteção contra outros tipos de infecções diferentes da tuberculose.

A imunidade treinada é um conceito relativamente novo que se refere à capacidade do sistema imunológico de se adaptar e reagir rapidamente a infecções recorrentes após ser exposto a determinados estímulos (Divangahi *et al.*, 2021; Netea *et al.*, 2020). Esses estímulos incluem, por exemplo, vacinas, infecções prévias e até mesmo mudanças na dieta. Isso ocorre quando as células do sistema imunológico passam por mudanças epigenéticas que resultam em alterações na expressão de genes envolvidos na resposta imunológica, respondendo de forma eficiente aos patógenos (Dagenais, Villalba-Guerrero e Olivier, 2023; Divangahi *et al.*, 2021; Netea *et al.*, 2020; Saeed *et al.*, 2014).

As principais células envolvidas na imunidade treinada são as mieloides, incluindo monócitos, macrófagos e dendríticas. Elas possuem receptores de reconhecimento de padrões, como TLRs (receptores *toll-like*) e NLRs (receptores *NOD-like*), que reconhecem componentes moleculares de patógenos e iniciam uma resposta imunológica (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012, 2014). As células mieloides também produzem citocinas, como IL-1 β e TNF- α , que ativam outras células imunológicas e induzem uma resposta inflamatória (Walk *et al.*, 2019).

Por exemplo, estudos mostraram que a vacina BCG, originalmente desenvolvida para prevenir a tuberculose, pode induzir uma resposta imunológica treinada que também oferece proteção contra outras doenças infecciosas, como a

malária e a sepse (Aaby *et al.*, 2011; Arts *et al.*, 2018; Netea *et al.*, 2016; Walk *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2023).

O estudo de Kleinnijenhuis *et al.*, (2012), reforça que camundongos que receberam a vacina BCG e foram desafiados com uma injeção de *Candida albicans* apresentaram alta taxa de sobrevivência quando comparados com o controle que não foram vacinados com BCG. Eles foram capazes de ativar respostas inespecíficas contra infecções não micobacterianas, utilizando o mecanismo de imunidade treinada.

Com base nas informações mencionadas neste estudo, bem como na longa história de uso da vacina, segurança reconhecida e a capacidade comprovada de auxiliar na prevenção da COVID-19 por meio de mecanismos de imunidade heteróloga, a BCG é um vetor adequado para expressar os antígenos do SARS-CoV-2 e produzir resposta efetiva contra o COVID-19, justamente pelo seu potencial como uma ferramenta eficaz para entrega de antígenos virais, bacterianos e parasitários (Du *et al.*, 2023; Gupta, 2020).

As vacinas recombinantes são desenvolvidas usando tecnologias da engenharia genética, na qual são induzidas a produzir proteínas específicas do patógeno que são capazes de estimular uma resposta imunológica eficaz (Matsuo e Yasutomi, 2011; Zheng *et al.*, 2015). Além da produção de vacinas, a tecnologia recombinante vem sendo utilizada em imunoterapia, como o uso de rBCG no tratamento padrão para a forma não invasiva de câncer muscular de bexiga (NMIBC), as aplicações intravesicais reduzindo a recorrência e a progressão da doença (Ahn e McKiernan, 2013; Andrade *et al.*, 2010).

Em relação ao desenvolvimento de vacinas recombinantes contra o SARS-CoV-2, podemos destacar que ambas as proteínas, S e N, são alvos para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico e vacinas terapêuticas e/ou preventivas, pois apresentam epítomos que induzem a ativação de células B e T do sistema imune (Oliveira, Magalhães e Homan, 2020; Queiroz, *et al.*, 2020). Ademais, estudos apontam a capacidade de geração de anticorpos neutralizantes com alta afinidade para a porção RBD da proteína S (Yang *et al.*, 2020). Em suma, estes dados em conjunto demonstram duas regiões críticas do agente SARS-CoV-2 que podem servir como alvos vacinais, gerando uma resposta imune prolongada e anticorpos neutralizantes.

Elas também são utilizadas para potencializar a imunogenicidade, por exemplo, a associação do antígeno a um adjuvante molecular, como o DNA

bacteriano (Bachmann e Zinkernagel, 1996; Vogel e Bachmann, 2019). Algumas vacinas que utilizam apenas componentes imunologicamente relevantes, como proteínas recombinantes, geralmente possuem uma resposta imunogênica limitada, provavelmente devido à ausência dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que estão presentes nas vacinas tradicionais (Lambrecht *et al.*, 2009; Reed, Orr e Fox, 2013). De tal modo, a utilização de adjuvantes é importante para auxiliar a produção de respostas imunes específicas, por meio de diversos mecanismos, como ativação do inflamassoma, o recrutamento de celular NK e outros (Aimanianda *et al.*, 2009; McKee *et al.*, 2009).

Os adjuvantes à base de alumínio mais utilizados são os fosfatos de alumínio (AP) e hidróxido de alumínio (AH) e são amplamente utilizados devido às suas diferentes composições químicas, que influenciam diretamente a ligação com o antígeno (Hem, Johnston e HogenEsch, 2007; HogenEsch, 2012). Foi demonstrado que as partículas de sais de alumínio são capazes de induzir a produção de citocinas pro-inflamatórias através dos inflamossomas (Kuroda *et al.*, 2011), desempenhando um papel crucial na imunogenicidade ao formarem um complexo de ligação adjuvante-antígeno (He, Zou e Hu, 2015; Kuroda *et al.*, 2011). Já foram aplicadas inúmeras vacinas com sucesso em humanos, gerando redução nos custos para produção e segurança (Kuroda *et al.*, 2011; Kuroda, Coban e Ishii, 2013; Netea *et al.*, 2020).

Recentemente foi descoberta uma nova vacina para a prevenção da COVID-19, a mesma utilizada nesse estudo, que explora os efeitos da imunidade treinada pela vacina BCG usando uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis*. Através da recombinação genética e análise imunoinformática, no laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob supervisão do Prof. Dr. Sérgio C. Oliveira, realizou-se a junção com uma proteína quimérica composta pelos epítomos imunogênicos derivados das proteínas S e N do SARS-CoV-2 (Mambelli *et al.*, 2023). Os efeitos protetores da nova vacina rBCG (rBCG-ChD6) contra infecção por SARS-CoV-2 nos pulmões de camundongos K18-hACE2 foram demonstrados utilizando uma única dose de rBCG-ChD6 e um reforço usando Alúmen com a proteína quimérica (rChimera). A administração ocorreu via subcutânea na nuca, com uma concentração de 1×10^6 UFC/animal da rBCG, e o reforço com 100 µg de Alúmen e 25 µg de rChimera. A imunização com rBCG no dia 0, seguida pelo reforço com a proteína no dia 30, induziu respostas imunológicas do

tipo IgG e citocinas IFN- γ e IL-6, que foram analisadas 50 dias após a primeira imunização (Mambelli *et al.*, 2023).

Para desenvolver uma vacina, as agências regulatórias exigem a realização de testes não clínicos como um pré-requisito essencial antes de avançar para os testes clínicos que são estabelecidos por várias leis e resoluções normativas, incluindo a Lei Arouca (Lei nº11.794/2008). Essa legislação estabelece procedimentos para o uso ético de animais na pesquisa científica, incorporando os princípios dos 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) que se referem às estratégias de reduzir, refinar e substituir o uso de animais.

A ANVISA é o órgão responsável pela avaliação e aprovação de pesquisas clínicas para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, incluindo vacinas, conforme estabelecido pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 55/2010. Esses testes não clínicos incluem a caracterização do produto, estudos de imunogenicidade, reatogenicidade e outros testes de segurança em animais, que devem ser realizados antes do teste clínico em humanos (Andrade *et al.*, 2016). Pensando no bem-estar animal durante as realizações dessas pesquisas, a legislação atual exige a integração de normas que garantam a qualidade de vida dos animais e os 3Rs (Sert, du *et al.*, 2020; Singh, 2012).

Sabendo que as vacinas podem causar reatogenicidade, tem sido sugerido o uso de fármacos analgésicos e antipiréticos que possam reduzir as manifestações locais e sistêmicas da resposta inflamatória à vacinação, incluindo dor, febre, inchaço ou mialgia (Hervé *et al.*, 2019). Para isso, estudos são necessários para encontrar medicamentos que não alterem a imunogenicidade, mas que reduzam os sintomas da reatogenicidade em roedores utilizados nos testes de novas vacinas e potencialmente adaptá-las para uso humano.

No início da pandemia, o medicamento de escolha era ibuprofeno, mas estudos em modelos animais e *in vitro*, relacionaram o uso do mesmo com o aumento do risco de infecção e agravamento da doença causada pelo coronavírus, pois, o ibuprofeno aumenta a expressão de ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2), no qual é o receptor para SARS-CoV-2 (Hofmann *et al.*, 2004; Micallef *et al.*, 2020; Qiao *et al.*, 2015). Permanecendo inviável a prescrição para tratar os efeitos adversos à vacina.

Levando em consideração as contraindicações para o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), a administração de analgésicos antipiréticos

como o paracetamol para aliviar os efeitos adversos da vacinação como a dor e febre tornou-se comum (Culbreth *et al.*, 2019). No entanto, pesquisas evidenciam que alguns analgésicos podem reduzir os efeitos imunogênicos de algumas vacinas (Prymula *et al.*, 2009; Saleh, Moody e Walter, 2016).

O estudo de Kolstad *et al.*, (2012) avaliou a administração de paracetamol (300 mg/kg) no controle da dor após a imunização de camundongos utilizando o adjuvante completo de Freund (CFA) ou adjuvante incompleto de Freund (IFA), o analgésico foi fornecido na água, realizando um pré-tratamento 2 dias antes da imunização e depois seguiu por 3 dias após. Demonstrou que não houve a diminuição na produção de anticorpos e que o analgésico foi capaz de reduzir algumas alterações comportamentais (atividade locomotora) causada pela imunização. Em contrapartida, Culbreth *et al.*, (2019) relatam a alteração da resposta imunológica no início da imunização em camundongos, usando uma vacina atenuada de *Yersinia pestis*, utilizando o paracetamol na água *ad libitum* por 48h após a imunização. Mesmo com a redução da resposta imunogênica nos dias iniciais da imunização, os animais ainda foram protegidos contra a infecção.

O paracetamol é possui propriedades farmacológicas que atuam na inibição da síntese de prostaglandinas, semelhantes aos inibidores da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), realizada principalmente no sistema nervoso central. Colaborando com seus efeitos antipiréticos e analgésicas (Graham *et al.*, 2013). Outros AINEs como o meloxicam e buprenorfina demonstraram eficácia na analgesia e não alteraram a resposta imunológica de uma vacina contendo CFA ou IFA (Kolstad *et al.*, 2012).

Apesar dos dados encontrados na literatura, não existem relatos do uso de paracetamol no desenvolvimento não clínico de novas vacinas para o COVID-19.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi verificar a possível ação do paracetamol sobre os efeitos imunogênicos e reatogênicos da vacina rBCG::qN45-206-S223-514 em camundongos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a possível ação do paracetamol sobre os efeitos reatogênicos (sinais de inflamação) da vacina rBCG::qN45-206-S223-514 e sobre o bem-estar dos camundongos.
- Verificar a possível ação do paracetamol sobre os efeitos imunogênicos da vacina rBCG::qN45-206-S223-514 em camundongos.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme a normatização atual do CONCEA e do CEUA/UFSC. Os experimentos com animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e receberam a aprovação sob o parecer nº 9566210722. Esses experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX), localizado no primeiro andar do Departamento de Farmacologia do CCB na UFSC.

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), linhagem C57BL/6, do sexo masculino com idade compreendida entre 6 e 8 semanas e pesando entre 10 e 25 gramas. Os animais foram mantidos em estantes micro isoladoras, acomodados em caixas pequenas de polipropileno transparente com dimensões de 13x20x35 cm. A alimentação oferecida consistiu em água filtrada e ração *ad libitum*, inclusive no período de recebimento do tratamento com paracetamol na água (24 horas antes da imunização, no dia, 24 e 48 horas após). O controle dos ciclos claro/escuro (12/12 horas) e da temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) foi rigorosamente mantido. As trocas dos animais foram realizadas semanalmente pelo próprio experimentador em capela de fluxo laminar, e os camundongos receberam tubos PVC (5 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento), algodão e sementes de girassol como enriquecimento ambiental. Os animais foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental da UFSC (LAFEX).

O cálculo do N amostral foi realizado utilizando o software GPower, no qual utiliza informações como a média e desvio padrão de cada grupo, tipo de teste que será realizado para os resultados, nível de significância e o poder. O tamanho da amostra foi calculado baseando-se no teste previamente definido como desfecho primário, usualmente a sensibilidade mecânica verificada com filamentos de von Frey. O nível de significância utilizado será de 5%, poder de teste 90%, sendo o teste de hipótese bicaudal, é estimada considerando-se o desvio padrão (baseado em dados prévios de estudo-piloto), e a diferença a ser detectada entre as médias dos grupos (pelo menos 30%)(Armitage, P e Geoffrey Berry, J. N. S, 1987). Deste modo, estudos-pilotos conduzidos em nosso laboratório revelaram, para o desfecho primário em questão, um desvio padrão médio de 0,5, e uma diferença a ser detectada entre os grupos de 0,6 gramas (pelo menos 30%). Diante desses dados e considerando o nível de significância e poder de teste acima descritos, estima-se o tamanho mínimo da amostra seja de 6 animais, a fim de garantir a validade dos experimentos, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas poderão existir, nem tão pouco estar observando diferenças onde elas não poderão existir.

3.2 IMUNIZANTES E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

3.2.1 Bactérias, proteína quimérica e adjuvante

As bactérias BCG Danish (denominada BCG) utilizadas nos grupos controles, foram gentilmente doadas pelo laboratório de imunobiologia (Lidi) em colaboração com o Prof. Dr. André Báfica e Dr. Daniel Mendes. As bactérias BCG recombinantes com a proteína rBCG::qN45-206-S223-514 (denominada rBCG) e apenas a proteína quimérica qN45-206-S223-514 (nomeada como Chimera) foram desenvolvidas e fornecida pelo Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob supervisão do Prof. Dr. Sérgio C. Oliveira, a mesma utilizada no estudo de Mambelli et al., (2023), no qual descrevem todos os passos realizados para o desenvolvimento da vacina recombinante e a produção da proteína quimérica. A dose de proteína utilizada nesse experimento foi de 10 µg/animal. O adjuvante utilizado Alum (Al(OH)₃ - SERVA™) foi adquirido comercialmente (6,5 mg/ml) e utilizado na dose de 100 µg/animal, determinada anteriormente em conjunto com dados obtidos pelo laboratório Lidi.

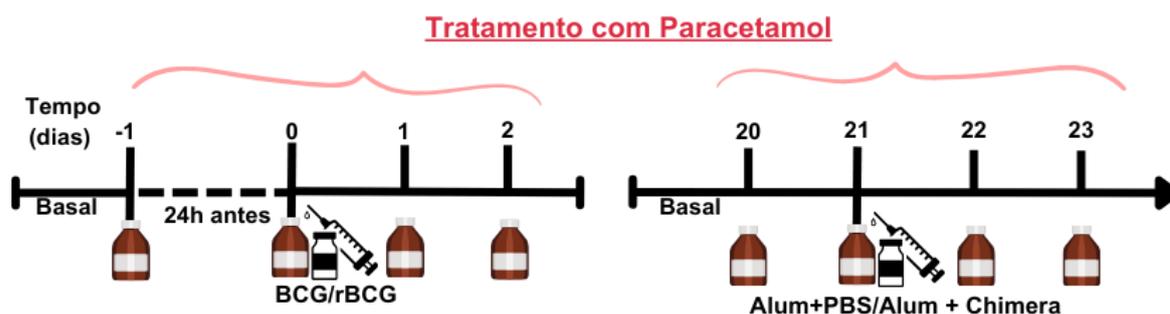
flanela para que somente a perna esquerda ficasse exposta e o animal recebesse a injeção (30 µl) na região do quadríceps femoral.

Nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 foram realizadas coletas sanguíneas para obtenção da fração correspondente ao soro, por meio de punção da veia submandibular. Essa técnica foi necessária neste estudo, pois a avaliação de anticorpos é considerada um biomarcador promissor contra SARS-CoV-2 (Golde, Gollobin e Rodriguez, 2005).

3.4 TRATAMENTO COM PARACETAMOL

No presente experimento, o paracetamol foi avaliado como uma possível substância capaz de promover a profilaxia e a melhoria do desconforto ocasionado pelos efeitos adversos da vacinação, tais como febre, dor e inflamação, colaborando para o bem-estar animal e humano.

Conforme ilustrado no esquema (Figura 2), os animais receberam paracetamol *ad libitum* na água, 24 horas antes da primeira imunização (dia 0), seguido dos dias 1 e 2 posteriores à imunização. Durante a administração, as caixas foram manuseadas com cuidado, de forma a evitar perda do conteúdo. Esse método de administração, prático e menos invasivo para os animais, proporciona segurança e minimizou o estresse e o manuseio (Culbreth *et al.*, 2019).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2: Esquema de tratamento com paracetamol e veículo: Tratamento com paracetamol realizado em camundongos machos C57BL/6. A administração na água (*ad libitum*) ocorreu no dia anterior a 1ª imunização (nomeado como -1), no dia da imunização (dia 0) e dias 1 e 2 após. O esquema de tratamento foi seguido para o reforço. O grupo controle (veículo) utilizou uma formulação contendo os veículos presentes no xarope de paracetamol. O consumo basal de líquidos foi mensurado nos dias anteriores ao tratamento.

A dose recomendada de paracetamol oral é de 110 – 305 mg/kg (Culbreth *et al.*, 2019; Flecknell, 1984; Saleh, Moody e Walter, 2016). Para atingir a dose adequada

entre 180 e 300 mg/kg/dia para os camundongos, utilizamos o paracetamol infantil com sabor de frutas, sendo 7,5 mL (160 mg/ 5 mL, TYLENOL®, Johnson & Johnson) adicionados em 200 mL de água filtrada. A dosagem do fármaco foi calculada de acordo com dados de consumo médio de água dos camundongos previamente mensurados pelo nosso laboratório de farmacologia experimental (LAFEX).

Foi empregado um controle manipulado contendo todos os veículos presentes no paracetamol infantil, com o mesmo cheiro e sabor, porém sem o princípio ativo de paracetamol. A mensuração do consumo basal de líquidos foi realizada antes de iniciar o tratamento. Com o objetivo de manter um rigoroso controle de consumo, o volume de todas as soluções medicamentosas foram medidas com o auxílio de uma proveta volumétrica antes e depois da reposição de água.

3.5 AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DOR

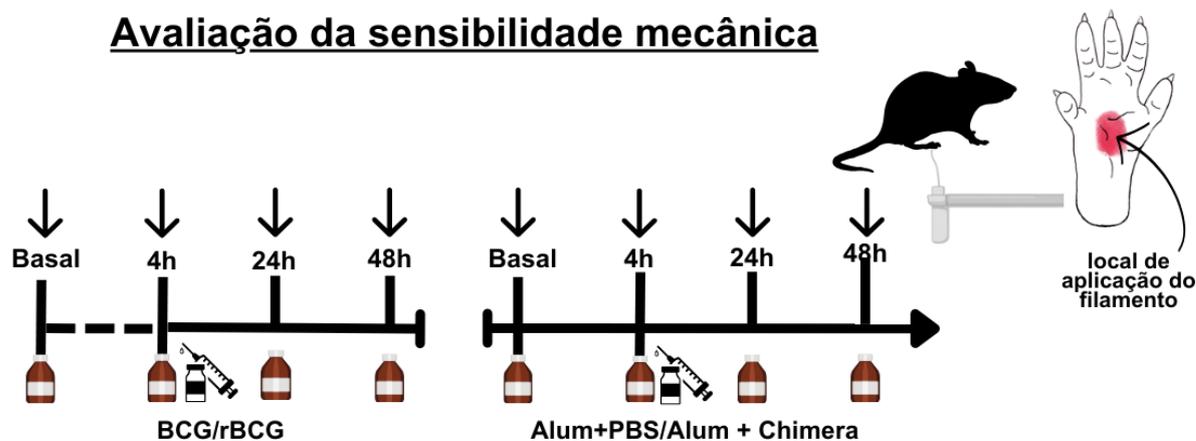
O presente estudo utilizou experimentos comportamentais para avaliar a nocicepção em resposta a diferentes estímulos. O teste de von Frey foi empregado para avaliar a sensibilidade mecânica evocada por estímulos. O teste de comportamento afetivo motivacional (CAM), que avalia também a sensibilidade relacionada à parte emocional da dor, foi utilizado como teste secundário ao von Frey, realizado durante as aplicações dos filamentos. O teste de construção de ninho foi empregado para avaliar a parte motivacional da dor, onde os animais com nocicepção tendem a deixar de realizar tarefas, como a de construir o ninho. Todos os animais que receberam a imunização por via intramuscular e passaram pelos testes de von Frey (utilizado como desfecho primário para o cálculo do n), CAM, construção do ninho e campo aberto. Para auxiliar na verificação da qualidade de vida dos animais, foi realizada a medição da temperatura corporal dos animais utilizando um termômetro digital de superfície.

3.5.1 Sensibilidade mecânica

A avaliação da sensibilidade mecânica foi realizada com o uso de filamentos de von Frey (Chaplan, Pogrel e Yaksh, 1994). A diminuição no limiar de dor mecânica (hiperalgesia) ou o aumento no limiar foram avaliadas com filamentos de 0,008 - 4 g. O limiar de 50% de resposta foi determinado pelo método de up-and-down de Dixon

(1980), de acordo com Chaplan, Pogrel e Yaksh, (1994). Para isso, a pata traseira dos animais foi estimulada com uma série de filamentos de von Frey (Figura 3).

Avaliação da sensibilidade mecânica



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 3: Período de avaliação da sensibilidade mecânica nos animais: As avaliações ocorreram no basal, 4h, 24h e 48h após 1ª imunização. As mesmas medidas se repetiram nos períodos do reforço vacinal em todos os grupos experimentais.

O primeiro filamento utilizado foi aquele que normalmente era capaz de evocar a resposta de retirada em 50% dos animais testados (0,4 g). O filamento foi aplicado até que existisse uma curva no fio. Na ausência de retirada da pata, a resposta foi considerada negativa, e o próximo filamento, mais calibroso, foi então utilizado. No caso de uma resposta de retirada positiva, o filamento imediatamente menos calibroso foi então aplicado. Foi considerada como resposta positiva a retirada da pata do contato com o filamento ou comportamento de sacudir ou lambar a pata no momento ou imediatamente após a estimulação. Em casos de deambulação ou de movimentos não relacionados à resposta nociceptiva no momento da aplicação do filamento, a resposta foi considerada ambígua, e foi realizada nova estimulação com um intervalo de 1 minuto. Foram realizadas 6 medidas, com um intervalo de aproximadamente 1 minuto entre cada uma. No caso de 6 respostas positivas desde a primeira aplicação, o teste foi finalizado (Chaplan, Pogrel e Yaksh, 1994). O conjunto de 6 respostas obtido foi utilizado para o cálculo do limiar de 50% de resposta (Dixon, 1965), conforme mostrado a seguir:

$$\text{Limiar 50\% (g)} = 10^{[X + (K \cdot \delta)]}$$

Onde:

X = valor do último filamento de von Frey usado (em log);

K = valor tabelado para o padrão de respostas positivas/negativas obtidas (DIXON, 1965);

δ = diferença média (em log) entre os filamentos.

O protocolo realizado neste trabalho consistiu em avaliar todos os animais que receberam o protocolo de imunização, ou seja, todos os grupos experimentais, com o teste de von Frey nos seguintes momentos: basal, 4 horas, 24 horas e 48 horas após as injeções com rBCG/BCG e reforço vacinal.

3.5.2 Comportamento afetivo motivacional (CAM) relacionado à dor

Nesse teste, os animais foram ambientados por 30 minutos em caixas de acrílico, separados individualmente, sobre uma plataforma cuja superfície de malha de arame permitiu o acesso às patas dos animais. Após o período de ambientação, o procedimento foi iniciado, o qual consistiu em observar a pata do animal por um período de 1 minuto imediatamente após a aplicação de cada filamento de von Frey. De acordo com a posição da pata durante o período de observação, três escores diferentes foram atribuídos: Escore 0, quando a pata do animal tocava completamente a superfície da plataforma; escore 1, quando a superfície plantar do animal tocava parcialmente ou com a porção lateral da pata; escore 2, quando a pata se elevava e o animal não tocava a superfície da plataforma; escore 3, quando o animal chacoalhava, lambia ou mordida a pata.

Como foi realizada uma medida após cada aplicação do filamento de von Frey, ao final do teste tivemos um total de 6 medidas. O resultado foi expresso como o somatório dos escores obtidos nas 6 medidas (Corder *et al.*, 2017; Xu e Brennan, 2010). Essas avaliações ocorreram em conjunto com as medidas do teste de von Frey, em todos os grupos experimentais, sendo considerada uma avaliação secundária ao teste de von Frey.

3.5.3 Nidificação

A nidificação (Nest Building) é um tipo de enriquecimento ambiental que avaliou a capacidade dos camundongos de construir seus ninhos utilizando pedaços de algodão fornecidos (Deacon, 2006). A construção dos ninhos demonstra a qualidade de vida desses animais e se estavam confortáveis em seu habitat, resultado de menor estresse.

A construção dos ninhos foi pontuada de acordo com seu desenvolvimento (1-5), sendo cada pontuação indicativa da qualidade do ninho. Quanto maior a pontuação, melhor a qualidade do ninho. As classificações foram: 1 para ninhos não formados, 2 se o camundongo levou o algodão para o local de iniciação do ninho e formou uma cavidade rasa, 3 se o camundongo formou paredes identificáveis semelhantes a uma "tigela", 4 se foi possível criar uma cúpula incompleta, onde as paredes estavam altas, mas não fecharam completamente a toca, e 5 onde era possível observar uma cúpula completa com paredes fechadas, com apenas o orifício de saída do animal visível (Burlingame, Gaskill e Lofgren, 2021; Deacon, 2006; Hess *et al.*, 2008).

Neste estudo, o teste de nidificação foi conduzido antes do pré-tratamento para a obtenção do basal, no dia 0 e novamente nos dias 1,2 e 3 após a imunização. O teste foi repetido para o reforço da imunização seguindo o mesmo protocolo, utilizando aproximadamente 2 gramas de algodão por animal.

3.5.4 Temperatura

A avaliação da temperatura corporal é útil como indicador de bem-estar animal. Os camundongos tendem a aumentar a temperatura corporal quando são submetidos a situações estressantes (Adriaan Bouwknecht, Olivier e Paylor, 2007). A utilização de termômetro de superfície reduz o manuseio direto do animal, o desconforto e riscos ocasionados por outros métodos mais invasivos, como a termometria retal (Blenkuš *et al.*, 2022; Mei *et al.*, 2018).

Para auxiliar na verificação da qualidade de vida dos animais, foi realizada a medição da temperatura corporal dos animais utilizando um termômetro digital de superfície no dorso do animal no período de basal, 4h, 24h e 48 horas na 1ª imunização e reforço vacinal.

3.5.5 Teste do Campo Aberto

Após a 1ª imunização e reforço vacinal, no período de 4h, 24h e 48h os animais foram submetidos ao modelo comportamental de campo aberto, onde os camundongos foram colocados no centro de um aparato quadrado medindo 30x30 cm

e com paredes de 40 cm de altura feita de acrílico preto, com o chão dividido em quadrantes. O número de quadrantes cruzados, velocidade média, número de entradas no quadrante central, tempo imóvel e móvel pelos animais foram mensurados em um intervalo de 5 minutos (300s), com o auxílio do software Any-Maze™ (versão 7.16, Stoelting Co., Wood Dale, EUA). O software detecta o formato do corpo do animal com base no contraste e nas seleções específicas nas configurações. O objetivo deste teste foi avaliar a atividade exploratória, tigmotaxia e possíveis alterações comportamentais induzidas pela imunização e/ou tratamento.

A tigmotaxia avalia o comportamento de busca de abrigo para evitar predadores. Os roedores normalmente evitam áreas abertas e buscam permanecer com o corpo e vibrissas em contato com a parede (Zhang *et al.*, 2021). Esse comportamento pode ser observado em situações de estresse e dor, como a exposição à vacinação.

3.6 COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue antes e após o processo de imunização, para obtenção da fração correspondente ao soro, ocorrerá por punção da veia submandibular. Esta prática é simples e rápida, visto que é possível obter uma quantidade de sangue significativa sem impactar no bem-estar do animal (Golde, Gollobin e Rodriguez, 2005). Para isso, o animal foi anestesiado com isoflurano e contido gentilmente de maneira que a cabeça fique firme e expondo a lateral da face do animal, serão utilizadas lancetas de 4.0 – 5.0 mm para puncionar a veia submandibular localizada na região intermediária entre a porção caudal da mandíbula e a orelha do animal, coletando a quantidade máxima de 50 µL (microlitros) e depois será realizada a hemostasia por compressão com a gaze no local da punção (Golde, Gollobin e Rodriguez, 2005). Esta técnica torna-se necessária neste estudo, pois a avaliação de anticorpos é considerada um biomarcador promissor, que pode servir como um correlato quantificável de proteção contra uma infecção ou reinfecção com SARS-CoV-2 (Earle *et al.*, 2021).

Foi seguido os critérios de ponto final humanitário, realizamos a eutanásia utilizando o método físico de exsanguinação nos animais previamente anestesiados com isoflurano inalatório. Para a confirmação da morte do animal, foram analisados parâmetros como: I. Ausência de movimentos respiratórios; II. Ausência de batimentos

cardíacos, através da utilização de estetoscópio; III. Ausência de pulsação; IV. Mucosas hipocoradas; V. Perda de reflexo córneo-palpebral.

3.7 TESTES IMUNOLÓGICOS

3.7.1 ELISA

Os testes realizados para detecção dos níveis de Imunoglobulinas anti-proteína N, anti-RBD e anti-chimera em camundongos expostos a paracetamol e ao veículo, foram seguidos de acordo com a padronização do laboratório de imunobiologia do Prof. Dr. André Báfica.

Resumidamente, foram preparadas placas de alta adsorção, sendo sensibilizadas com 3 ug/mL de proteína N, 1 ug/mL de RBD e 3 ug/mL de chimera, em câmara úmida *over night*. Uma solução de bloqueio composta por PBS 1x, Tween 0.05% e BSA 2% foi utilizada por um período de 1 hora. As amostras de soro (1:100) provenientes de 12 camundongos (sendo 6 expostos ao paracetamol e 6 expostos ao veículo) foram adicionadas às placas sensibilizadas e incubadas por 24 horas. Para a marcação secundária, empregou-se o anticorpo Anti-IgG de camundongo conjugado com HRP na diluição de 1:5000, com incubação de 1 hora e 30 minutos. Entre cada etapa foi realizada a de 2 a 3 lavagem da placa com solução de PBS (pH 7,4) com 0,05% de Tween 20. Em seguida, o substrato TMB foi adicionado e incubado por 10 minutos para N e RBD, e por 17 minutos para Chimera, sendo posteriormente a reação parada com HCl 1N. A leitura da densidade óptica (OD) foi realizada a 450 nm.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software GraphPad (Prism versão 9) foi utilizado para calcular a significância estatística ao longo do estudo. O teste de Grubbs foi aplicado para detecção de outliers (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Os valores discrepantes foram removidos da análise estatística e dos gráficos. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

Para nocicepção mecânica e medidas de AMB, todos os grupos foram comparados usando Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores com teste post hoc de comparações múltiplas de Dunnett para comparações entre basal e veículo

(representado pelo asterisco). Para comparações entre veículo versus tratamento APAP foi utilizado o post hoc Tukey (representado pela cerquilha). Para atender às suposições da ANOVA, os dados de hiperalgesia mecânica foram transformados em log antes da ANOVA.

Os outros parâmetros analisados seguiram as mesmas regras utilizando ANOVA de duas vias com teste post hoc de Dunnett e/ou Tukey. Para os resultados imunológicos as análises com dois grupos foram realizadas usando o teste t de Student para dados paramétricos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 AVALIAÇÕES IMUNOLÓGICAS

A avaliação do potencial de interações de um medicamento na resposta imunologia de uma vacina é de grande importância, pois permite garantir a eficácia e segurança do processo vacinal. Além disso, resultados positivos podem promover a adesão aos programas de imunização, ao minimizar os impactos adversos, como a reatogenicidade, tornando o processo mais seguro e eficiente (Pasi, Babu e Kallidoss, 2023).

Uma pesquisa indicou que a administração profilática de paracetamol, foi capaz de reduzir a resposta imune de adultos contra a hepatite B (Doedée *et al.*, 2014). No estudo randomizado de Jackson *et al.*, (2011), observou-se um efeito prejudicial inesperado da profilaxia com paracetamol nas respostas imunológicas aos antígenos da vacina. Embora a maioria das crianças que recebeu paracetamol tenha apresentado uma resposta imunológica que se acredita estar correlacionada com a proteção, as respostas aos sorotipos pneumocócicos incluídos na vacina, medidas por ELISA, tenderam a ser mais baixas no grupo que recebeu paracetamol.

Para avaliar as respostas imunogênicas dos animais (Figura 4), foi realizado testes para a detecção de imunoglobulinas anti-proteína N, anti-RBD e anti-chimera em camundongos expostos a paracetamol e ao veículo.

Na Figura 4A, observa-se resultados significativos em comparação com o basal, destacando a detecção da produção de anticorpos anti-RBD nas amostras dos animais que receberam o veículo a partir do dia 28. Além disso, observa-se uma tendência significativa para a detecção na amostra de veículo no dia 14 e 21, quando

comparadas com o basal. Foram observados resultados com tendencia ao significativo para a produção de anti-Chimera (Figura 4C) apenas nos dias 35 e 42 quando comparamos os veículos com o basal.

Para a vacina com rBCG, podemos observar que em rela o ao tratamento com paracetamol e seus efeitos na imunogenicidade, foram encontrados valores significativos para a presença de anticorpos anti-RBD (Figura de 4A) e anti-Chimera (Figura 4C) nos grupos de paracetamol nos dias 7, 14, 28, 35 e 42, bem como a presença de uma tendencia ao aumento significativo no dia 21 para anti-RBD. Curiosamente, verificou-se que os animais tratados com o paracetamol, produzir o aumento anticorpos contra RBD e Chimera precocemente no dia 7 após a 1^a imuniza o.

Nessa pesquisa   possível notar o surgimento da produ o de anticorpos anti-RBD com apenas 7 dias da 1^a imuniza o com apenas rBCG (Figura 4A), o que ressalta a característica da vacina BCG de agir como uma ferramenta adjuvante que induz respostas imunes celulares e humorais por causa da sua capacidade de prote o heteróloga (Moorlag *et al.*, 2019). Também   notável o aumento gradativo na produ o de anticorpos após o reforço com a proteína Chimera no dia 21, principalmente no grupo que recebeu o tratamento com paracetamol. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Mambelli *et al.*, (2023) no qual demonstra que os animais que receberam a estratégia de imuniza o primaria e reforço (rBCG-ChD6/rChimera+Alum) obtiveram uma resposta mais robusta na produ o de anticorpos.

Analisando os resultados obtidos na Figura 4B, observamos resultados significativos na detec o de anticorpos anti-proteína N a partir do dia 14 nas amostras do grupo que recebeu paracetamol quando comparados com o basal. Esse dado pode ressaltar uma influência do tratamento na produ o de anticorpos, diante dessas condi oes experimentais.

Os resultados encontrados na Figura 4C indicam a detec o significativa de anticorpos anti-Chimera no grupo que recebeu APAP a partir do dia 7, em compara o com o basal. Esses achados colaboram com o estudo de Park, J. Y. *et al.*, (2021); Voysey, M. *et al.*, (2021) que demonstra que o paracetamol não alterou significativamente a produ o de anticorpos usando a vacina ChAdOx1 nCoV-19 que cont m o gene do antígeno da proteína spike.

É importante ressaltar que não houve diferenças significativas na produção de anticorpos entre o grupo veículo e o tratamento no dia 42. E podemos observar que houve resposta imunológica adequada para todos os anticorpos testados após o esquema vacinal completo, concluindo que o paracetamol não alterou a resposta imunogênica nos animais.

No estudo de Mambelli et al., (2023) no qual foi referência para essa pesquisa e o colaborador que concedeu a rBCG e a proteína Chimera para esse estudo, demonstrou fortes respostas imunológicas utilizando a vacina recombinante e a proteína, bem como resultados significativos ao testar a atividade neutralizante da imunogenicidade contra a cepa de SARS-CoV-2 Wuhan. A sua via de aplicação intradérmica foi diferente da via relatada nessa pesquisa (intramuscular), justamente para averiguar quais seriam as respostas imunológicas obtidas. Com isso, podemos notar que houve resposta significativa nesse estudo, principalmente para o grupo que recebeu paracetamol, ainda não é elucidado se o medicamento pode interferir na via imunológica, mas podemos notar que existem diferentes respostas dessa interação.

Os resultados obtidos podem apresentar discrepância em relação a alguns estudos em humanos que indicaram a diminuição na resposta imunogênica quando tratados com analgésicos, como o paracetamol. No entanto, é necessário considerar que os estudos em humanos não podem ser comparados diretamente ao nosso, justamente pela variedade de grupos inclusos, como crianças, idosos, imunocomprometidos, bem como a associação com outros medicamentos de uso contínuo e a presença de doenças crônicas nos pacientes. Toda essa variedade contribui para as diferentes respostas imunológicas, o que não descarta a possibilidade de a população saudável desenvolver anticorpos de maneira eficaz. Além disso, os estudos mencionados sofrem variações nas metodologias, como a aplicação, composição das vacinas e o método de administração dos medicamentos.

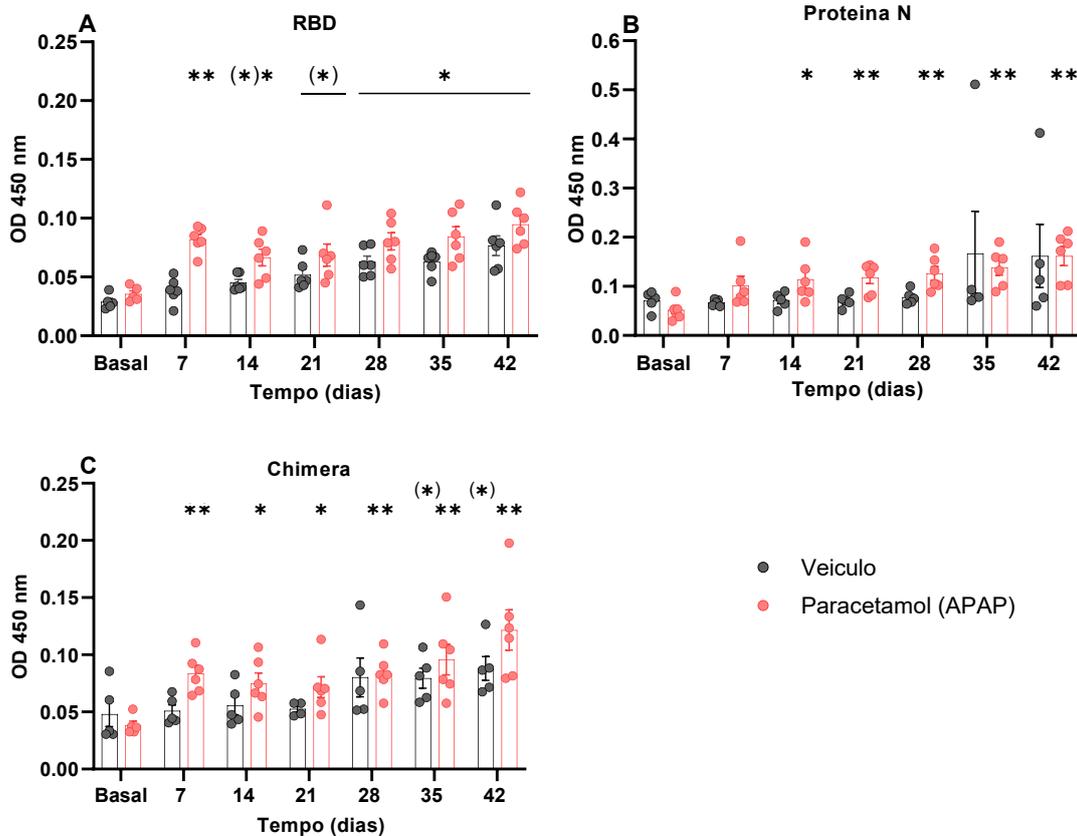


Figura 4: Testes imunológicos: Distribuição dos níveis de Imunoglobulinas anti-proteína N, anti-RBD e anti-chimera em camundongos machos C57BL/6 expostos a paracetamol e ao veículo. Os valores das Imunoglobulinas foram determinados por meio da técnica de ELISA e expressos como densidade óptica (OD) a 450 nm. teste *t* student paramétrico. Foi realizada análise de outliers e removido 1 de cada grupo no gráfico RBD e Chimera, além de 1 animal no grupo veículo da proteína N. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo basal. Asteriscos entre parênteses representam tendência ao resultado significativo. Valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e (*) $p = 0,05 - 0,1$.

4.2 NIDIFICAÇÃO

A utilização de aparatos capazes de promover o enriquecimento ambiental para os camundongos promove o bem-estar animal, contribuindo para a qualidade dos dados científicos (Burlingame, Gaskill e Lofgren, 2021; Deacon, 2006). Para avaliar o bem-estar animal durante a experimentação, foi utilizado um enriquecimento ambiental que incentiva os camundongos a construir o ninho (Nest Building) com pedaços de algodão (Deacon, 2006).

Durante os experimentos (Figura 5), pôde-se observar que na 1ª imunização com BCG ou reforço vacinal com alum (Figura 5A), em animais tratados com veículo, não houve diferenças significativas em nenhum dia do experimento, demonstrando a qualidade de vida e conforto dos animais no habitat durante esse período.

Dados obtidos durante a 1ª imunização com rBCG, mas não com o reforço vacinal de Chimera (Chi) em animais tratados com veículo, demonstram o resultado significativo do grupo rBCG+Veículo na melhoria da construção de ninho no dia 2 quando comparado com o basal, condizendo com o aprendizado dos animais ao construir o ninho (Gaskill *et al.*, 2013; Jirkof *et al.*, 2012).

Em animais tratados com paracetamol não houve alterações de nidificação em nenhum dos tempos testados.

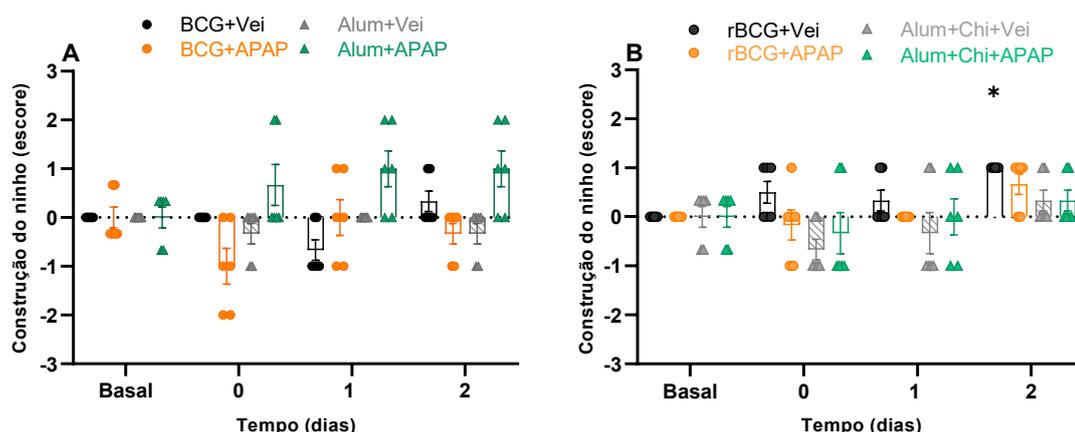


Figura 5: Avaliação da nidificação: Experimentos realizados em camundongos machos C57BL/6. As avaliações ocorreram no basal e dias 0,1 e 2 após 1ª imunização. As mesmas medidas se repetiram nos períodos do reforço vacinal. **(A)** grupos experimentais utilizando a vacina BCG com reforço de Alum, tratados e não tratados com paracetamol. **(B)** grupos experimentais utilizando a vacina rBCG com reforço vacinal de proteína Chimera e Alum, tratados e não tratados com paracetamol. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo basal. Valores de * $p < 0,05$.

4.3 AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DOR

Para a avaliação de comportamentos relacionados à dor, foram realizados experimentos para sensibilidade mecânica (von Frey) e comportamento afetivo motivacional (CAM). Os resultados obtidos nesses experimentos (Figura 6) mostrou que os animais do grupo BCG+Veículo (24h e 48h) demonstraram a redução do limiar de nocicepção (hiperalgesia) quando comparados com o grupo controle (basal),

evidenciando que a aplicação da vacina com BCG foi capaz de causar nocicepção nos animais (Figura 6A). Com isso, o reforço de Alum+Veículo (2h, 24h e 48h) também causou hiperalgesia nos animais. Esses dados colaboram com os resultados encontrados no experimento de CAM (Figura 6B) que demonstram a tendência significativa de aumento no escore durante os experimentos. Assim, a imunização impactou no componente sensorial e emocional da nocicepção, indicando a presença de dor nos animais.

Nas avaliações realizadas durante a imunização com rBCG e o reforço com a proteína Chimera (Figura 6C), foram obtidos valores significativos de hiperalgesia nos grupos rBCG+Veículo no tempo de 2h e Alum+Chi+Veículo em 48h. O teste CAM corroborou com os resultados encontrados no experimento von Frey para os mesmos grupos (Figura 6D), sendo significativo para rBCG+Veículo e com tendência significativa no Alum+Chi+Veículo.

As imunizações causaram hiperalgesia nos animais durante o período de experimentação. Não são elucidados os mecanismos pelo qual a BCG causa dor, mas sugere-se que Micobactérias possam estimular receptores celulares do tipo TLRs. Ele é aplicável ao adjuvante de hidróxido de alumínio, que induz a reação inflamatória local através dos inflamassomas que, por sua vez, podem afetar os receptores de nocicepção e levar a uma maior sensibilidade à dor, juntamente com as respostas locais e sistêmicas ocasionadas pela imunização com BCG, que geralmente são leves (He, Zou e Hu, 2015; Hervé *et al.*, 2019).

Até os dias atuais, ainda é pouco compreendido o funcionamento da interação entre o sistema imunológico inato e o sistema nervoso sensorial e suas contribuições para a dor. A pesquisa de Huang *et al.*, (2020) evidenciou que ao utilizar um agonista heterodímero TLR2/6 derivado de *Mycoplasma salivarium*, submetido a avaliação comportamental da dor no modelo de CFA (Adjuvante completo de Freund), induziu a hipersensibilidade mecânica, hiperalgesia térmica e inflamação a partir da ativação de TLR2. O que desencadeou a expressão de IL-33 mediada por inflamassoma (NLRP3), no qual vem sendo estudada a sua atuação regulando a nocicepção (Curto-Reyes *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2017). A IL-33 é capaz de ativar terminações sensoriais nas camadas superficiais da pele por meio dos receptores ST2, que por sua vez, desencadeiam uma resposta de dor (Huang *et al.*, 2020). É válido ressaltar que as *M. tuberculosis* e *M. bovis* são capazes de ativar diretamente neurônios nociceptores

sensoriais e inflamassoma NLRP3 (Baral, Udit e Chiu, 2019; Escobar-Chavarría *et al.*, 2023; Ning *et al.*, 2023).

É possível observar que as vacinas BCG e rBCG não foram capazes de causar uma hiperalgesia durante as aplicações e no decorrer dos dias. Os dados obtidos nessa pesquisa sobre a nocicepção corroboram com estudos que demonstram a presença de dor leve nos pacientes que recebem a vacina BCG (Lopes *et al.*, 2018; Villanueva *et al.*, 2022, 2023). A localização da injeção pode influenciar na gravidade da reatogenicidade local, dependente da superfície, quantidade de vascularização e a possível hipersensibilidade ao hidróxido de alumínio ou outros componentes da vacina. Reações locais dolorosas com imunização subcutânea foram maiores do que quando comparadas com imunizações intramusculares um estudo utilizando o adjuvante de alumínio (Mark, Carlsson e Granström, 1999; Pittman *et al.*, 2002). É importante ressaltar que a resposta à imunização também é variável, levando em consideração o tipo de adjuvante utilizado, as formulações e a via de administração (Ghimire, 2015; Lu e HogenEsch, 2013).

Estudos apontam a importância da inflamação local para que o efeito do adjuvante seja eficiente na indução de infiltrados de células imunológicas e a produção de anticorpos. Essa resposta está associada a reatogenicidade, como a resposta nociceptiva e o processo inflamatório ocasionados pelo acúmulo de quimiocinas, citocinas e leucócitos (Goto e Akama, 1982). O estudo de Calabro *et al.*, (2011) relata que, após a injeção intramuscular em camundongos e com o adjuvante hidróxido de alumínio, foram detectadas, por meio da citometria de fluxo, a presença de células infiltradas, como neutrófilos e monócitos. Além disso, a secreção de interleucinas IL-1 β e IL-18 pelas células dendríticas (Li, Nookala e Re, 2007; Sokolovska, Hem e HogenEsch, 2007) e a presença de leucócitos foram detectadas 6 horas após a injeção, continuando a aumentar ao decorrer dos dias (Kool *et al.*, 2008; Korsholm *et al.*, 2010). Isso justifica a presença de nocicepção, principalmente nos grupos com Alum (Figura 6A-C).

Os dados obtidos indicam que o tratamento com paracetamol não foi capaz de reverter a dor causada pelas imunizações nos dois cenários (Figura 6).

Sobretudo, não devemos desconsiderar a falta de resposta ao paracetamol, o que pode estar associado a maneira de que o paracetamol foi administrado, que, apesar de ser um método não invasivo para os animais, possui algumas limitações no controle preciso da dose administrada e na uniformidade do consumo do líquido por

todos os animais na caixa (Culbreth *et al.*, 2019; Flecknell, 1984; Saleh, Moody e Walter, 2016). Com isso, pode ser que a via oral *ad libidum* não tenha fornecido a dosagem suficiente para que ocorresse analgesia no tipo de nocicepção causada pela imunização nos animais. Considerando os efeitos analgésicos e antipiréticos do paracetamol, que são diferentes dos efeitos antiinflamatórios causados pelos AINEs típicos (Mattia e Coluzzi, 2009).

O paracetamol é comumente utilizado em diferentes experimentos laboratoriais com animais como ferramenta para alívio da dor (Miller e Richardson, 2011). Esse medicamento pode ser administrado por diferentes vias de administração, o que influenciam as dosagens e a rapidez do efeito analgésico. Um exemplo é a via oral de forma voluntária, adicionando o APAP na água dos animais, prática que facilita a administração e reduz o estresse durante o manuseio (Fleischmann *et al.*, 2017; Hayes *et al.*, 2000; Mickley *et al.*, 2006). No estudo de Fleischmann *et al.*, (2017) o paracetamol (xarope infantil - 200 mg/kg) foi administrado via oral *ad libidum*, resultando em aumento do consumo de líquido com o medicamento quando comparado com o grupo controle. Também foram comparadas diferentes vias de administração do paracetamol, incluindo oral *ad libidum*, intraperitoneal e gavagem. Os resultados indicaram que, mesmo uma quantidade maior de líquido, as concentrações séricas de APAP foram mais elevadas nos grupos que receberam injeção intraperitoneal e por gavagem. Sugerindo que parte dessa quantidade medida nas mamadeiras pode ter sido perdida durante o manuseio das caixas e/ou pelo derramamento de água pelos próprios animais, em vez de consumirem toda a quantidade avaliada (Fleischmann *et al.*, 2017).

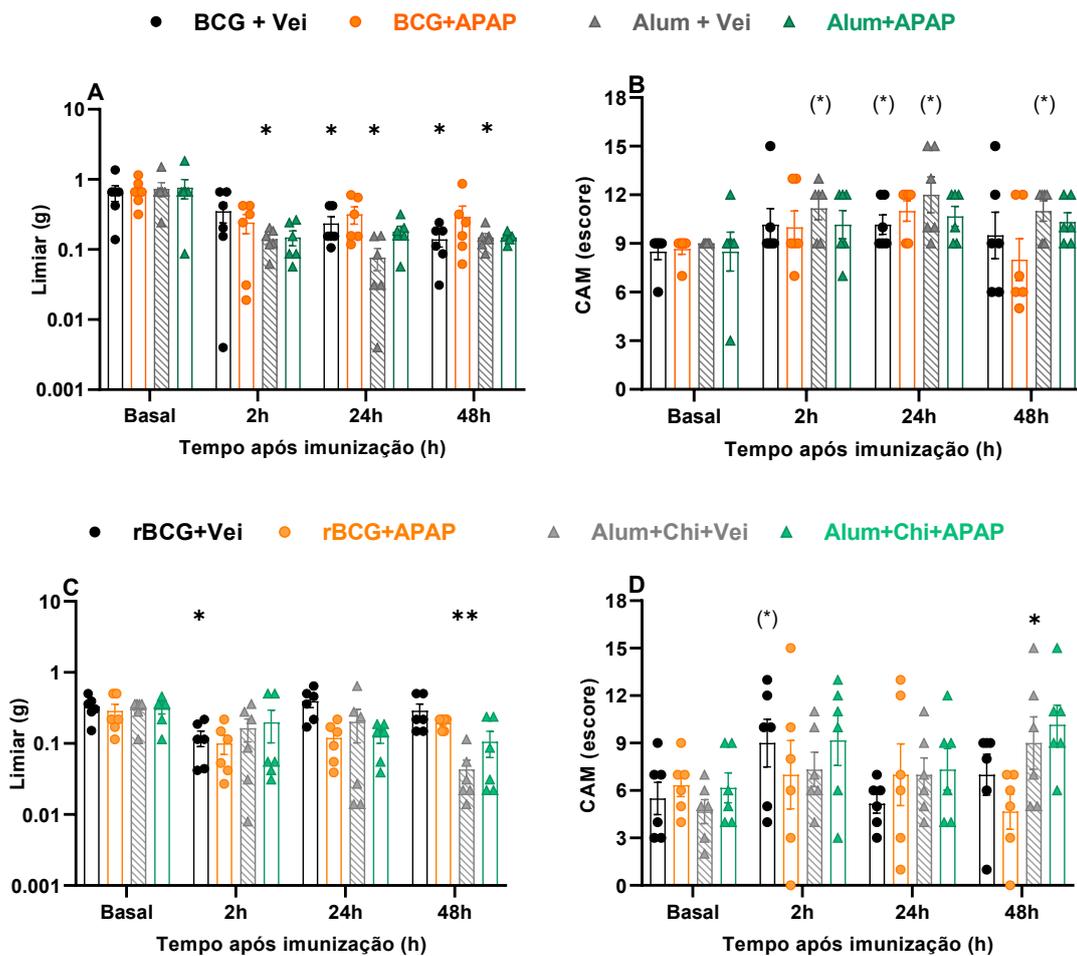


Figura 6: Avaliação da sensibilidade mecânica (von Frey) e comportamento afetivo motivacional (CAM): Experimentos realizados em camundongos machos C57BL/6. As avaliações ocorreram no basal, 2h, 24h e 48h após 1ª imunização. As mesmas medidas se repetiram nos períodos do reforço vacinal com Alum. **(A e B)** grupos experimentais utilizando a vacina BCG (30 μ L) com reforço de Alum (30 μ L), tratados e não tratados com paracetamol. **(C e D)** grupos experimentais utilizando a vacina rBCG com reforço vacinal de proteína Chimera e Alum, tratados e não tratados com paracetamol. ANOVA de 2 vias (tempo e tratamento) com medidas repetidas (fator tempo), seguido por teste post hoc de Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle (basais). Asteriscos entre parênteses representam tendencia significativa. Valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e (*) $p = 0,05 - 0,1$.

Na literatura, existem poucos estudos clínicos e não clínicos que avaliam os efeitos do paracetamol e outros AINEs nos sintomas pós-vacinas do COVID-19 em animais. O estudo de Ricci et al., (2023) foi conduzido com profissionais da saúde que receberam a vacinação Pfizer-BioTech e os principais resultados indicam que a terapia profilática na primeira e segunda dose, reduziu o aparecimento de sintomas de astenia. Mas não obtiveram resultados significativos quando avaliaram isoladamente os efeitos reatogênicos, como a febre, dor de cabeça e no local da aplicação. Em contrapartida, o estudo de Folegatti et al., (2020) mostrou que o

paracetamol foi capaz de reduzir a reatogenicidade, incluindo febre, dor muscular e dor de cabeça, em experimentos realizados com uma vacina recombinante ChAdOx1 nCoV-19 (Park, J. Y. *et al.*, 2021).

4.4 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE RAÇÃO E LÍQUIDOS

No que diz respeito ao consumo de ração e líquidos durante o experimento (Figura 7), foram observados resultados significativos no grupo Alum+Veículo, os quais demonstraram a redução do consumo de ração no dia 0 e 1 em comparação com o grupo basal (Figura 7A). Resultados com tendência à significância foram encontrados no grupo BCG+Veículo nos dias 1, 2 e 3 (Figura 7A) quando comparados com o basal. Em relação ao consumo de água (Figura 7B), não foram identificados resultados significativos nos grupos testados.

No grupo experimental utilizando a rBCG+Veículo, observou-se uma tendência à significância no aumento do consumo de ração quando comparado com o basal no dia 2 (Figura 7C). Em contrapartida, o grupo rBCG+APAP mostrou tendência significativa para a redução do consumo de ração no dia 1, quando comparado com o rBCG+Veículo (Figura 7C). No consumo de líquidos, houve o aumento significativo da ingestão de líquidos no grupo rBCG+Veículo quando comparado com o seu grupo basal no dia 1 (Figura 7D). Para o grupo de reforço com Alum+Chi+Veículo, foram observados resultados significativos evidenciando a redução do consumo de líquidos nos dias 1 e 2 quando comparados com o basal (Figura 7D).

Os comportamentos naturais dos roedores, como o consumo de alimentos e água, atividades exploratórias e locomotoras, podem se alterar durante algum evento doloroso e/ou inflamatório. O estudo de Stevenson, Bilsky e Negus, (2006) demonstrou que animais submetidos ao teste de administração de ácido acético, reduziu significativamente o consumo de ração e líquidos durante os experimentos e os animais que receberam analgésico conseguiram reverter a alimentação, mostrando que a dor é um fator de impacto importante para os animais.

Além disso, no dia 0, foi observado o aumento significativo no consumo de líquidos no grupo rBCG+APAP versus rBCG+Veículo (Figura 7D). Valores significativos também foram observados para o grupo Alum+Chi+APAP, que apresentou aumento no consumo de líquidos nos dias 1, 2 e 3 em comparação com o grupo Alum+Chi+Veículo (Figura 7D). A ação do paracetamol, que auxilia na redução

da dor pode explicar essa diferença. Em comparação, o grupo Alum+Chi sem paracetamol demonstrou uma diminuição na ingestão de líquidos. É importante ressaltar que não podemos descartar a possibilidade de que o sabor escolhido para o APAP tenha contribuído para o aumento da ingestão de líquidos nos grupos. Mesmo que a solução veículo tenha sido produzida para se assemelhar o mais próximo possível à composição do xarope de APAP, características como o sabor adocicado, o cheiro e a textura do paracetamol podem ter propiciado o aumento do consumo.

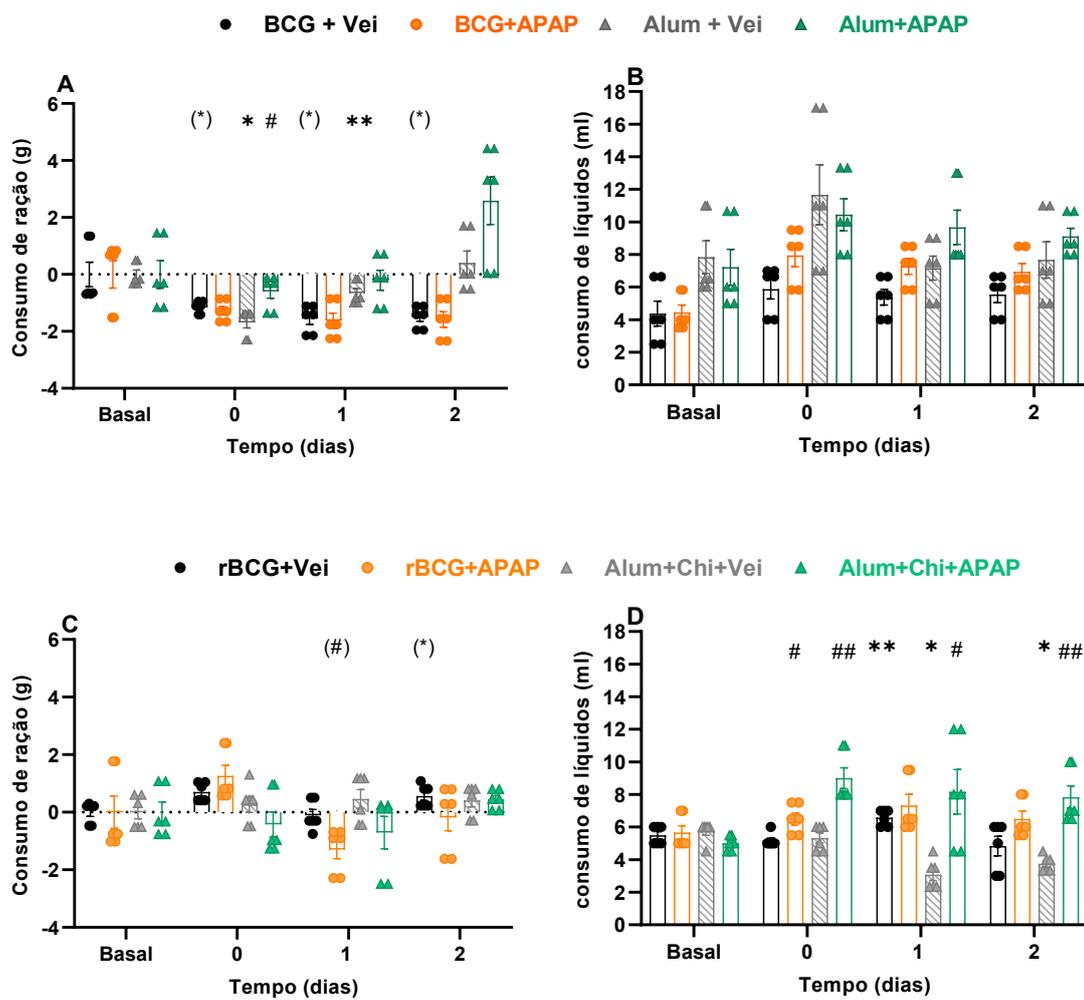


Figura 7: Consumo de ração e líquidos durante testes comportamentais: Experimentos realizados em camundongos machos C57BL/6. As avaliações ocorreram no basal, dia 0, 1 e 2 após 1ª imunização. As mesmas medidas se repetiram nos períodos do reforço vacinal com Alum. **(A e B)** grupos experimentais utilizando a vacina BCG com reforço de Alum, tratados e não tratados com paracetamol. **(C e D)** grupos experimentais utilizando a vacina rBCG com reforço vacinal de proteína Chimera e Alum, tratados e não tratados com paracetamol. ANOVA de 2 vias (tempo e tratamento) com medidas repetidas (fator tempo), seguido por teste post hoc de Tukey e Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle (basais) e cerquilhas quando

comparado ao grupo veículo. Asteriscos entre parênteses representam tendencia ao resultado significativo. Valores de * ou # $p < 0,05$, ** ou ## $p < 0,001$ e (*) $p = 0,05 - 0,1$.

4.5 AVALIAÇÃO DO CAMPO ABERTO

Um dos testes utilizados para avaliar a atividade motora é o teste de Campo Aberto (Open Field), criado em 1934 para medir a emotividade em roedores (HALL, 1935). Com ele, é possível observar de forma rápida e prática se a substância utilizada altera a capacidade de exploração e se ocorre alguma alteração locomotora no animal (Seibenhener e Wooten, 2015; Zimcikova *et al.*, 2017). Os roedores tendem a ter aversão a ambientes abertos, grandes e desconhecidos, então normalmente deambulam pela lateral do campo.

4.5.1 Distância percorrida e velocidade média

A fim de verificar a atividade locomotora, foram realizados testes para medir a distância percorrida e a velocidade média (Figura 8), os quais demonstram resultados significativos evidenciando a diminuição na distância percorrida quando comparado com seu basal para o grupo BCG+Veículo nos tempos 2h, 24h e 48h (Figura 8A). Esses achados colaboraram com o resultado obtido na análise da velocidade média (Figura 8B), que também demonstrou uma tendencia significativa de redução na velocidade, sugerindo que a imunização com BCG causou redução na locomoção, provavelmente devido a uma resposta natural ao desconforto induzida pela injeção.

Os resultados obtidos para o grupo Alum+Veículo nos tempos 24h e 48h após a imunização (Figura 8A) evidenciaram o aumento na distância percorrida quando comparadas com seus valores basais, bem como o aumento significativo da velocidade média (Figura 8B). Esses efeitos contribuíram com os resultados obtidos ao analisar a mobilidade dos animais no grupo Alum+Veículo nos tempos 2h e 24h (Figura 9A) onde nota-se um aumento significativo na mobilidade dos animais, bem como uma tendência à significância na diminuição do tempo de imobilidade desse grupo nos mesmos dias quando comparados com o basal (Figura 9B). Foi curioso o aumento da mobilidade e velocidade, o que podemos associar aos dados dos basais desses grupos serem menores do que os outros analisados, então podemos

relacionar com a adaptação do animal ao aparato, o que facilitou sua exploração pelo campo.

Para o grupo rBCG+Veículo (Figura 8C) nos tempos 2h e 24h, foram identificados resultados que demonstraram uma redução significativa da distância total percorrida no aparato, além de uma tendência significativa com 48h. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos no experimento de mobilidade e imobilidade (Figura 9C-D), que indicam a redução e o aumento desses parâmetros, respectivamente, para o mesmo grupo analisado. No teste de velocidade média (Figura 8D), nesse grupo, observou-se uma redução significativa da velocidade para o mesmo grupo nos tempos 2h e 24h, com uma tendência semelhante após 48h. Nos outros grupos experimentais, não foram detectadas alterações significativas nos grupos veículos

Os resultados evidenciando a diminuição da locomoção dos animais no teste de campo aberto, estão em acordo com as avaliações realizadas no estudo de Kolstad et al., (2012) que demonstra a atividade reduzida na distância percorrida de camundongos que receberam a 1ª imunização com antígeno e CFA (adjuvante completo de Freund) e reforço com IFA (adjuvante incompleto de Freund). Os valores reduzidos da distância total percorrida e a velocidade média demonstram que a imunização causou o desconforto no animal.

Além disso, não foi observada a interferência do tratamento nas atividades locomotoras dos animais.

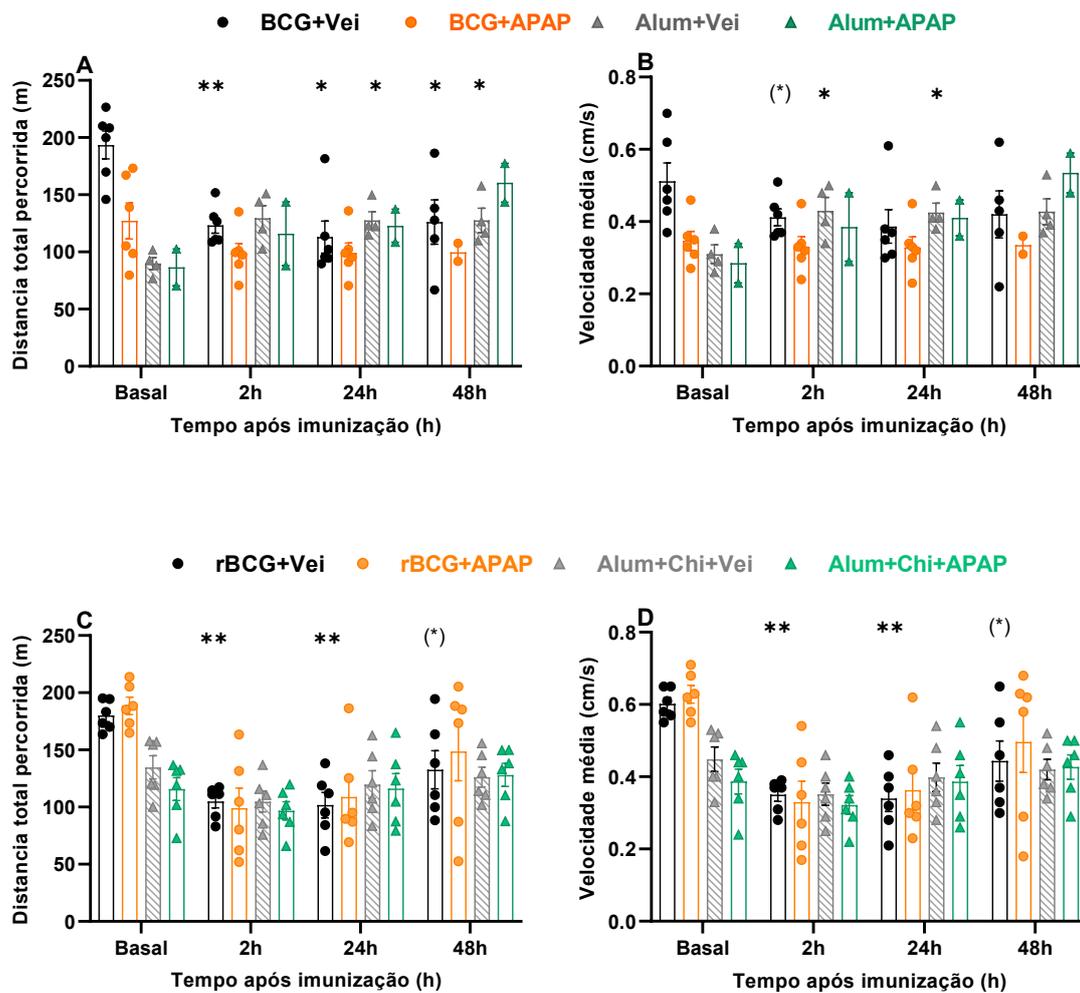


Figura 8: Teste para avaliar distância percorrida e a velocidade média em Campo Aberto: Experimentos realizados em camundongos machos C57BL/6. As avaliações ocorreram no basal, dia 0, 1 e 2 após 1ª imunização. As mesmas medidas se repetiram nos períodos do reforço vacinal com Alum. (A e B) grupos experimentais utilizando a vacina BCG com reforço de Alum, tratados e não tratados com paracetamol. (C e D) grupos experimentais utilizando a vacina rBCG com reforço vacinal de proteína Chimera e Alum, tratados e não tratados com paracetamol. ANOVA de 2 vias (tempo e tratamento) com medidas repetidas (fator tempo), seguido por teste post hoc de Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle (basais). Asteriscos entre parênteses representam tendência ao resultado significativo. Valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e (*) $p = 0,05 - 0,1$.

4.5.2 Mobilidade e imobilidade

Para investigar qualquer alteração no comportamento pós-vacinal, iniciou-se a avaliação da mobilidade e imobilidade dos animais (Figura 9), onde é possível observar a redução significativa no tempo de mobilidade para os grupos BCG+Veículo (Figura 9A) nos dias 0,1 e 2 quando comparados com o grupo basal, sugerindo um possível efeito incapacitante da imunização com BCG. Essa diminuição

provavelmente foi causada pela nocicepção local e desconforto ao receber a injeção, colaborando com os dados obtidos na figura 5A que demonstra a hiperalgesia nos mesmos tempos e na figura 5B que expressa o escore reduzido nesse grupo, indicando a presença de comportamentos motivacionais semelhantes a dor nos animais. Esses dados são reforçados pelos resultados da avaliação de imobilidade (Figura 9B) que são inversamente proporcionais e mostram os resultados significativos no aumento da imobilidade dos animais no grupo BCG+Veículo nos dias 0 e 1, e resultado com tendencia significativa no dia 2. Ao analisar o grupo Alum+Veículo nos dias 0 e 1 (Figura 9A), nota-se o aumento significativo na mobilidade dos animais, bem como a proporcionalidade na tendência significativa na diminuição do tempo de imobilidade desse grupo nos mesmos dias quando comparados com o basal (Figura 9B).

Em relação aos resultados obtidos na imunização com a rBCG+Veículo (Figura 9C), é possível observar o padrão de resposta na redução significativa da mobilidade dos animais (dias 0 e 1) quando comparados com o grupo basal se relacionam com os valores significativos no aumento da imobilidade apresentados na figura 9D, sugerindo um impacto comportamental, parecido com os observados no grupo que utilizou apenas BCG (Figura 9A). O grupo Alum+Chi+Veículo (Figura 9C-D) apresentou um resultado com tendencia significativa para a redução da mobilidade e consequentemente o aumento da imobilidade apenas no dia 0.

Por outro lado, para os animais que receberam tratamento com paracetamol, apenas o grupo BCG+APAP (Figura 9A) demonstrou resultado significativo na redução da mobilidade quando comparado com seu grupo veículo (BCG+Vei). A pesquisa de Mallet et al., (2008) demonstra que o paracetamol tem a capacidade de afetar a atividade locomotora dos animais, dependente da dose, e que essa ação possivelmente está envolvida indiretamente com a capacidade do APAP e/ou seu metabólito atuar em receptores canabinoides (CB1) e ativar os efeitos tétrade, no qual dentre os resultados, obtiveram a redução na atividade locomotora.

Em relação aos outros grupos de APAP, não foram observadas alterações significativas quando comparados com o basal e seus veículos, concluindo que o tratamento não foi capaz de reverter a alterações de locomoção causadas nos animais que receberam as imunizações e reforço.

Esses resultados refletem um padrão de respostas comportamentais associadas a hiperalgesia e desconforto nos animais, ocasionado pelas imunizações

com BCG, rBCG e os reforços utilizando Alum, principalmente nos tempos 4h e 24h, o que é consistente com a hipótese de que a nocicepção local é um dos efeitos reatogenicos causados pelos adjuvantes com propriedades estimulantes de processos inflamatórios locais e sistêmicos (He, Zou e Hu, 2015).

No entanto, é importante notar que, embora tenha havido uma diminuição significativa na mobilidade e um aumento correspondente na imobilidade nos dias iniciais após a vacinação, esses efeitos parecem diminuir após 48 horas. Isso pode indicar uma adaptação dos animais ao desconforto inicial à medida que o sistema imunológico responde a inflamação local e os mediadores inflamatórios começam a diminuir, podendo considerar também a supressão de resposta à dor para uma adaptação a sobrevivência (Whittaker e Howarth, 2014).

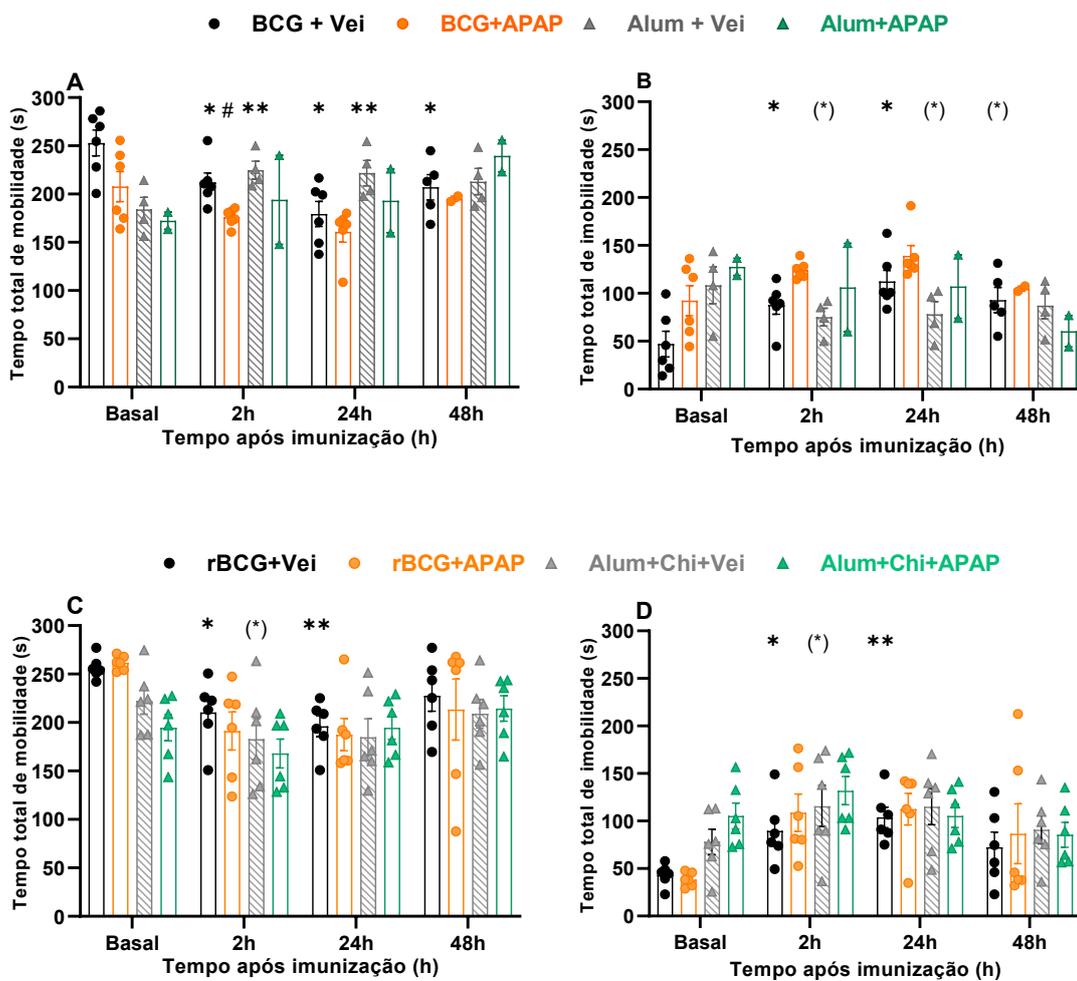


Figura 9: Teste para avaliar mobilidade e imobilidade em Campo Aberto: Experimentos realizados em camundongos machos C57BL/6. As avaliações ocorreram no basal, dia 0, 1 e 2 após 1ª imunização. As mesmas medidas se repetiram nos períodos do reforço vacinal com Alum. **(A e B)** grupos experimentais utilizando a vacina BCG com reforço de Alum, tratados e não tratados com

paracetamol. (C e D) grupos experimentais utilizando a vacina rBCG com reforço vacinal de proteína Chimera e Alum, tratados e não tratados com paracetamol. ANOVA de 2 vias (tempo e tratamento) com medidas repetidas (fator tempo), seguido por teste post hoc de Tukey. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle (basais) e cerquilhas quando comparado ao grupo veículo. Asteriscos entre parênteses representam tendência ao resultado significativo. Valores de * ou # $p < 0,05$, ** ou ## $p < 0,001$ e (*) $p = 0,05 - 0,1$.

4.5.3 Tigmotaxia

No âmbito do presente estudo que buscou analisar os efeitos da imunização em camundongos, é relevante destacar a importância de examinar o comportamento exploratório e tigmotático, onde o animal tende a se aproximar de estímulos táteis, como nas paredes do aparato, para que se sinta em segurança, incluindo se proteger contra estímulos dolorosos, e possa explorar o ambiente desconhecido utilizando as vibrissas. Evitando assim o centro do aparato, onde seria um lugar mais exposto (Huang *et al.*, 2013).

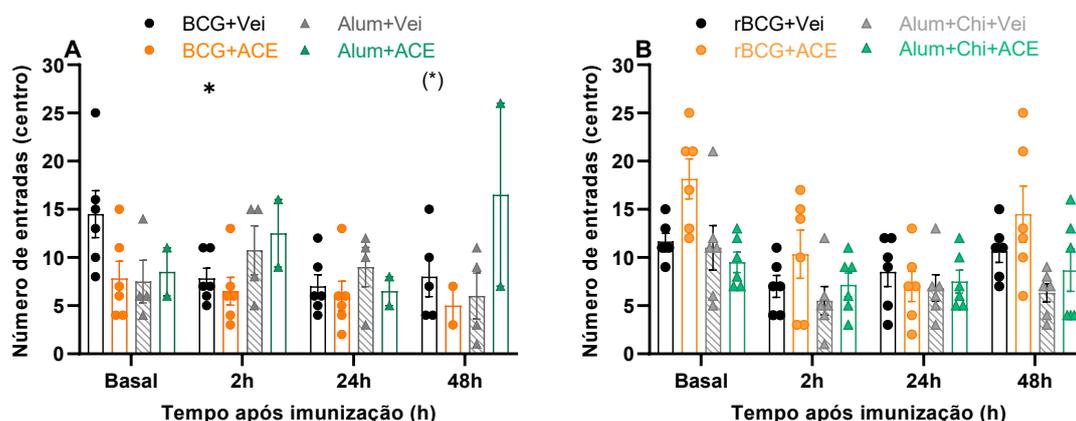
Durante a realização do experimento de campo aberto, foi avaliada a capacidade dos camundongos de entrar no centro do aparato (Figura 10). Os resultados obtidos indicaram que após 2 horas da imunização, os animais do grupo de BCG+Veículo (Figura 10A) demonstraram a redução significativa de entradas no centro do aparato, o que sugeriu uma diminuição em sua capacidade exploratória em comparação com o basal. Além disso, observou-se uma tendência significativa para o mesmo grupo após 48 horas. Não foram identificadas alterações significativas nos comportamentos dos outros grupos experimentais.

Os resultados significativos que mostram a redução de exploração no centro do aparato coincidem com os valores obtidos na Figura 9A, em que os animais do mesmo grupo BCG+Veículo também apresentam redução sua deambulação. Isso pode justificar a redução de mobilidade para o centro do aparato, o que se alinha com os efeitos de tigmotaxia, um comportamento em que os animais tendem a preferir as periferias, onde se sentem mais protegidos. O que pode ser atribuído aos efeitos nociceptivos associados à imunização que os animais receberam (Zhang *et al.*, 2023).

O paracetamol não foi capaz de alterar significativamente as atividades exploratórias dos animais.

É importante ressaltar que, apesar de uma pequena perda de dados devido a contratemplos técnicos com o equipamento de gravação, que resultaram na ausência de algumas gravações e de dados para completar a quantidade amostral no grupo da

BCG, a integridade e relevância dos resultados permanecem robustas. Com os dados disponíveis, realizamos uma análise meticulosa e as conclusões apresentadas foram analisadas como um conjunto de dados se relacionando com os outros experimentos realizados que possuíam os dados completos.



5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O tratamento com paracetamol não alterou a reatogenicidade ou a imunogenicidade da imunização com rBCG/BCG em camundongos. Assim, na dose, na via de administração e nos tempos testados em nosso estudo, o uso de paracetamol não melhora a dor ou o bem-estar de camundongos utilizados para estudo de protocolos vacinais e desenvolvimento de novos imunizantes. Novos estudos com diferentes protocolos de administração de paracetamol ou outros fármacos analgésicos devem ser realizados para melhorar o bem-estar animal em pesquisa não-clínicas com imunizantes e assegurar sua qualidade.

REFERÊNCIAS

AABY, P. *et al.* Randomized Trial of BCG Vaccination at Birth to Low-Birth-Weight Children: Beneficial Nonspecific Effects in the Neonatal Period? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 2, p. 245–252, 15 jul. 2011.

ADRIAAN BOUWKNECHT, J.; OLIVIER, B.; PAYLOR, R. E. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 31, n. 1, p. 41–59, 2007.

AHN, J. J.; MCKIERNAN, J. M. New Agents for Bacillus Calmette-Guérin–Refractory Bladder Cancer. **Urologic Clinics of North America**, v. 40, n. 2, p. 219–232, maio 2013.

AIMANIANDA, V. *et al.* Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 6, p. 287–295, jun. 2009.

ANDRADE, E. L. *et al.* Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 11, 2016.

ANDRADE, P. M. *et al.* The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 28, n. 5, p. 520–525, set. 2010.

ARTS, R. J. W. *et al.* BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 1, p. 89–100.e5, 10 jan. 2018.

ARMITAGE P, BERRY G, MATTHEWS JNS. Statistical methods in medical research. Fourth ed.. 2008.pág. 760–783. Doi: 10.1002/9780470773666.refs

BACHMANN, M. F.; ZINKERNAGEL, R. M. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. **Immunology Today**, v. 17, n. 12, p. 553–558, dez. 1996.

BAI, Z. *et al.* The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. **Viruses**, v. 13, n. 6, 1 jun. 2021.

BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I. M. Pain and immunity: implications for host defence. **Nature Reviews Immunology** 2019 19:7, v. 19, n. 7, p. 433–447, 15 mar. 2019.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T. C. *et al.* BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis - review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 459–465, 31 ago. 2005.

BERNAL, J. L. *et al.* Effectiveness of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca vaccines on covid-19 related symptoms, hospital admissions, and mortality in older adults in England: test negative case-control study. **The BMJ**, v. 373, 13 maio 2021.

BLINKUŠ, U. *et al.* Non-Invasive Assessment of Mild Stress-Induced Hyperthermia by Infrared Thermography in Laboratory Mice. **Animals: an Open Access Journal from MDPI**, v. 12, n. 2, p. 177, 1 jan. 2022.

BURLINGAME, L. A.; GASKILL, B. N.; LOFGREN, J. L. S. Identification of Sick or Dead Mice (*Mus musculus*) Housed with 6 Grams of Crinkle Paper Nesting Material. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 60, n. 1, p. 18–27, 1 jan. 2021.

CALABRO, S. *et al.* Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1812–1823, 2011.

CHAPLAN, S. R.; POGREL, J. W.; YAKSH, T. L. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, n. 3, 1994.

CORDER, G. *et al.* Loss of μ opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. **Nature medicine**, v. 23, n. 2, p. 164–173, 1 fev. 2017.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181, 1 mar. 2019.

CULBRETH, M. J. *et al.* The Use of Analgesics during Vaccination with a Live Attenuated *Yersinia pestis* Vaccine Alters the Resulting Immune Response in Mice. **Vaccines**, v. 7, n. 4, 1 dez. 2019.

CURTO-REYES, V. *et al.* Neuropathic Pain Phenotype Does Not Involve the NLRP3 Inflammasome and Its End Product Interleukin-1 β in the Mice Spared Nerve Injury Model. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133707, 28 jul. 2015.

DAGENAIS, A.; VILLALBA-GUERRERO, C.; OLIVIER, M. Trained immunity: A “new” weapon in the fight against infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 13 mar. 2023.

DEACON, R. M. J. Assessing nest building in mice. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1117–1119, ago. 2006.

DELVES, P. J. *et al.* **Fundamentos de Imunologia**. 12. ed.

DIVANGAHI, M. *et al.* Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. **Nature immunology**, v. 22, n. 1, p. 2, 1 jan. 2021.

DIXON, W. J. The Up-and-Down Method for Small Samples. **Journal of the American Statistical Association**, v. 60, n. 312, p. 967, dez. 1965.

DU, J. *et al.* Research progress on specific and non-specific immune effects of BCG and the possibility of BCG protection against COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 31 jan. 2023.

EARLE, K. A. *et al.* Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. **Vaccine**, v. 39, n. 32, p. 4423–4428, 22 jul. 2021.

ESCOBAR-CHAVARRÍA, O. *et al.* Necrotic Cell Death and Inflammasome NLRP3 Activity in Mycobacterium bovis-Infected Bovine Macrophages. **Cells**, v. 12, n. 16, 1 ago. 2023.

FLECKNELL, P. A. The relief of pain in laboratory animals. **Laboratory animals**, v. 18, n. 2, p. 147–160, 1 abr. 1984.

FLEISCHMANN, T. *et al.* Voluntary intake of paracetamol-enriched drinking water and its influence on the success of embryo transfer in mice. **Research in veterinary science**, v. 111, p. 85–92, 1 abr. 2017.

FOLEGATTI, P. M. *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomized controlled trial. **Lancet (London, England)**, v. 396, n. 10249, p. 467, 15 ago. 2020.

GASKILL, B. N. *et al.* Nest Building as an Indicator of Health and Welfare in Laboratory Mice. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. 82, n. 82, p. 51012, 2013.

GHIMIRE, T. R. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2015.

GOLDE, W. T.; GOLLOBIN, P.; RODRIGUEZ, L. L. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. **Lab animal**, v. 34, n. 9, p. 39–43, out. 2005.

GONG, W. *et al.* COVID-19 pandemic: SARS-CoV-2 specific vaccines and challenges, protection via BCG trained immunity, and clinical trials. **Expert Review of Vaccines**, v. 20, n. 7, p. 1, 2021.

GONG, W. *et al.* The Natural Effect of BCG Vaccination on COVID-19: The Debate Continues. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 8 jul. 2022.

GOTO, N.; AKAMA, K. Histopathological Studies of Reactions in Mice Injected with Aluminum-Adsorbed Tetanus Toxoid. **Microbiology and Immunology**, v. 26, n. 12, p. 1121–1132, 1 dez. 1982.

GRAHAM, G. G. *et al.* The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 201–232, jun. 2013.

GUPTA, P. K. New disease old vaccine: Is recombinant BCG vaccine an answer for COVID-19? **Cellular Immunology**, v. 356, p. 104187, out. 2020.

HAYES, K. E. *et al.* Uma avaliação de regimes analgésicos para cirurgia abdominal em ratos. **Volume 39, Ed. 6, pg. 18 a 23**, v. 39, n. 6, p. 18–23, nov. 2000.

HE, P.; ZOU, Y.; HU, Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 477, 2015.

HEM, S. L.; JOHNSTON, C. T.; HOGENESCH, H. Inject Alum is not aluminum hydroxide adjuvant or aluminum phosphate adjuvant. **Vaccine**, v. 25, n. 27, p. 4985–4986, 28 jun. 2007.

HERVÉ, C. *et al.* The how's and what's of vaccine reactogenicity. **NPJ Vaccines**, v. 4, n. 1, 1 dez. 2019.

HESS, S. E. *et al.* Home Improvement: C57BL/6J Mice Given More Naturalistic Nesting Materials Build Better Nests. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 47, n. 6, p. 25, nov. 2008.

HOFMANN, H. *et al.* Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, n. 4, p. 1216, 9 jul. 2004.

HOGENESCH, H. Mechanism of Immunopotentiality and Safety of Aluminum Adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. jan. 2012.

HUANG, J. *et al.* Hyperactivity of Innate Immunity Triggers Pain via TLR2-IL-33-Mediated Neuroimmune Crosstalk. **Cell Reports**, v. 33, n. 1, p. 108233, 6 out. 2020.

HUANG, W. *et al.* A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 154, n. 4, p. 560–575, 2013.

IPP, M. M. *et al.* Acetaminophen prophylaxis of adverse reactions following vaccination of infants with diphtheria-pertussis-tetanus toxoids-polio vaccine. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 6, n. 8, p. 721–725, 1987.

JACKSON, C. B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2021 23:1**, v. 23, n. 1, p. 3–20, 5 out. 2021.

JIA, M. *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome in peripheral nerve contributes to paclitaxel-induced neuropathic pain. **Molecular Pain**, v. 13, 1 jul. 2017.

JIANG, F. *et al.* A Summary on Tuberculosis Vaccine Development—Where to Go? **Journal of Personalized Medicine**, v. 13, n. 3, p. 408, 24 fev. 2023.

JIRKOF, P. *et al.* Individual housing of female mice: Influence on postsurgical behavior and recovery. **Volume 46, Issue 4, Pages 325 - 334**, v. 46, n. 4, p. 325–334, 2012.

KLEINNIJENHUIS, J. *et al.* Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 43, p. 17537–17542, 23 out. 2012.

KLEINNIJENHUIS, J. *et al.* Long-Lasting Effects of BCG Vaccination on Both Heterologous Th1/Th17 Responses and Innate Trained Immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 6, n. 2, p. 152–158, 1 fev. 2014.

KOLSTAD, A. M. *et al.* Effect of Pain Management on Immunization Efficacy in Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 51, n. 4, p. 448, jul. 2012.

KOOL, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 4, p. 869, 4 abr. 2008.

KORSBOLM, K. S. *et al.* T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection. **Immunology**, v. 129, n. 1, p. 75, jan. 2010.

KURODA, E. *et al.* Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. **Immunity**, v. 34, n. 4, p. 514–526, 22 abr. 2011.

KURODA, E.; COBAN, C.; ISHII, K. J. Particulate adjuvant and innate immunity: Past achievements, present findings, and future prospects. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 2, p. 209–220, abr. 2013.

LAMBRECHT, B. N. *et al.* Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 1, p. 23–9, fev. 2009.

LI, H.; NOOKALA, S.; RE, F. Aluminum Hydroxide Adjuvants Activate Caspase-1 and Induce IL-1 β and IL-18 Release. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 5271–5276, 15 abr. 2007.

LI, L. *et al.* Nanoparticle/Nanocarrier Formulation as an Antigen: The Immunogenicity and Antigenicity of Itself. **Molecular Pharmaceutics**, v. 19, n. 1, p. 148–159, 3 jan. 2022.

LI, W. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 450, 27 nov. 2003.

LOPES, S. R. C. *et al.* Adverse Events Following Immunization in Brazil: Age of Child and Vaccine-Associated Risk Analysis Using Logistic Regression. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 6, 1 jun. 2018.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, 22 dez. 2015.

MAHANTY, S.; PRIGENT, A.; GARRAUD, O. Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens. **BMC Immunology**, v. 16, n. 1, p. 31, 29 dez. 2015.
MALLET, C. *et al.* Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. **PAIN**, v. 139, n. 1, p. 190–200, 30 set. 2008.

MAMBELLI, F. *et al.* Recombinant Bacillus Calmette–Guérin Expressing SARS-CoV-2 Chimeric Protein Protects K18-hACE2 Mice against Viral Challenge. **The Journal of Immunology**, v. 210, n. 12, p. 1925–1937, 15 jun. 2023.

MARK, A.; CARLSSON, R. M.; GRANSTRÖM, M. Subcutaneous versus intramuscular injection for booster DT vaccination of adolescents. **Vaccine**, v. 17, n. 15–16, p. 2067–2072, 9 abr. 1999.

MATSUO, K.; YASUTOMI, Y. *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin as a Vaccine Vector for Global Infectious Disease Control. **Tuberculosis Research and Treatment**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

MATTIA, C.; COLUZZI, F. O que os anestesiolistas devem saber sobre o paracetamol (acetaminofeno). **Volume 75, Edição 11, Páginas 644 - 653**, v. 75, n. 11, p. 644–653, nov. 2009.

MCKEE, A. S. *et al.* Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 183, n. 7, p. 4403–14, 1 out. 2009.

MEI, J. *et al.* Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

MEO, S. A. *et al.* COVID-19 vaccines: comparison of biological, pharmacological characteristics and adverse effects of Pfizer/BioNTech and Moderna Vaccines. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 25, n. 3, p. 1663–1679, 2021.

MICALLEF, J. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs, pharmacology, and COVID-19 infection. **Therapie**, v. 75, n. 4, p. 355, 2020.

MICKLEY, G. A. *et al.* O paracetamol autoadministrado na água potável aumenta o limiar de dor em ratos (*Rattus norvegicus*). **Volume 45, Ed. 5, Pg. 48 a 54**, v. 45, n. 5, p. 48–54, set. 2006.

MILLER, A. L.; RICHARDSON, C. A. Rodent Analgesia. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 81–92, 1 jan. 2011.

MOORLAG, S. J. C. F. M. *et al.* Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 12, p. 1473–1478, 1 dez. 2019.

NETEA, M. G. *et al.* Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6284, p. aaf1098, 4 abr. 2016.

NETEA, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nature Reviews. Immunology**, v. 20, n. 6, p. 375, 1 jun. 2020.

NEWSOM, D. M. *et al.* Comparison of Body Surface Temperature Measurement and Conventional Methods for Measuring Temperature in the Mouse. v. 43, n. 5, 2004.

NING, B. *et al.* Baicalein Suppresses NLRP3 and AIM2 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in Macrophages Infected by Mycobacterium tuberculosis via Induced Autophagy. **Microbiology spectrum**, v. 11, n. 3, 15 jun. 2023.

OLIVEIRA, S. C.; MAGALHÃES, M. T. Q. DE; HOMAN, E. J. Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 587615, 28 out. 2020.

PARK, J. W. *et al.* mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1446, 2021.

PARK, J. Y. *et al.* Systemic Adverse Events and Use of Antipyretics Predict the Neutralizing Antibody Positivity Early after the First Dose of ChAdOx1 Coronavirus Disease Vaccine. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 13, p. 2844, 1 jul. 2021.

PASI, R.; BABU, T. A.; KALLIDOSS, V. K. Efficacy of oral mefenamic acid versus paracetamol as a prophylactic analgesic for needle pain in children receiving vaccination: a three-arm, parallel, triple-blind, placebo-controlled MAP VaC randomized controlled trial. **Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy**, v. 11, 1 jan. 2023.

PASQUALE, A. DI *et al.* Vaccine safety evaluation: Practical aspects in assessing benefits and risks. **Vaccine**, v. 34, n. 52, p. 6672–6680, 20 dez. 2016.

PITTMAN, P. R. *et al.* Anthrax vaccine: immunogenicity and safety of a dose-reduction, route-change comparison study in humans. **Vaccine**, v. 20, n. 9–10, p. 1412–1420, 31 jan. 2002.

PRYMULA, R. *et al.* Effect of prophylactic paracetamol administration at time of vaccination on febrile reactions and antibody responses in children: two open-label, randomized controlled trials. **The Lancet**, v. 374, n. 9698, p. 1339–1350, 17 out. 2009.

PRYMULA, R. *et al.* A phase 2 randomized controlled trial of a multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (I): Effects of prophylactic paracetamol on immunogenicity and reactogenicity of routine infant vaccines and 4CMenB. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 7, p. 1993–2004, 1 jul. 2014.

QIAO, W. *et al.* Ibuprofen attenuates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiology**, v. 131, n. 2, p. 97–106, 1 jun. 2015.

QUEIROZ, N. M. G. P. DE *et al.* Vaccines for COVID-19: perspectives from nucleic acid vaccines to BCG as delivery vector system. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 10, p. 515–524, 1 nov. 2020.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 5 dez. 2013.

REY-JURADO, E. *et al.* Assessing the Importance of Domestic Vaccine Manufacturing Centers: An Overview of Immunization Programs, Vaccine Manufacture, and Distribution. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JAN, p. 1, 18 jan. 2018.

RICCI, E. *et al.* The Effectiveness of Paracetamol to Reduce the Post-Vaccination SARS-CoV-2 Adverse Effects in an Italian Vaccination Center. **Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1493, 15 set. 2023.

SAEED, S. *et al.* Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. **Science**, v. 345, n. 6204, 26 set. 2014.

SALEH, E.; MOODY, M. A.; WALTER, E. B. Effect of antipyretic analgesics on immune responses to vaccination. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 9, p. 2391, 1 set. 2016.

SERT, N. P. DU *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLOS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000410, 1 jul. 2020.

SETHU, S. *et al.* Immunogenicity to biologics: mechanisms, prediction and reduction. **Archive immunology et therapies experimentalis**, v. 60, n. 5, p. 331–344, out. 2012.

SHARIF, N. *et al.* Efficacy, Immunogenicity and Safety of COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 714170, 11 out. 2021.

SHARMA, A.; AHMAD FAROUK, I.; LAL, S. K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. **Viruses**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2021.

SINGH, J. The national center for the replacement, refinement, and reduction of animals in research. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 1, p. 87, jan. 2012.

SOKOLOVSKA, A.; HEM, S. L.; HOGENESCH, H. Activation of dendritic cells and induction of CD4+ T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. **Vaccine**, v. 25, n. 23, p. 4575–4585, 6 jun. 2007.

STADLER, K. *et al.* SARS--beginning to understand a new virus. **Nature reviews. Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 209–218, 2003.

STEVENSON, G. W.; BILSKY, E. J.; NEGUS, S. S. Targeting Pain-Suppressed Behaviors in Preclinical Assays of Pain and Analgesia: Effects of Morphine on Acetic Acid-Suppressed Feeding in C57BL/6J Mice. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 6, p. 408–416, 1 jun. 2006.

VILLANUEVA, P. *et al.* The safety of co-administration of Bacille Calmette-Guérin (BCG) and influenza vaccines. **PLOS ONE**, v. 17, n. 6, p. e0268042, 3 jun. 2022.

VILLANUEVA, P. *et al.* Safety of BCG vaccination and revaccination in healthcare workers. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 19, n. 2, 1 ago. 2023.

VOGEL, M.; BACHMANN, M. F. Immunogenicity and Immunodominance in Antibody Responses. p. 89–102.

VOYSEY, M. *et al.* Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomized controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10269, p. 99, 1 jan. 2021.

WALK, J. *et al.* Outcomes of controlled human malaria infection after BCG vaccination. **Nature Communications 2019 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 20 fev. 2019.

WANG, YANG *et al.* Mycobacterium bovis BCG Given at Birth Followed by Inactivated Respiratory Syncytial Virus Vaccine Prevents Vaccine-Enhanced Disease by Promoting Trained Macrophages and Resident Memory T Cells. **Journal of Virology**, 30 mar. 2023.

WHITTAKER, A. L.; HOWARTH, G. S. Use of spontaneous behavior measures to assess pain in laboratory rats and mice: How are we progressing? **Applied Animal Behavior Science**, v. 151, p. 1–12, 1 fev. 2014.

WU, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265, 12 mar. 2020.

XU, J.; BRENNAN, T. J. Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. **Anesthesiology**, v. 112, n. 1, p. 153–164, 2010.

XU, W. *et al.* Safety and efficacy of the COVID-19 vaccine in children and/or adolescents: A meta-analysis. **The Journal of Infection**, v. 84, n. 5, p. 722, 1 maio 2022.

YANG, J. *et al.* A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. **Nature 2020 586:7830**, v. 586, n. 7830, p. 572–577, 29 jul. 2020.

ZHANG, C. *et al.* Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 594, 2019.

ZHANG, X. Y. *et al.* A protocol for the systematic review and meta-analysis of thigmotactic behavior in the open field test in rodent models associated with persistent pain. **BMJ Open Science**, v. 5, n. 1, p. 100135, 22 jan. 2021.

ZHANG, X. Y. *et al.* A systematic review and meta-analysis of thigmotactic behavior in the open field test in rodent models associated with persistent pain. **PLOS ONE**, v. 18, n. 9, 1 set. 2023.

ZHENG, C. *et al.* Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 114, p. 252, 1 jan. 2022.

ZHENG, Y. *et al.* Applications of bacillus Calmette-Guerin and recombinant bacillus Calmette-Guerin in vaccine development and tumor immunotherapy. **Expert review of vaccines**, v. 14, n. 9, p. 1255–75, 2015.

APENDICE A – AVALIAÇÃO DE TEMPERATURA.

O uso de paracetamol como profilaxia da febre durante a vacinação infantil foi estudado em vários ensaios clínicos, sugerindo que ele pode reduzir a incidência de febre e reações adversas comuns após a imunização pediátrica (Ipp *et al.*, 1987; Prymula *et al.*, 2014). Nesse estudo, apesar de não termos obtidos resultados significativos na alteração de temperatura durante as imunizações (Figura 11) com as vacinas em nenhum momento dos experimentos, é importante destacar que esses resultados podem ser influenciados por limitações do método de avaliação da temperatura, tais como o uso de termômetros diferentes, locais de medições, e períodos climáticos em que os experimentos foram realizados. No entanto, alguns achados sugerem que a nova vacina recombinante e a BCG possuem baixa reatogenicidade para reações febris, colaborando com os dados obtidos na pesquisa de LOPES *et al.*, (2018) sobre os eventos adversos após a imunização e não foi evidenciado alterações de temperatura com a vacina BCG.

O monitoramento da temperatura em camundongos é comumente realizado por meio da técnica invasiva por via retal. No entanto, esse método pode causar desconforto ao animal, aumentando o risco de rupturas ou infecção da mucosa (Newsom *et al.*, 2004). Por essa razão, a utilização de termômetros de superfície tornou-se necessário para garantir os princípios do 3Rs e o bem-estar animal.

Para avaliar a temperatura dos camundongos foram utilizados termômetros digital de superfície no dorso do animal. O termômetro de superfície sem infravermelho foi utilizado apenas na 1ª imunização, enquanto a medição infravermelho ocorreu exclusivamente no reforço vacinal. Essa alteração nos termômetros justifica as variações de temperatura entre o gráfico 11A e 11B.

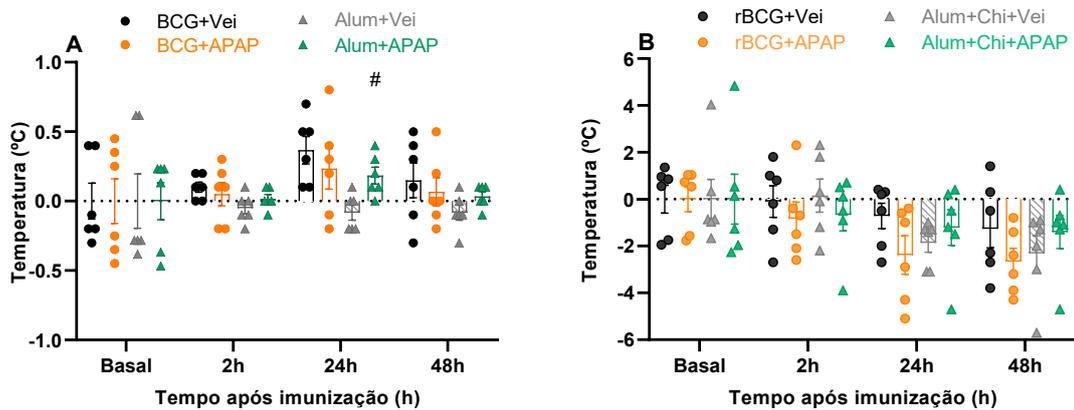


Figura 11: Verificação da temperatura durante testes comportamentais: Experimentos realizados em camundongos machos C57BL/6. As avaliações ocorreram no basal, 2h, 24h e 48h após 1ª imunização. As mesmas medidas se repetiram nos períodos do reforço vacinal com Alum. **(A)** grupos experimentais utilizando a vacina BCG com reforço de Alum, tratados e não tratados com paracetamol. **(B)** grupos experimentais utilizando a vacina rBCG com reforço vacinal de proteína Chimera e Alum, tratados e não tratados com paracetamol. ANOVA de 2 vias (tempo e tratamento) com medidas repetidas (fator tempo), seguido por teste post hoc de Tukey.